



HAL
open science

Compréhension des mécanismes de complexation de l'uranyle par les molécules du vivant : élaboration de peptides biomimétiques chélatants pour la détoxification

Fanny Laporte

► **To cite this version:**

Fanny Laporte. Compréhension des mécanismes de complexation de l'uranyle par les molécules du vivant : élaboration de peptides biomimétiques chélatants pour la détoxification. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV038 . tel-02963639

HAL Id: tel-02963639

<https://theses.hal.science/tel-02963639>

Submitted on 11 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Inorganique et Bio-inorganique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Fanny LAPORTE

Thèse dirigée par **Pascale DELANGLE** et **Claude VIDAUD**

préparée au sein du **Laboratoire des Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé du CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Compréhension des mécanismes de complexation de l'uranyle par les molécules du vivant : élaboration de peptides biomimétiques chélatants pour la détoxification

Thèse soutenue publiquement le **10 octobre 2017**, devant le jury
composé de :

Dr Vincent AUCAGNE

Chargé de recherche au CNRS à Orléans, Rapporteur

Dr Catherine BERTHOMIEU

Ingénieur-chercheur au CEA Cadarache, Rapporteur

Dr Carole DUBOC

Directrice de recherche au CNRS à Grenoble, Présidente du jury

Dr Richard ORTEGA

Directeur de recherche au CNRS à Bordeaux, Examineur

Dr Marius REGLIER

Directeur de recherche au CNRS à Marseille, Examineur

Dr Pascale DELANGLE

Ingénieur-chercheur au CEA Grenoble, Directrice de thèse, membre invité

Dr Claude VIDAUD

Ingénieur-chercheur au CEA Marcoule, Directrice de thèse, membre invité



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives ainsi que son Programme Transversal de Toxicologie pour avoir financé mes travaux de recherche et pour m'avoir permis de travailler dans un environnement de qualité, en contact avec des personnes passionnées par leur métier.

Je remercie Thierry Douki et Pascale Maldivi pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'accueillant au Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique au sein de l'équipe Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination. Je tiens par ailleurs à remercier Frédéric Chandezon et Pascale Delangle qui m'ont permis de continuer mon travail dans d'excellentes conditions, au Laboratoire des Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Énergie et la Santé, au sein de l'équipe Chimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie.

Je tiens à remercier chaleureusement mes directrices de thèse, Pascale Delangle et Claude Vidaud, qui m'ont confié ce projet qui leur tenait à cœur. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous et j'espère que ce plaisir aura été partagé. Vos enseignements, votre exigence et votre soutien m'ont poussée à donner le meilleur de moi-même. Je vous remercie de m'avoir formée et d'avoir pris le temps nécessaire pour répondre à mes multiples questions, de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir associée aux réunions projets UranOs puis Turbo, qui ont été très enrichissantes, tant sur le plan professionnel que personnel. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir élevée au rang de docteur et d'avoir tenu vos engagements en tant que directrices de thèse. Je suis très fière d'avoir travaillé pour et avec vous, et d'avoir été ambassadrice d'un si beau projet, qu'aujourd'hui (enfin) je m'approprie.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail : Carole Duboc qui a présidé le jury de thèse, Vincent Aucagne et Catherine Berthomieu qui ont accepté d'être rapporteurs, ainsi que Richard Ortega et Marius Réglier. Je les remercie également pour leurs questions et leurs remarques qui ont enrichi le débat lors de ma soutenance de thèse.

Merci aussi à Elisabeth Mintz, Eric Ansoborlo et Carole Duboc, membres de mon comité de suivi de thèse qui ont contribué à ce travail grâce à leurs conseils avisés et à leurs remarques constructives.

J'ai effectué mes travaux de recherche dans un environnement hautement collaboratif et je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué au projet.

Un immense merci à Mélanie Robert du CEA Marcoule pour son travail de qualité et sa persévérance lors de la production des domaines, ainsi que pour tout ce qu'elle m'a appris lors de mon séjour à Marcoule. Merci également à Olivier Pible pour son aide et sa participation aux études bioinformatiques, et à Charles Marcheti pour sa contribution à la production des domaines.

Je remercie aussi les membres de mon laboratoire au CEA Grenoble. Merci à Nathalie Sisommay et à Omblin Four-Merlin pour leur contribution en synthèse et à Pierre-Alain Bayle pour ses explications quant au fonctionnement et à l'utilisation des spectromètres RMN. Je tiens à remercier Colette Lebrun pour son aide en spectrométrie de masse et en synthèse ainsi que pour son incroyable gentillesse. Tu es un ange Colette ! Merci infiniment pour tes conseils avisés et ta bienveillance tout au long de ma thèse.

J'adresse enfin mes remerciements aux personnes avec qui nous avons collaboré pour ce projet et qui ont contribué à enrichir le travail présenté dans ce manuscrit et m'ont permis d'étendre mes connaissances. Merci au Dr. Bernard Brutscher de l'Institut de Biologie Structurale avec qui j'ai eu l'opportunité de réaliser les expériences de RMN à haut champ et qui a pris le temps de m'expliquer cette technique. Merci au Pr. Christophe Den Auwer de l'Institut de Chimie de Nice pour les résultats complémentaires en spectroscopie d'absorption X. Enfin un grand merci à Agnès Hagège de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon pour sa disponibilité et son aide lors des expériences d'électrophorèse capillaire en novembre 2015.

Je remercie mes collègues de travail rencontrés ces trois dernières années, à commencer par les doctorants du laboratoire : Marie (Momo), Maria (la Moulette) et Alexandra qui m'ont accueillie et m'ont offert leur amitié et leurs conseils ; Carine avec qui l'entraide en fin de parcours aura été source de motivation et de décompression ; Edit pour sa grande discrétion ainsi que pour m'avoir supportée lors de la rédaction ; Harish, Laura, Jérémy et Johan pour m'avoir donné au moins une bonne raison quotidienne de sourire et de dédramatiser, pour m'avoir « sortie » pendant la rédaction et pour m'avoir offert des discussions et débats animés inoubliables. Merci également à Lionel et à Seydou (le doc'), pour le partage d'expérience, les encouragements pendant la période de rédaction ainsi que pour les conseils lors de mes débuts hésitants en matière de recherche d'emploi. Merci à Pauline et Cyen venus égayer nos journées à l'été 2015. Un merci tout particulier à Christophe Lincheneau et à Jennifer Molloy pour leur soutien tout au long de ma thèse : les pauses thé/scones, les débats sans fin, votre amitié et votre recul m'ont beaucoup aidée. Je tiens également à remercier vivement Florence Duclair et Christelle Gateau. Merci Flo pour notre connexion musicale de très grande qualité, ta bonne humeur et ta grande gentillesse. Merci Christelle pour nos discussions et pour ton ouverture d'esprit ; garde cette belle énergie que tu apportes partout avec toi. Mes remerciements s'adressent aussi à Zohra Termache

pour son aide administrative précieuse notamment lors de l'organisation de mes déplacements en mission et en congrès, à Joëlle Paparella et à Charlie Picot pour leur assistance dans la préparation logistique de la soutenance, à Yves Chenavier pour ses conseils au laboratoire et à Sylvain Caillat pour la relecture de ce manuscrit, le partage des bons plans et la bidouille informatique. Je remercie enfin l'ensemble de mes collègues du RICC et du CIBEST, sans oublier les membres de LX Repair. J'ai eu le plaisir de partager avec vous une (voire deux) tasse(s) de café le matin, dans une ambiance animée et conviviale et je vous en remercie : Nathalie, Jacques, Morgane, Faustine, David, Jean-Luc, Sarah, ...

Je tiens enfin à exprimer ma profonde gratitude envers mes proches, et tout particulièrement envers mes parents Carole et Pierre-Marie qui m'ont appris tant de choses et m'ont transmis leurs valeurs. Un grand merci également à ma marraine Brigitte, à mon parrain Jean-Luc, à mes grands-parents maternels et paternels, à ma sœur Florence et à mes cousines Aurore et Charlotte qui sont aussi mes sœurs de cœur. Je vous remercie tous de tout cœur pour votre soutien indéfectible dans toutes mes aventures, malgré votre effroyable manque d'objectivité à mon égard ! Mes derniers remerciements s'adressent à mon colocataire et garde-fou, mon acolyte au quotidien, mon égal : ces 1093 jours n'auraient pu être aussi riches d'aventures et de sens sans toi.

Table des matières

Remerciements.....	3
Abréviations.....	13
Table des acides aminés naturels	17
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I – BIBLIOGRAPHIE	23
1 Uranium, uranyle et toxicité	25
1.1 <i>Uranium et uranyle</i>	25
1.1.1 Abondance et répartition.....	25
1.1.2 Quelques propriétés de l'élément	26
1.1.3 Le cation uranyle : géométrie et classification	28
1.2 <i>Exploitation anthropogénique de l'uranium et risques de contamination</i>	31
1.2.1 Production de combustibles enrichis à grande échelle et applications	31
1.2.2 Usage d'uranium appauvri.....	32
1.2.3 Risques d'exposition et voies de contamination.....	32
1.3 <i>Toxicités de l'uranium</i>	36
1.3.1 Radiotoxicité.....	36
1.3.2 Toxicité chimique et effets sur la santé	37
1.3.3 Toxicité de l'uranyle à l'échelle cellulaire	41
1.3.4 Interactions à l'échelle moléculaire.....	42
1.3.5 Traitements en cas de contamination	45
1.4 <i>Conclusion</i>	48
2 Interactions uranyle-protéines.....	50
2.1 <i>Identification des protéines cibles</i>	50
2.1.1 Criblage <i>in silico</i>	50
2.1.2 Criblage <i>in vitro</i>	52
2.2 <i>Etude de complexes uranyle-protéine en milieux aqueux et physiologique</i>	55
2.2.1 Milieu d'étude	56
2.2.2 Hydrolyse de l'uranyle	56
2.2.3 Equilibres de complexation et constantes de stabilité et de dissociation	57
2.2.4 Méthodes de caractérisation des complexes protéine-uranyle	61
2.3 <i>Protéines sériques</i>	64
2.3.1 Transferrine	65
2.3.2 Albumine	67
2.3.3 Féтуine-A	68
2.4 <i>Protéines phosphorylées de l'os</i>	69
2.4.1 Ostéopontine	69
2.4.2 Ostéonectine	71
2.5 <i>Ingénierie de protéine</i>	71
2.5.1 Protéine NiKr – mutation du site à Ni ²⁺	72

2.5.2	CaM et motif EF-hand – mutation du site à Ca ²⁺	73
2.5.3	Conception d'une protéine <i>de novo</i> : super binding protein	74
2.6	<i>Conclusion</i>	75
3	Objectifs du projet	77
3.1	<i>Apport d'informations structurales sur les sites d'interaction uranyle-FETUA</i>	77
3.2	<i>Approche biosinspirée pour l'étude des sites d'interactions uranyle-OPN</i>	78
3.3	<i>Méthode de compétition in situ suivie par fluorescence</i>	78
	CHAPITRE II – IDENTIFICATION DES SITES D'INTERACTION FETUA-URANYLE	81
	Introduction au chapitre II	83
1	FETUA et uranyle	84
1.1	<i>Rappels sur les structures des protéines</i>	84
1.1.1	Structure primaire	84
1.1.2	Structures secondaires	84
1.1.3	Structure tertiaire	85
1.2	<i>Informations structurales sur la FETUA</i>	86
1.2.1	Séquence de la protéine	86
1.2.2	Structure tridimensionnelle de la protéine	86
1.3	<i>Etat des connaissances sur les interactions FETUA-uranyle</i>	87
1.3.1	Stœchiométrie des complexes.....	87
1.3.2	Constantes apparentes de stabilité ou de dissociation	89
1.3.3	Environnement de coordination du métal	90
1.3.4	Impact de l'uranyle sur la structure et la fonction de la protéine	90
2	Stratégie d'identification des sites d'interactions FETUA-uranyle par RMN	92
2.1	<i>La spectroscopie RMN, une technique de choix en biologie structurale</i>	92
2.1.1	Rappels sur la résonance magnétique nucléaire.....	92
2.1.2	Application de la spectroscopie RMN à l'étude de protéines.....	93
2.1.3	Interaction protéine-métal en RMN.....	98
2.1.4	Détermination de structure protéique par RMN	100
2.1.5	Avantages et inconvénients de la RMN par rapport à la cristallographie des RX	101
2.2	<i>Etude RMN des interactions FETUA-uranyle : quels systèmes étudier ?</i>	102
2.2.1	Choix des domaines	102
2.2.2	Limite des systèmes	104
2.2.3	Conditions requises pour les études RMN hétéronucléaires	104
2.3	<i>Production des domaines D1 et D2 sous forme recombinante marquée</i>	105
2.3.1	Stratégie de production	105
2.3.2	Contrôle des protéines recombinantes.....	106
3	Etudes des interactions domaine-uranyle	109
3.1	<i>Etude comparative des domaines D1 et D2 par bioinformatique</i>	109
3.2	<i>Dichroïsme circulaire</i>	112
3.3	<i>RMN</i>	114

3.3.1	Spectres HSQC et HMQC en l'absence de métal	114
3.3.2	Spectres HSQC et HMQC en présence de métal	116
3.4	<i>Electrophorèse capillaire</i>	119
3.5	<i>Fluorescence</i>	121
3.5.1	Complexes FETUA-uranyle : évaluation de constantes de stabilité apparentes	121
3.5.2	Interactions entre domaines de la FETUA et uranyle	123
4	Conclusion	128
CHAPITRE III – PEPTIDES MIMES DES INTERACTIONS URANYLE-OPN		131
Introduction au chapitre III		133
1	Peptide de référence polyglutamate A1	134
1.1	<i>Des cyclodécapeptides structurés en feuillets β</i>	134
1.2	<i>Interaction entre les cyclodécapeptides et l'uranyle</i>	135
1.2.1	Spectrométrie de masse	136
1.2.2	Dichroïsme circulaire	137
1.2.3	Spectrométrie de fluorescence.....	138
2	Peptides monophosphorylés : quel est le rôle de la fonction phosphate lors de la complexation de l'uranyle?	142
2.1	<i>Synthèse des peptides</i>	142
2.1.1	Synthèse peptidique sur support solide.....	142
2.1.2	Introduction d'acides aminés phosphorylés : nature et position	143
2.1.3	Stratégie de synthèse des peptides monophosphorylés.....	144
2.1.4	Sous-produit fluorophosphate.....	146
2.2	<i>Interaction avec l'uranyle</i>	148
2.2.1	Variation de position et structuration des complexes	148
2.2.2	Choix du résidu phosphorylé	151
2.2.3	Implication du phosphate dans la coordination du métal.....	153
3	Des sites de liaison de l'uranyle polyphosphorylés dans l'OPN ?	157
3.1	<i>Synthèse des composés</i>	157
3.1.1	Stratégie de synthèse des peptides diphosphorylés	157
3.1.2	Phosphorylation globale	158
3.1.3	Stratégie de synthèse des cyclodécapeptides tri- et tétraphosphorylés sur support.....	159
3.1.4	Peptide linéaire tétraphosphorylé	162
3.2	<i>Interaction entre peptides diphosphorylés et uranyle</i>	163
3.2.1	Stœchiométries et structures des complexes	163
3.2.2	Evaluation des constantes apparentes de complexation	165
3.2.3	Sélectivité uranyle/calcium	167
3.3	<i>Interaction entre peptides tri- ou tétraphosphorylés et uranyle</i>	168
3.3.1	Une spéciation plus complexe	168
3.3.2	Evaluation des constantes apparentes de formation des complexes	172
3.3.3	Comparaison avec un peptide linéaire.....	174
3.3.4	Sélectivité uranyle/calcium	175

4	Conclusion.....	178
	CHAPITRE IV – METHODE DE COMPETITION <i>IN SITU</i> POUR LA DETERMINATION DE CONSTANTES APPARENTES	181
	Introduction au chapitre IV	183
1	Hexapeptides non naturels.....	184
1.1	<i>Peptide référence P²² : conception et propriétés complexantes.....</i>	<i>184</i>
1.1.1	Conception rationnelle de peptides hexadentes pour la chélation de lanthanides	184
1.1.2	Interaction P ²² -uranyle.....	187
1.2	<i>Sondes non naturelles PflP²² et NaphP²²</i>	<i>189</i>
1.2.1	La proflavine	190
1.2.2	Le naphthalimide	191
1.2.3	Interaction avec l'uranyle	191
1.3	<i>Tests préliminaires de compétition <i>in situ</i></i>	<i>194</i>
1.3.1	Compétition NaphP ²² -P ²²	194
1.3.2	Compétition NaphP ²² -EDTA	196
2	Cyclodécapeptides non naturels	199
2.1	<i>Synthèse de cyclodécapeptides polyglutamates porteurs du Naph</i>	<i>199</i>
2.1.1	Acides aminés modifiés Fmoc-X(Naph)-OH.....	199
2.1.2	Synthèse des peptides A1-X(Naph)	201
2.2	<i>Interaction avec l'uranyle</i>	<i>202</i>
2.3	<i>Perspectives en synthèse</i>	<i>203</i>
2.3.1	Environnement électronique du Naph.....	203
2.3.2	Nature du fluorophore.....	205
3	Le NaphP²² comme sonde référente pour compétitions <i>in situ</i>	207
3.1	<i>Evaluation de constantes de stabilité par modélisation : peptides à 3 et 4 pS.....</i>	<i>207</i>
3.2	<i>Construction d'une échelle d'affinité</i>	<i>210</i>
3.2.1	Sélection des molécules.....	210
3.2.2	Compétitions à pH 7	210
3.2.3	Modèle d'évaluation de constantes apparentes.....	211
4	Conclusion.....	214
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	217
	EXPERIMENTAL PART	225
1	Synthesis	227
1.1	<i>General information</i>	<i>227</i>
1.2	<i>Unnatural amino acid synthesis</i>	<i>228</i>
1.2.1	Fmoc-Lys(Naph)-OH synthesis	228
1.2.2	Fmoc-Drp(Naph)-OH synthesis	230
1.3	<i>Reference polyglutamate peptide A1</i>	<i>232</i>
1.4	<i>Phosphorylated peptides.....</i>	<i>233</i>

1.4.1	Monophosphorylated peptides	233
1.4.2	Diphosphorylated peptides.....	236
1.4.3	Tri- and tetraphosphorylated cyclodecapeptides	238
1.4.4	Linear tetraphosphorylated peptide	242
1.5	<i>Cyclodecapeptides bearing unnatural aminoacids</i>	244
1.5.1	A1-Lys(Naph)	244
1.5.2	A1-Dpr(Naph).....	245
1.6	<i>Hexapeptides</i>	246
1.6.1	P ²²	246
1.6.2	NaphP ²²	246
1.6.3	PfIP ²²	247
2	Metal binding studies	248
2.1	<i>General information</i>	248
2.2	<i>Preparation of solutions</i>	248
2.2.1	Uranyl and calcium solutions	248
2.2.2	Buffers	249
2.2.3	Solutions of peptides and proteins	249
2.3	<i>ESI-MS experiments</i>	250
2.4	<i>CD titrations</i>	250
2.4.1	Peptides	250
2.4.2	b-FETUA, D1 and D2.....	251
2.5	<i>Fluorescence titrations</i>	251
2.6	<i>Competition experiments followed by fluorescence</i>	252
2.6.1	Uranyl-calcium competition experiments.....	252
2.6.2	Competition experiments between ligands	252
2.7	<i>NMR experiments</i>	253
2.8	<i>CE-ICP-MS experiments</i>	253
	ANNEXE 1 – STRATEGIES DE PRODUCTION DES DOMAINES D1 ET D2 DE LA FETUA	255
	ANNEXE 2 - DESCRIPTION DES OUTILS BIOINFORMATIQUES	271
	REFERENCES	275

Abréviations

ACN : acétonitrile

Ada : acide aminé aminodiacétate

ADN : acide désoxyribonucléique

ANSM : Agence Nationale de la Santé et du Médicament

ARN : acide ribonucléique

ATSDR : *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

Boc : *tert*-butoxycarbone

BSA : albumine de sérum bovin

Bzl : benzyle

CaM : calmoduline

CD : dichroïsme circulaire

CDCl₃ : chloroforme deutéré

CI : conversion interne

CIS : croisement inter-système

Cit : citrate

COSY : *CO*relation Spectroscopy

CRP : *C-reactive protein*

CSD : *Cambridge Software Databank*

C-ter : extrémité C-terminale d'un chaîne peptidique

D1 : domaine 1 de la féтуine-A

D2 : domaine 2 de la féтуine-A

D₂O : eau deutérée

Dansyle : 5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfonyle

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DCI : dicyanoimidazole

DCM : dichlorométhane

DCP : acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique

DIEA : *N,N*-diisopropyleéthylamine (base de Hünig)

DMF : diméthylformamide

Dmab : *para*-diméthylaminobenzaldéhyde

DOTA : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique

Dpr : acide 2,3-diaminopropionique

DSC : calorimétrie différentielle à balayage

DTPA : acide diéthylène triamine pentaacétique

DVB : divinylbenzène

EC : électrophorèse capillaire

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

Em. : émission

ESI : source d'ionisation électrospray

EtOH : éthanol

EXAFS : *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*

FETUA : féтуine-A ou α -2-HS-glycoprotéine

Fmoc : fluorénylméthoxycarbone

GP : groupe protecteur

HEDP : acide 1-hydroxyéthane-1,1'-diphosphonique

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HMQC : *heteronuclear multiple quantum correlation*

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HSA : albumine de sérum humain

HSAB : *Hard and Soft Acids and Bases*

HSQC : *heteronuclear single quantum correlation*

HPC : hydroxypropyle de cellulose

ICP : source plasma à couplage inductif

IDA : acide iminodiacétique

IMAC : chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés

IR : infra-rouge

ITC : titration calorimétrique isotherme

Ln : lanthanides

MES : acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique

MeOH : méthanol

MS : spectrométrie de masse

MS/MS : spectrométrie de masse en mode tandem

MW : masse moléculaire

Naph : naphthalimide

NMM : *N*-méthylmorpholine

NOE : effet Overhauser nucléaire

NOESY : spectroscopie à effet Overhauser nucléaire

Novasyn TGA : résine amino fonctionnalisée avec espaceur 4-hydroxyméthylphenoxyacetic acid linker

N-ter : extrémité N-terminale d'une chaîne peptidique

ON : ostéonectine

OPN : ostéopontine

Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PDB : *Protein Data Bank*

PEG : polyéthylène glycol

Pfl : proflavine

pH : potentiel hydrogène

pKa : constante d'acidité logarithmique

pSer : phosphosérine

pThr : phosphothréonine

PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

RMN : résonance magnétique nucléaire

Rn : Radon

RX : rayons X

SEC : chromatographie d'exclusion stérique
SPPS : synthèse peptidique sur support solide
SPR : résonance plasmonique de surface
SUP : *Super Binding Protein*

TASP : *Template Assembled Synthetic Proteins*

^tBu : *tert*-butyle

^tBuOOH : hydroperoxyde de *tert*-butyle

Tf : transférine

TFA : acide trifluoroacétique

TIS : triisopropylsilane

TLC : *thin layer chromatography* ; chromatographie sur couche mince

TOCSY : *TOTAL Correlation Spectroscopy*

t_R : temps de rétention

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

TROSY : *Transverse relaxation optimized spectroscopy*

Trt : trityle

UV : ultra-violet

Wang : résine alcool p-benzyloxybenzyle

WHO : *World Health Organisation* ; Organisation Mondiale de la Santé

Table des acides aminés naturels

Lettre	Nom	Abréviation
A	alanine	Ala
C	cystéine	Cys
D	acide aspartique	Asp
E	acide glutamique	Glu
F	phénylalanine	Phe
G	glycine	Gly
H	histidine	His
I	isoleucine	Ile
K	lysine	Lys
L	leucine	Leu
M	méthionine	Met
N	asparagine	Asn
P	proline	Pro
Q	glutamine	Gln
R	arginine	Arg
S	sérine	Ser
T	thréonine	Thr
V	valine	Val
W	tryptophane	Trp
Y	tyrosine	Tyr

INTRODUCTION GENERALE

Dans un contexte pluridisciplinaire, à l'interface entre chimie et biologie, la chimie bio-inorganique s'intéresse entre autre à l'étude des cations métalliques dans les systèmes biologiques et à la toxicité des métaux dans le monde du vivant. Il existe deux grandes catégories de métaux: les métaux essentiels au monde du vivant et ceux qui n'ont aucun rôle biologique connu, qu'ils soient naturels ou artificiels.

La première catégorie de métaux est constituée de 13 éléments jugés indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. La moitié des enzymes et un tiers des protéines du protéome humain nécessitent la présence d'un cation métallique, généralement divalent, pour stabiliser leur structure et/ou assurer leur fonction *in vivo*.¹ Certains métaux essentiels sont présents de façon relativement abondante, comme le calcium ou le potassium, tandis que d'autres sont présents à l'état de traces ou d'ultra-traces dans l'organisme (les oligo-éléments : cuivre, nickel, cobalt,...). L'organisme se charge de finement réguler les processus d'absorption, de stockage et d'excrétion de ces métaux. Une carence en métal peut mener à de graves troubles métaboliques. Un excès de métal peut quant à lui entraîner des effets toxiques sur l'organisme. Une maladie génétique est généralement à l'origine du dysfonctionnement de l'homéostasie de l'élément menant à son accumulation dans l'organisme : hémochromatose pour le fer, maladie de Wilson pour le cuivre, ...

La seconde catégorie identifiée contient un nombre important d'éléments aux propriétés variées mais présentant tous une toxicité pour l'environnement et les organismes vivants qui dépend de leurs spéciations. Parmi ces éléments métalliques se trouvent des métaux lourds particulièrement toxiques, comme le plomb, le mercure ou le cadmium, des éléments métalliques comme l'or ou le palladium, et les actinides, qui présentent la particularité d'avoir une double toxicité chimique et radiologique. La toxicité de ces métaux constitue l'une des préoccupations majeures des organismes de santé publique pour deux raisons principales. Tout d'abord, la présence de certains de ces éléments dans différents compartiments de la géosphère est fortement impactée par les activités humaines qui mènent à leur dispersion dans l'environnement. Ensuite, de nombreux organismes vivants dont l'Homme n'ont pas évolué pour faire face aux formes toxiques anthropogéniques de ces éléments. De nombreuses recherches sont ou ont été entreprises pour comprendre les mécanismes de contamination et de toxicité engagés, et pour concevoir des traitements de décontamination efficaces.

L'uranium, actinide naturel principalement connu pour la production d'énergie est l'un de ces métaux toxiques non essentiels qui est abondamment exploité par l'homme : plus de 50 000 tonnes d'uranium sont annuellement extraites, manufacturées et transportées dans le monde.² En 2016, cette production représentait près de 5 fois celle du cadmium et plus de 10 fois celle du plomb.^{3,4} Par ailleurs, ces chiffres

ne prennent pas en compte les activités d'extraction minière de phosphates pour la production d'engrais, autre source anthropogénique importante d'uranium souvent oubliée mais qui mène pourtant à la mise en contact directe du métal avec l'environnement et avec l'homme.

La toxicité de l'uranium est étudiée depuis les années 1880.⁵ De nombreuses données ont été recensées à différentes échelles du vivant, permettant d'établir des directives pour la santé.⁶ Cependant, les mécanismes de toxicité aux échelles cellulaire et moléculaire ne sont encore que partiellement décrits et il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour décontaminer l'être humain en cas d'accident.

Quelques protéines cibles de l'uranyle (forme soluble de l'élément pénétrant l'organisme) ont été identifiées *in vivo* et *in vitro*. La plupart des sites d'interaction protéine-uranyle sont néanmoins inconnus, notamment pour les deux protéines humaines les plus affines de l'uranyle (la féтуine-A et l'ostéopontine) récemment identifiées.^{7,8} La caractérisation et la localisation de tels sites d'interaction nécessitent la mise au point de stratégies adaptées aux propriétés du métal et à celles de la protéine cible identifiée.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte, avec pour objectif de mieux comprendre les facteurs clés régissant les interactions entre l'uranyle et les protéines, en prenant pour modèles les deux protéines humaines qui présentent à ce jour les affinités les plus élevées pour l'uranyle.

Un état de l'art non exhaustif portant sur l'élément uranium et sur la toxicité de l'uranyle est tout d'abord présenté. L'état des connaissances actuelles sur les protéines humaines cibles de l'uranyle avérées ou suspectées est en particulier développé. Deux d'entre elles sont particulièrement affines pour l'uranyle. La féтуine-A et l'ostéopontine présentent des caractéristiques très différentes en termes de structures et de propriétés complexantes et nécessitent donc d'être étudiées à l'aide d'approches différentes. Une approche structurale par résonance magnétique nucléaire est proposée pour la féтуine dans le but de localiser les sites d'interaction de l'uranyle dans les deux domaines structurés de la protéine, tandis qu'une approche biomimétique est préférée pour l'ostéopontine dont la réorganisation autour du cation métallique suggère l'importance de la nature et du nombre de fonctions complexantes, paramètres que nous avons étudiés au sein de peptides modèles linéaires ou préorganisés dont j'ai réalisé la synthèse. Enfin, la mise au point d'une méthode de compétition entre une sonde non naturelle et diverses molécules complexant l'uranyle est présentée, avec pour objectif de proposer un outil fiable permettant de hiérarchiser l'affinité des molécules pour ce métal.

CHAPITRE I – BIBLIOGRAPHIE

1 Uranium, uranyle et toxicité

1.1 Uranium et uranyle

1.1.1 Abondance et répartition

Découvert en 1789 par Martin Heinrich Klaproth comme élément constitutif du minerai pechblende, l'uranium n'est isolé sous sa forme métallique pure qu'en 1841 par Melchior Peligot. Divers chimistes et physiciens s'intéressent alors progressivement au minerai et au métal. En 1896, Henri Becquerel s'intéresse au rayonnement émis par les sels d'uranium et donc à ses propriétés radioactives. Pierre et Marie Curie montrent en 1898 l'existence du polonium et du radium, éléments fils issus de la désintégration de l' ^{238}U . En 1938 Otto Hahn et Fritz Strassmann analysent les propriétés de fission de l'uranium après bombardement par des neutrons. Vont alors débiter les grands travaux des physiciens parmi lesquels Enrico Fermi, Leo Szilard, Carl David Anderson ainsi que Frédéric et Irène Joliot-Curie. Ces travaux mèneront de fil en aiguille à la première réaction nucléaire en chaîne en 1941, à la création de bombes nucléaires massivement destructrices et à l'exploitation à l'échelle mondiale de l'uranium pour la production d'énergie.

L'uranium est un élément d'origine naturelle que l'on trouve à l'échelle de la planète en teneurs plus ou moins fortes, selon la composition géologique des sols et des sédiments. Il s'agit du 48^{ème} élément le plus abondant sur Terre, devant des métaux comme l'argent ou l'or. La croûte terrestre et les couches sédimentaires maritimes en contiennent environ 2 à 4 ppm. On le retrouve dans des minerais aux compositions variées. Plus de 300 minerais différents ont déjà été recensés, dont la pechblende (uraninite, UO_2), l'autunite ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 10-12 \text{H}_2\text{O}$) ou encore la liebigite ($\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$). De nombreux minerais de phosphates contiennent également de l'uranium en quantités plus ou moins importantes.⁹ Un rapport de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques indique que les principales réserves extractibles se trouvent en Australie (29%) et au Kazakhstan (13%). On trouve également des sources en Russie (9%), en Afrique (Afrique du Sud 6%, Niger 5% et Namibie 5%), au Canada (9%) au Brésil (5%), en Chine (5%) et dans divers autres pays (<5%).² La teneur des eaux océaniques en uranium est plus faible que dans les sols (en moyenne de 3,3 ppb) bien que cela représente près de 4,5 milliards de tonnes d'uranium dissous dans les océans. On observe une hétérogénéité de concentrations en uranium dans les eaux de surface et les eaux souterraines selon la zone géographique (de 10^{-2} à 10 ppb).¹⁰

1.1.2 Quelques propriétés de l'élément

L'uranium appartient à la famille des actinides, des éléments de configuration électronique $[Rn] 5f^n 6d^m 7s^2$ (figure 1). Dans la série, la croissance du numéro atomique implique un remplissage des sous couches 5f et 6d. De numéro atomique 92, l'uranium a la configuration électronique $[Rn] 5f^3 6d^1 7s^2$. C'est l'élément naturel le plus lourd que l'on trouve sur la planète, les éléments dits transuraniens étant artificiellement produits par l'industrie nucléaire. Il se présente, sous sa forme pure, comme un métal gris. Sa densité de 19 g/cm^3 est environ 1,7 fois plus importante que celle du plomb.

1 H hydrogen (1,007; 1,008)																	2 He hélium 4,003		
3 Li lithium (6,938; 6,997)	4 Be beryllium 9,012											5 B boron (10,80; 10,83)	6 C carbon (12,00; 12,02)	7 N nitrogen (14,00; 14,01)	8 O oxygen (15,99; 16,00)	9 F fluorine 19,00	10 Ne neon 20,18		
11 Na sodium 22,99	12 Mg magnesium 24,31											13 Al aluminium 26,98	14 Si silicon (28,08; 28,09)	15 P phosphorus 30,97	16 S sulfur (32,05; 32,08)	17 Cl chlorine (35,44; 35,46)	18 Ar argon 39,95		
19 K potassium 39,10	20 Ca calcium 40,08	21 Sc scandium 44,96	22 Ti titanium 47,87	23 V vanadium 50,94	24 Cr chromium 52,00	25 Mn manganese 54,94	26 Fe iron 55,85	27 Co cobalt 58,93	28 Ni nickel 58,69	29 Cu copper 63,55	30 Zn zinc (65,382)	31 Ga gallium 69,72	32 Ge germanium 72,63	33 As arsenic 74,92	34 Se selenium 78,96(3)	35 Br bromine 79,90	36 Kr krypton 83,80		
37 Rb rubidium 85,47	38 Sr strontium 87,62	39 Y yttrium 88,91	40 Zr zirconium 91,22	41 Nb niobium 92,91	42 Mo molybdène 95,94(2)	43 Tc technetium	44 Ru ruthenium 101,1	45 Rh rhodium 102,9	46 Pd palladium 106,4	47 Ag silver 107,9	48 Cd cadmium 112,4	49 In indium 114,8	50 Sn tin 118,7	51 Sb antimony 121,8	52 Te tellurium 127,6	53 I iodine 126,9	54 Xe xenon 131,3		
55 Cs caesium 132,9	56 Ba barium 137,3	57-71 lanthanoids	72 Hf hafnium 178,5	73 Ta tantalum 180,9	74 W tungsten 183,8	75 Re rhenium 186,2	76 Os osmium 190,2	77 Ir iridium 192,2	78 Pt platinum 195,1	79 Au gold 197,0	80 Hg mercury 200,6	81 Tl thallium (204,3; 204,4)	82 Pb lead 207,2	83 Bi bismuth 208,0	84 Po polonium	85 At astatine	86 Rn radon		
87 Fr francium	88 Ra radium	89-103 actinoids	104 Rf rutherfordium	105 Db dubnium	106 Sg seaborgium	107 Bh bohrium	108 Hs hassium	109 Mt meitnerium	110 Ds darmstadtium	111 Rg roentgenium	112 Cn copernicium			114 Fl flerovium			116 Lv livermorium		
Lanthanides		57 La lanthanum 138,9	58 Ce cerium 140,1	59 Pr praseodymium 140,9	60 Nd neodymium 144,2	61 Pm promethium	62 Sm samarium 150,4	63 Eu europium 152,0	64 Gd gadolinium 157,3	65 Tb terbium 158,9	66 Dy dysprosium 162,5	67 Ho holmium 164,9	68 Er erbium 167,3	69 Tm thulium 168,9	70 Yb ytterbium 173,1	71 Lu lutetium 175,0			
Actinides		89 Ac actinium 227,0	90 Th thorium 232,0	91 Pa protactinium 231,0	92 U uranium 238,0	93 Np neptunium	94 Pu plutonium	95 Am americium	96 Cm curium	97 Bk berkelium	98 Cf californium	99 Es einsteinium	100 Fm fermium	101 Md mendelevium	102 No nobelium	103 Lr lawrencium			

Figure 1- Tableau périodique de Mendeleïev.

Les actinides sont parfois comparés aux lanthanides, ces deux séries impliquant respectivement un remplissage des orbitales 5f et 4f (éléments f). Contrairement à la série des lanthanides au sein de laquelle les éléments ont les mêmes comportements chimiques, ceux des actinides sont plus hétérogènes : les actinides légers (jusqu'à l'américium) ont un comportement proche des métaux de transition tandis que les actinides de la fin de la série ont un comportement plus proche de celui des lanthanides.

Comme tout actinide l'uranium peut se retrouver à divers degrés d'oxydation dans les compartiments terrestres, en fonction des conditions d'oxydoréduction de ces milieux. Les degrés d'oxydation de l'uranium vont de +III à +VI et les plus représentés dans la nature sont les degrés +IV et +VI. Si tous les actinides existent à divers degrés d'oxydation, tous ne sont pas stables au même degré. Ainsi l'uranium

est, avec le neptunium, le seul actinide à être particulièrement stable et mobile à l'état hexavalent (tableau 1).

Tableau 1 - Degrés d'oxydation des actinides légers. Le degré d'oxydation le plus stable d'un élément apparaît en gras, souligné. D'après Vidaud, Bourgeois et Meyer.¹¹

Ac	Th	Pa	U	Np*	Pu*	Am*
<u>III</u>			III	III	III	<u>III</u>
	<u>IV</u>	IV	IV	IV	<u>IV</u>	IV
		<u>V</u>	V	V	V	V
			<u>VI</u>	<u>VI</u>	VI	VI
				VII	VII	VII

* : élément synthétique

Les actinides présentent la particularité d'exister uniquement sous la forme de radioisotopes, c'est-à-dire d'isotopes instables. L'uranium naturel est constitué d'un mélange de trois isotopes. Ils ont les mêmes propriétés chimiques mais des propriétés radioactives différentes. Leurs demi-vies – période de temps à l'issue de laquelle la moitié de la population isotopique s'est spontanément désintégrée – diffèrent. La composition de l'uranium naturel et les principales propriétés des isotopes de masses 234, 235 et 238 sont reportées dans le tableau 2.

Tableau 2 - Propriétés des trois radioisotopes naturels de l'uranium

Radioisotope	Abondance naturelle (% en masse)	Période de demi-vie (an)	Activité massique (Bq.g ⁻¹)	Désintégrations
²³⁸ U	99,275	4,47.10 ⁹	1,24.10 ⁴	α, β-, (γ)
²³⁵ U	0,719	7,04.10 ⁸	8,00.10 ⁴	α, β-, (γ)
²³⁴ U	0,006	2,50.10 ⁵	2,30.10 ⁴	α, β-, (γ)

Les désintégrations des isotopes naturels de l'uranium se produisent spontanément sur une échelle de temps très longue. Elles sont de deux types, α et β-, et s'accompagnent d'émissions de particules α (noyau d'hélium ⁴He), β- (électron) et antineutrinos. Des radiations γ de faible énergie ont également été enregistrées lors de la désintégration de l'uranium naturel. Un enchaînement de désintégrations mène de l'isotope parent radioactif à la formation d'un isotope stable d'un autre élément. La

désintégration d'un noyau ^{238}U mène à la formation de ^{206}Pb (figure 2) et celle du ^{235}U mène à la formation de ^{207}Pb .

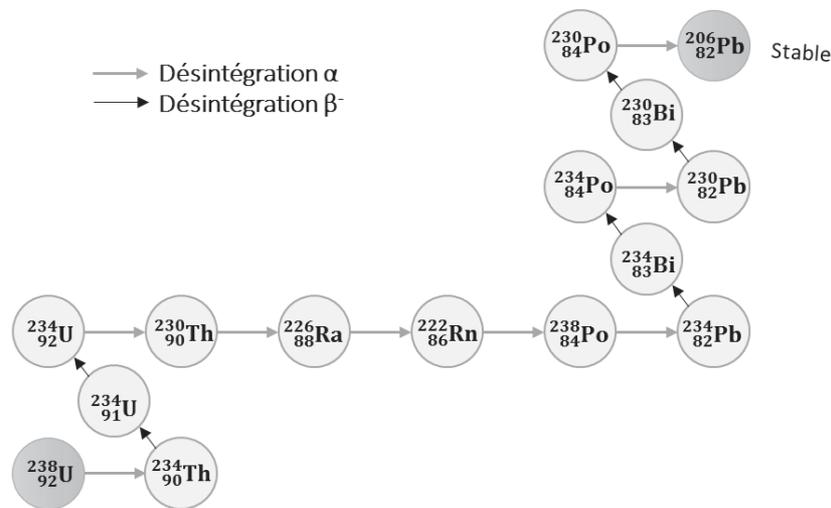


Figure 2- Chaîne de désintégration spontanée principale de l'isotope ^{238}U en ^{206}Pb

1.1.3 Le cation uranyle : géométrie et classification

L'uranium est soluble en milieux aqueux, principalement au degré d'oxydation +VI. Bien que cela soit moins fréquent, certains milieux réducteurs contiennent de l'uranium au degré d'oxydation +IV.⁹ A l'état hexavalent et en milieu aqueux on retrouve l'uranium sous la forme cationique uranyle UO_2^{2+} , généralement complexée par des molécules de faible poids moléculaire. La spéciation d'un élément est la caractérisation des formes sous lesquelles l'élément se trouve présent dans un environnement donné. La spéciation de l'uranyle en milieu aqueux dépend fortement de la composition du milieu en question. Divers paramètres tels que le pH, la température ou la force ionique du milieu influencent la spéciation de l'uranyle. Par exemple, l'uranyle a différents comportements en eaux douces ou en eaux salées. Des différences sont également observées d'un point géographique à un autre selon la composition des eaux et leur richesse en sels, carbonates, etc.

L'uranyle présente une géométrie linéaire et une géométrie de coordination qui lui est propre. Quatre à six ligands peuvent coordiner le cation dans un plan équatorial perpendiculaire à l'axe O—U—O (figure 3). La distance U=O est de 1.78 Å. L'angle O—U—O de 180° dévie rarement de plus de 5% lors de la complexation.

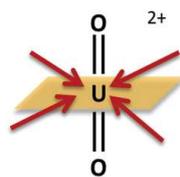


Figure 3 - Géométrie linéaire du cation uranyle et géométrie de coordination. Les flèches rouges indiquent le positionnement de fonctions complexantes

La théorie HSAB de Pearson (Hard and Soft Acids and Bases) présente une classification des cations métalliques selon leur état de charge et leur taille (tableau 3). Un cation métallique (acide de Lewis) dit « dur » présente généralement une charge élevée, une petite taille et est faiblement polarisable. Au contraire, un cation métallique dit mou va présenter une charge moins élevée, un rayon ionique plus important et peut être fortement polarisable. Une troisième catégorie de cations métalliques aux propriétés intermédiaires existe également. L'uranyle UO_2^{2+} est classé comme acide dur de Lewis, au même titre que le fer ferrique Fe^{3+} ou encore le calcium Ca^{2+} .

Tableau 3- Classification HSAB des acides - d'après Pearson¹²

Durs	Intermédiaires	Mous
H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Se^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , La^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , As^{3+} , Ir^{3+} , Si^{4+} , Ti^{4+} , Zr^{4+} , Th^{4+} , Pu^{4+} , VO^{2+} , UO_2^{2+} , ...	Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , ...	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Tl^+ , Hg^+ , Cs^+ , Pd^{2+} , Cd^{2+} , Pt^{2+} , ...

Une classification de ligands (base de Lewis) selon la théorie HSAB a également été réalisée (tableau 4). Une base de Lewis est une espèce possédant un doublet libre susceptible de se coordiner à un acide de Lewis. La théorie HSAB prévoit une interaction plus favorable entre acide et base de mêmes catégories (dur-dur, mou-mou).

Tableau 4 - Classification HSAB des bases - d'après Pearson¹²

Durs	Intermédiaires	Mous
H ₂ O, HO ⁻ , F ⁻ , CH ₃ CO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , NO ₃ ⁻ , ROH, RO ⁻ , R ₂ O, NH ₃ , RNH ₂ , N ₂ H ₄	C ₆ H ₅ NH ₂ , C ₅ H ₅ N, N ₃ ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ , SO ₃ ²⁻ , N ₂	R ₂ S, RSH, RS ⁻ , I ⁻ , SCN ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , R ₃ P, R ₃ As, (RO) ₃ P, RNC, CN ⁻ , CO, H ⁻ , R ⁻ , C ₂ H ₄ , C ₆ H ₆

Ainsi, les ligands interagissant préférentiellement avec l'uranyle sont les bases dites « dures ». Ce sont par exemple des hydroxyles, halogénures, carboxylates, carbonates, phosphates ou encore sulfates. Contrairement aux associations entre acide et base mous qui sont principalement de nature covalente, les associations entre acide et base durs sont de nature ionique. Les complexes d'uranyle sont plus forts avec des ligands donneurs d'oxygène qu'avec des ligands donneurs d'azote. Certains ligands peuvent adopter un comportement polydentate (mono, bi, tri,...). C'est notamment le cas de certaines fonctions, comme les carboxylates et les phosphates.

La géométrie spécifique de l'uranyle tend à le distinguer d'autres cations métalliques sphériques dont la géométrie de coordination est isotrope, bien qu'ils présentent une charge identique (exemple : Ca²⁺) ou qu'ils soient issus de la même famille d'éléments (exemple : Pu⁴⁺) (figure 5). Ainsi, une simple analogie uranyle-calcium ou uranyle-plutonium ne permet pas d'interpréter l'ensemble des phénomènes qui résultent de la chimie de coordination de l'uranyle (transfert à l'environnement, toxicité chimique,...).¹³

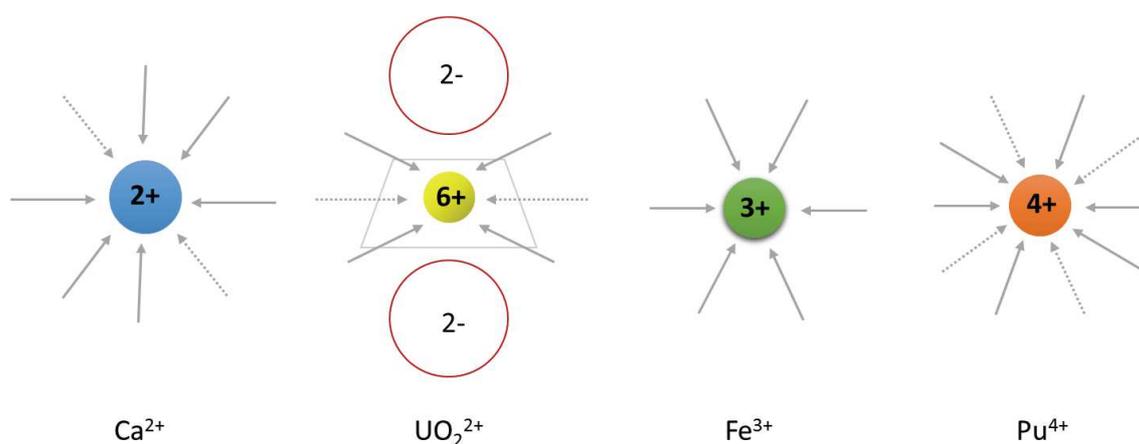


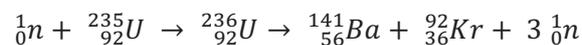
Figure 4 – Géométrie particulière de l'uranyle - d'après Van Horn et Huang¹³

1.2. Exploitation anthropogénique de l'uranium et risques de contamination

Les applications de l'uranium ont évolué au fil des décennies. Avant que ses propriétés radioactives ne soient découvertes, l'élément a notamment été utilisé à des fins décoratives. Les sels de diuranate de sodium ou d'ammonium étaient employés comme pigments pour l'industrie du verre, de la céramique et de la faïence. La découverte de la radioactivité et des propriétés des différents isotopes constitutifs de l'uranium naturel a permis le développement de méthodes de datation radiométriques¹⁴ et de production d'énergie nucléaire. L'uranium est aujourd'hui employé dans divers secteurs d'activité pour des applications civiles et militaires.

1.2.1. Production de combustibles enrichis à grande échelle et applications

L'isotope ^{235}U est un isotope fissile. Sous l'effet d'un bombardement de neutrons thermiques, son noyau peut subir une fission nucléaire menant à la formation de produits fils de moindre masse atomique et à l'émission de neutrons (équation 1). Cette émission s'accompagne d'une production d'énergie évaluée à environ 203 MeV par noyau, majoritairement récupérable. L'énergie hypothétiquement produite par un gramme d' ^{235}U est approximativement un million de fois supérieur à l'énergie produite par un gramme de pétrole ($7,8 \times 10^{10}$ J pour 1 g d' ^{235}U et $4,20 \times 10^4$ J pour 1 g de pétrole).



Équation 1- Réaction de fission du ^{235}U par bombardement de neutron thermique

L' ^{235}U est le seul isotope fissile naturel de l'uranium. Afin de produire des combustibles plus efficaces, l'industrie nucléaire a développé un processus d'enrichissement isotopique au cours duquel l'uranium extrait d'un minerai naturel est enrichi en isotope fissile ^{235}U . Le combustible peut-être plus ou moins enrichi en fonction de l'application visée. Un faible enrichissement de 3-5% en ^{235}U est généralement suffisant pour employer l'uranium comme combustible dans les centrales nucléaires (réacteurs conventionnels). Les armes nucléaires actuelles qui sont fabriquées à partir d'uranium contiennent un combustible enrichi à 85%-90%.¹⁵

L'avènement de l'énergie nucléaire a mené à l'industrialisation des procédés d'extraction et de traitement du minerai. La pechblende est broyée et traitée avec de l'acide sulfurique dans lequel l'uranium se dissout sous forme de sulfate d'uranyle UO_2SO_4 . L'hydroxyde de sodium permet de précipiter l'uranium sous forme de diuranate de sodium $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$. Ce composé est transformé en

« yellowcake », un concentré d'octaoxyde de triuranium U_3O_8 solide, produit le plus souvent à proximité de la mine d'extraction. Le yellowcake présente l'avantage de pouvoir être transporté plus facilement pour être envoyé vers les sites de production d'énergie nucléaire. Arrivé sur les sites de production, il est converti en hexafluorure d'uranium UF_6 , enrichi en isotope fissile puis reconverti sous forme de poudre en oxyde d'uranium UO_2 pour être conditionné en pastilles qui serviront à la fabrication de combustibles. Le combustible peut être stocké ou directement utilisé. En phase aval, c'est à dire après irradiation en réacteur, le combustible usé est mis au repos puis en partie recyclé *via* des filières de retraitement des différents combustibles afin d'en tirer le maximum de matières premières. L'uranium est recyclé pour être réinséré dans un combustible neuf. Chaque étape en amont et en aval du cycle nucléaire conduit à la production de déchets plus ou moins riches en uranium qu'il faut également traiter : effluents, stériles miniers, etc.

1.2.2. Usage d'uranium appauvri

Un sous-produit est issu de l'étape d'enrichissement de l'uranium ; il s'agit de l'uranium appauvri, plus riche en ^{238}U et moins riche en ^{235}U que l'uranium naturel. Sa radioactivité naturelle est moindre. Il est valorisé pour diverses applications, en raison de sa haute densité et de ses propriétés fissiles.

Sa densité lui confère des propriétés intéressantes pour bloquer les radiations γ particulièrement nocives pour les êtres vivants puisque pénétrants dans l'organisme. Il a donc été employé comme bouclier pour des applications en milieu médical mais également en milieu nucléaire pour le transport de déchets hautement radioactifs. Les militaires s'en sont servis pour apporter une protection aux véhicules blindés contre les armes anti-char et pour confectionner des munitions utilisées principalement au cours des années 1990 (guerre du Golfe ; conflits en Bosnie et au Kosovo). Aujourd'hui remplacé par du tungstène, l'uranium appauvri a servi de matériau de contrepoids dans l'industrie de l'aviation et pour la fabrication de missiles.¹⁶⁻¹⁸

L' ^{238}U est un isotope fissile qui par capture de neutron rapide donne du ^{239}Pu , isotope fissile. Dans l'industrie électronucléaire, l' ^{238}U est recyclé pour la préparation de combustibles MOX (Mix Oxydes : uranium mélangé avec du ^{239}Pu , destiné aux réacteurs à neutrons rapides).¹⁵

1.2.3. Risques d'exposition et voies de contamination

L'environnement et les êtres vivants sont exposés à de multiples risques de contamination à l'uranium, liés à sa présence naturelle et aux activités anthropogéniques (figure 5).

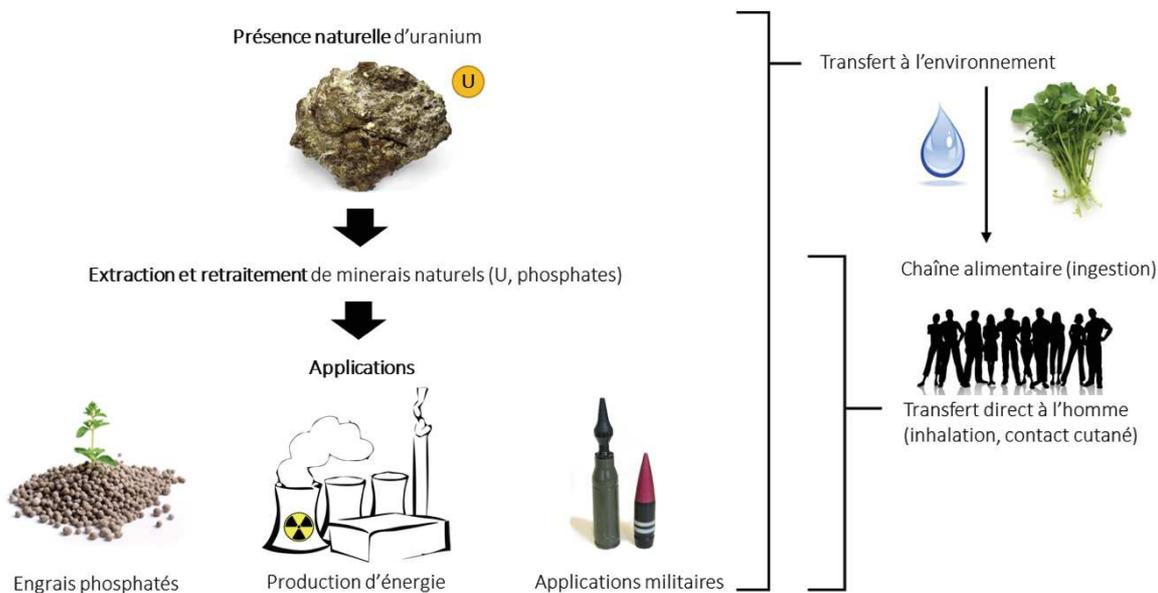


Figure 5 - Schéma simplifié des risques d'exposition à l'uranium

Présence naturelle

Tout d'abord cet élément naturel est contenu dans divers minerais et roches pouvant être exposés à de nombreux agents extérieurs, et pouvant donc subir naturellement de l'érosion, ce qui mène au transfert d'uranium dans les divers compartiments de la Terre : eaux, sols, air. Comme explicité en section 1.1, l'uranium est naturellement présent en teneurs importantes dans certains pays comme l'Australie ou le Kazakhstan. En Finlande, des concentrations élevées en uranium ont été trouvées dans les eaux de surface (jusque 20 mg/L).¹⁹ La concentration en uranium dépasse la teneur seuil de 20 µg/L pour 85 des 476 points d'eaux souterraines étudiés par Frengstad *et al.*²⁰ En France métropolitaine, les sols du massif armoricain, du massif central et de la Corse sont particulièrement riches en uranium (figure 6).²¹ Le Rhône, charrie environ 29 tonnes d'uranium par an, provenant de l'érosion naturelle des roches uranifères contenues dans les sols.

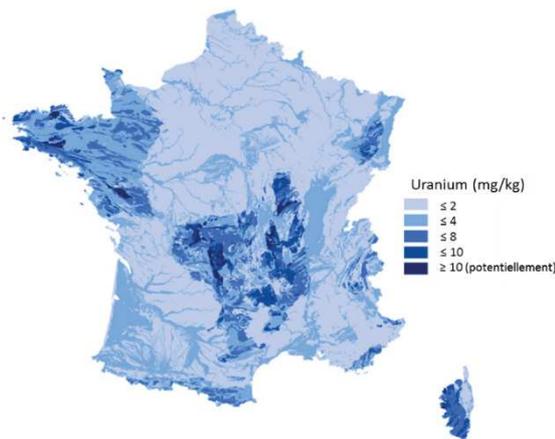


Figure 6 - Les sols français contiennent naturellement de l'uranium en quantités variables. Source : Ielsch et al.²¹

Risques d'exposition dans le secteur nucléaire

Pour les travailleurs du secteur nucléaire, ou encore pour les populations vivant à proximité de sites nucléaires, les risques de contamination doivent également prendre en considération la présence d'uranium, en amont et en aval du cycle nucléaire, sous différentes formes chimiques et physiques. L'uranium est manipulé et transformé, mais également transporté et stocké ce qui engendre des risques supplémentaires, et notamment des risques d'accidents et de dispersion. Il existe également un risque vis-à-vis des déchets produits par l'industrie nucléaire (effluents, stériles miniers, etc.). Des études ont été menées pour mesurer les quantités d'uranium retrouvées dans l'air aux environs de certaines centrales nucléaires de Grande Bretagne au sein desquelles les combustibles sont produits. La quantité relâchée annuellement dans l'atmosphère par ces centrales est très variable, allant de moins de 0,005 kg à environ 130 kg (données provenant du ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation du Royaume-Uni).²² Les risques de contamination par inhalation et, dans une moindre mesure, par contact cutané ne sont donc pas négligeables. Le dépôt de poudres et poussières uranifères et le déversement d'effluents d'uranium dans les eaux et les sols en cas d'accident constituent également un risque accru de contamination de l'environnement.

Risques d'exposition à l'uranium appauvri

L'exposition à l'uranium appauvri concerne principalement les travailleurs des secteurs industriels utilisant cet élément et également certaines populations militaires et civiles exposées à des blessures par balles (contamination par voie cutanée et/ou sub-cutanée) au cours de certains conflits comme celui de la guerre du Golfe (1990-1991). Au même titre que l'uranium destiné aux activités nucléaires, l'uranium appauvri est stocké et transporté et sa transformation génère des déchets qui doivent être retraités.

Engrais phosphatés et dispersion d'uranium dans l'environnement

Une source anthropogénique d'uranium considérable et non liée aux activités nucléaires est à mettre en lien avec l'extraction et l'utilisation d'engrais phosphatés naturels.²³⁻²⁵ En effet, les minerais phosphatés sont naturellement riches en uranium. Leur exploitation génère deux types de sources :

- des poussières riches en uranium sont produites au cours des processus d'extraction des phosphates et peuvent contaminer les travailleurs des mines ainsi que les populations locales. Ces poussières favorisent une contamination par inhalation ou contact cutané et peuvent également se déposer sur les sols environnant le site d'exploitation ;
- l'uranium piégé dans ces minerais n'est pas éliminé lors de l'extraction du phosphate et l'utilisation de tels engrais en agriculture contamine les sols et donc potentiellement les eaux et plantes par transfert, et les animaux et êtres humains par le biais de la chaîne alimentaire (ingestion d'eau contaminée ou d'aliments contaminés, qu'ils soient d'origine végétale ou animale).

Transfert d'uranium aux plantes

Présent dans l'environnement, naturellement, suite à l'utilisation d'engrais ou suite à un accident, l'uranium peut s'infiltrer dans les sols et les eaux sous sa forme hexavalente uranyle, stable et mobile. La contamination des milieux terrestres et aquatiques mènent à un risque de contamination des végétaux (figure 7).

Une étude menée par Shahandeh et Hosser sur 34 espèces de plantes terrestres a montré que l'uranyle pouvait être internalisé à partir d'un sol contaminé, les quantités absorbées variant d'une espèce à l'autre. *Helianthus annuus* (tournesols) et *Brassica juncea* (moutarde indienne) sont parmi les espèces qui accumulent le plus d'uranium. L'élément est principalement absorbé au niveau des racines (jusqu'à 6200 mg U/kg), et va, dans une moindre mesure, migrer vers les parties aériennes de ces plantes (jusqu'à 102 mg U/kg).²⁶ L'uranyle est complexé par les phosphates contenus dans les racines de la plante, ce qui minimise son transfert vers les feuilles.²⁷ La composition d'un sol influe sur le transfert sol-plante : pH, quantités de matières organique et inorganique.^{26,28,29} Ces paramètres influencent la spéciation de l'uranyle, comme explicité en section 1.1.3. Les sols calcaires (pH 7,5 – 8 ; présence de carbonates) sont par exemple plus favorables à un transfert sol-plante que les sols acides (pH 5,5 – 5,7).²⁶ Une étude menée par Favas *et al.* sur 53 espèces de plantes terrestres et aquatiques, a montré que les plantes aquatiques pouvaient également absorber l'uranium (0,28 à 55,6 mg/kg). De même que pour les plantes terrestres, la quantité accumulée dépend de l'espèce et de la spéciation de l'uranyle dans le milieu aqueux considéré.²⁹ Le transfert sol-plante est l'une des voies de contamination des animaux et des êtres humains par le biais de la chaîne alimentaire.

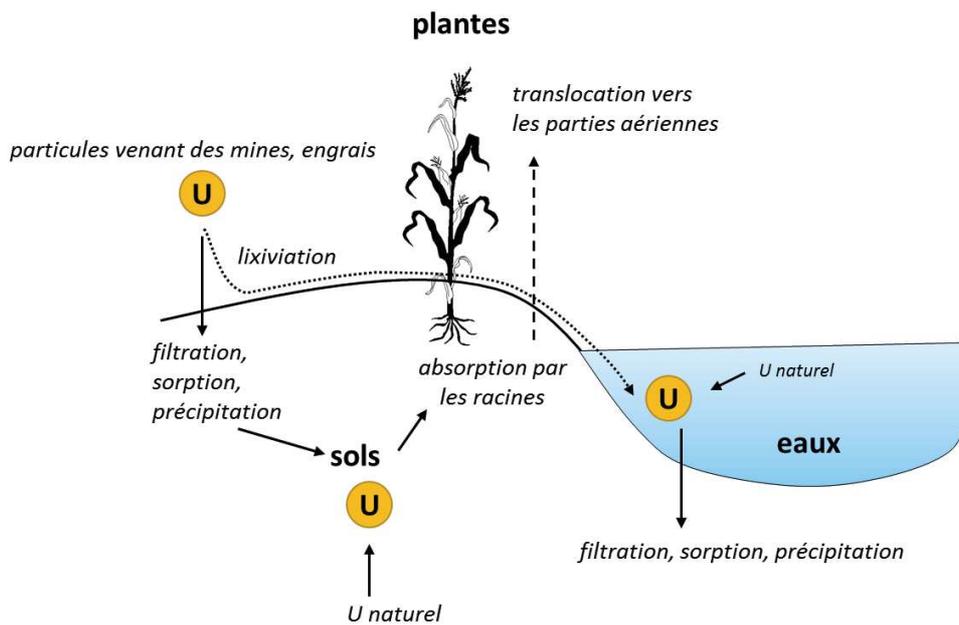


Figure 7 – Transfert d'uranium sos-plante. D'après Favas et al.²⁹

En résumé, les voies de contamination des êtres vivants sont multiples et varient d'une population à l'autre. Pour les travailleurs des différents secteurs industriels utilisant de l'uranium, une contamination par inhalation ou par contact cutané est possible. Pour une personne non exposée à ces environnements spécifiques, l'ingestion d'uranium *via* la nourriture contaminée et l'eau de boisson reste la voie de contamination prépondérante.

1.3. Toxicités de l'uranium

Comme beaucoup de métaux exogènes, l'uranium n'a aucune fonction métabolique connue dans le monde du vivant et présente une double toxicité chimique et radiologique. La biocinétique de l'uranium et sa toxicité à l'échelle de l'organisme ont été très étudiées chez certains mammifères comme les rongeurs, le chien et les primates. Les mécanismes de toxicité mis en jeu aux échelles cellulaires ou moléculaires sont complexes et bien moins décrits. La section 1.3 résume les principales connaissances sur le devenir du métal à ces différentes échelles.

1.3.1. Radiotoxicité

Quelle que soit sa forme chimique ou physique, l'uranium naturel présente une radiotoxicité dépendante de sa composition isotopique et de son activité massique (en Bq/kg, voir section 1.1.2). A

masse équivalente, un produit appauvri présente 40% de radioactivité en moins qu'un minerai brut du type pechblende. En ce sens l'uranium appauvri est moins radiotoxique que l'uranium enrichi en isotope fissile ^{235}U puisque cet isotope est plus instable que l'isotope de masse 238. Ces radio-isotopes se désintègrent naturellement en émettant des particules α ou β^- (voir section 1.1.2). Ces particules, qui peuvent être bloquées à l'aide d'une feuille de papier (α) ou d'aluminium (β^-), pénètrent peu l'organisme. Les isotopes de masses 235 et 238 de l'uranium sont plus faiblement émetteurs (γ) que divers autres isotopes artificiels produits par l'industrie nucléaire (plutonium, américium, curium, etc.).

Les risques encourus sont plus importants chez les travailleurs du secteur nucléaire, plus exposés à l'uranium enrichi en ^{235}U . L'élément internalisé émet des particules très localement, au niveau des organes dans lesquels il se dépose principalement (voir section 1.3.2 traitant de la toxicité chimique de l'uranium). L'effet des radiations d'uranium enrichi internalisé induiraient des dommages à l'ADN et des effets cancérigènes.¹⁹

1.3.2. Toxicité chimique et effets sur la santé

Les études portant sur la toxicité de l'uranium ont débuté dans les années 1880 et n'ont pas été interrompues depuis. Au fur et à mesure de l'acquisition de données et de l'accroissement des connaissances, des organismes comme l'Organisation Mondiale de la Santé ou l'agence ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry) mettent à jour leurs bases de données quant à la toxicité de l'élément.^{30,31}

Les conséquences liées à une exposition aiguë ou chronique d'uranium ont fait l'objet d'études ciblées sur des espèces animales et de façon évidente beaucoup moins fréquemment sur des populations humaines particulièrement exposées. Des effets divers (fatigue chronique, sommeil non-réparateur, perte de contrôle musculaire, maux de tête, pertes d'équilibre,...) rassemblés sous la dénomination de « Syndrome de la Guerre du Golfe » ont par exemple été observés chez des vétérans exposés à l'uranium appauvri (fragments de munitions piégés dans l'organisme). Ces symptômes seraient en partie dus à l'absorption d'uranium appauvri. Aucun lien de cause à effet n'a cependant été directement prouvé entre la quantité d'uranium excrétée et les fonctions neurocognitives testées de ces vétérans.³²

La figure 8 illustre de façon simplifiée les voies d'entrée, les organes de stockage et les deux voies d'excrétion principales de l'uranium après contamination.

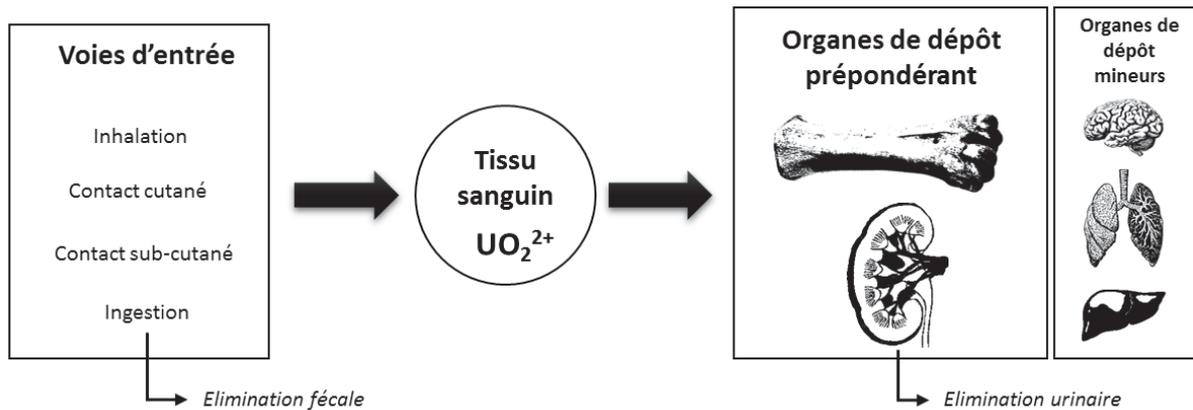


Figure 8- Schéma simplifié des voies d'entrées, des organes de stockage et des voies d'excrétion de l'uranium suite à une contamination

De la contamination au flux sanguin

L'ingestion est une voie majeure de contamination. L'uranium ingéré suit le tractus gastro-intestinal où un faible pourcentage est effectivement absorbé *via* l'intestin grêle puis transféré au flux sanguin.³³ Cette fraction absorbée varie entre 0,1 et 6% et dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce concernée, la composition du bol alimentaire ou encore la solubilité des différents composés uranifères. L'uranium est donc très majoritairement excrété *via* les fèces (\approx 95%). La contamination par inhalation se produit essentiellement chez les travailleurs du secteur nucléaire et les particules d'uranium inhalées se déposent dans les poumons. La fraction d'uranium soluble est en partie absorbée au niveau du tractus respiratoire, puis transférée vers le tissu sanguin (0,75 à 5%). L'uranium peut également être directement transféré des cornets nasaux vers le bulbe olfactif, d'après les travaux menés par Tournier *et al.* chez le rat où cet organe est particulièrement développé.³⁴ Seule une faible quantité d'uranium peut par contre traverser la barrière cutanée puis être transféré vers le tissu sanguin. Ce type de contamination est par ailleurs beaucoup moins fréquent, sauf chez certaines populations militaires et civiles exposées à de l'uranium appauvri au cours des conflits cités (voir section 1.2.3). En cas de blessure ouverte, l'uranium directement au contact du flux sanguin pénètre donc plus rapidement et plus efficacement dans l'organisme.^{5,30}

Ainsi, quelle que soit la voie de contamination, une fraction soluble de l'uranium se retrouve donc dans le sang, sous la forme hexavalente uranyle UO₂²⁺.

Du flux sanguin vers les organes de dépôt

Le métal est redistribué dans l'organisme depuis le compartiment sanguin. Il cible certains organes de stockage, principalement les os (10-15%) et les reins (12-25%) et dans une faible mesure d'autres organes et tissus mous : poumons, foie, rate, cerveau.^{19,35} Des effets tératogènes et embryotoxiques,

malformation des fœtus, augmentation de la mortalité *in utero* ont été observés chez le rat et la souris.^{19,36}

Effet observés au niveau rénal

L'uranium est éliminé du compartiment sanguin par réabsorption rénale et excrétion urinaire : 65% dès le premier jour et 70% après 6 jours. C'est un élément néphrotoxique dont les effets dépendent des quantités absorbées et de la durée d'exposition.¹⁹ Le rein est particulièrement sensible à une contamination aiguë : ce sont les dommages causés au rein qui sont responsables de la mort du sujet en cas d'administration de dose létale (1-5 g chez l'homme, 0,1 mg/kg chez le rat et 20 mg/kg chez le lapin). Les lésions induites par une contamination chronique ont été étudiées chez le rat après ingestion d'eau contaminée au nitrate d'uranyle sur 91 jours (0,06 à 0,09 mg U/kg/jour).³⁷ Des lésions ont été observées au niveau des tubules et glomérules rénaux. A plus forte dose, on observe une nécrose tubulaire aiguë et des anomalies fonctionnelles (polyurie, créaturie,...) et morphologiques. Des études menées auprès de Finlandais ont démontré une altération des fonctions tubulaires induite lors d'une exposition chronique à l'uranium par ingestion d'eau contaminée. Toutefois les études ne permettent pas de mettre en évidence une néphrotoxicité élevée de l'uranium chez l'homme après une telle exposition.³⁸⁻⁴⁰

Effets observés au niveau osseux

Les études portant sur l'affinité des éléments f envers la matrice de l'os montre que ces métaux vont se fixer dans le squelette et s'y accumuler.^{11,41} Contrairement au rein, d'où il peut être éliminé *via* les urines, l'uranium reste piégé dans les os, et ce jusqu'à plusieurs années. Dès 1948, des échanges d'uranium ont été observés à la surface d'os de lapin.⁴² Un mécanisme général d'échange entre l'uranyle et l'hydroxyapatite (matrice minérale de l'os, phases cristalline et amorphe) a été proposé par Vidaud, Bourgeois et Meyer (figure 9).¹¹

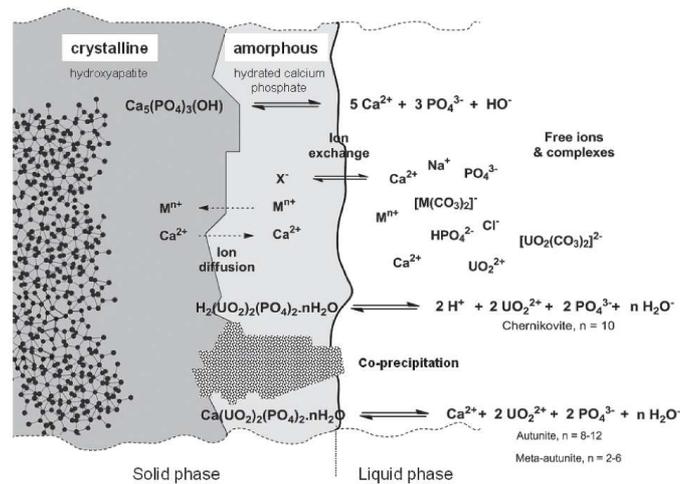


Figure 9- Mécanisme général d'échanges ioniques à la surface minérale de l'os. Source : Vidaud, Bourgeois et Meyer¹¹

L'os étant un organe en remodelage constant, l'uranium pourrait être résorbé de la matrice osseuse et libéré dans le flux sanguin à partir duquel il peut être soit à nouveau excrété, soit à nouveau accumulé au niveau du squelette.⁴¹ Chez le rat, on observe une accumulation de l'uranium dans les zones de tissu osseux récemment formé et dans le cartilage calcifié.⁴³ L'uranium a également un impact sur le processus de « turn-over » de l'os, en favorisant la résorption osseuse et en diminuant son accrétion.⁴⁴

Effets observés au niveau du cerveau

Comme pour tout métal lourd, de très faibles quantités d'uranium peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et s'y accumuler, *via* un mécanisme de transfert aujourd'hui encore inconnu.⁴⁵ En cas de contamination aiguë, l'uranium affecte le sommeil paradoxal.⁴⁶ En cas de contamination chronique, il affecte le système nerveux central, siège de la réception et du traitement de l'information, émetteur de commandes motrices.⁴⁷

En résumé, les études de biocinétique et de toxicité ont principalement été menées sur des modèles animaux. Elles ont mis en évidence que, quelle que soit la voie d'entrée (inhalation, ingestion, contact cutané ou sub-cutané) et le mode de contamination (aiguë ou chronique), l'uranium transite par le sang et exerce ses effets délétères sur deux organes cibles majeurs, le rein et l'os. Suite à une contamination aiguë l'uranium se dépose à court et moyen terme dans les reins, y provoquant des dommages importants pour sa fonction. Les conséquences d'une contamination chronique sont plus subtiles et plus difficiles à évaluer. On observe surtout un dépôt dans les os sur le long terme, avec un impact sur le processus de remodelage osseux.

1.3.3. Toxicité de l'uranyle à l'échelle cellulaire

Les études réalisées sur des cellules en culture sont complémentaires d'études *in vivo*. Elles permettent d'évaluer la sensibilité de différents types cellulaires à l'exposition à l'uranium, de quantifier son internalisation, d'identifier les mécanismes conduisant à sa cytotoxicité et de mettre en évidence des altérations de leurs métabolismes et de leurs fonctions. Des approches plus globales de type protéomique (analyse différentielle de protéines exprimées par la cellule en présence ou non du métal) ou transcriptomique (analyse de la modification de l'expression des gènes des cellules soumises à ce stress toxique) contribuent également à enrichir ces connaissances. Ainsi de nombreux travaux ont été conduits sur divers types de lignées cellulaires humaines ou animales. D'une façon générale on observe que quels que soient les modèles cellulaires utilisés, la cytotoxicité de l'uranyle dépend (i) de la dose d'uranyle à laquelle les cellules sont exposées, (ii) de la durée d'exposition des cellules au milieu contenant de l'uranyle et (iii) de la spéciation de l'uranyle.

Cellules rénales

Carrière *et al.*, Thiébault *et al.* et Prat *et al.* ont étudié trois modèles cellulaires rénaux : des cellules épithéliales rénales du rat (NRK52^E), des cellules rénales de l'embryon humain (HEK293) et des cellules rénales matures humaines (HK2).⁴⁸⁻⁵⁰

Les études de Carrière *et al.* évaluent les Cl_{50} – concentrations pour lesquelles on observe 50% de mortalité cellulaire – à $500 \pm 100 \mu\text{M}$ et $300 \pm 50 \mu\text{M}$ pour la lignée NRK52^E, et ce respectivement pour les complexes $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ et $\text{UO}_2\text{Cit}_2^{4-}$. Ces auteurs ont mis en évidence l'importance de la spéciation de l'uranyle (carbonates, citrates, phosphates) dans son internalisation par la cellule. En revanche, les complexes $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ et $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$ ne seraient pas ou peu cytotoxiques, l'uranyle étant probablement sous une forme non biodisponible. Thiébault *et al.* ont montré que l'altération de l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome est corrélée à la dose d'uranyle à laquelle sont exposées des lignées cellulaires NRK52^E. Des dommages à l'ADN sont causés par la présence d'uranium, soit indirectement par la production accrue de dérivés réactifs de l'oxygène, soit directement par interaction entre le métal et l'ADN. Les études menées par Prat *et al.* sur des lignées humaines montrent une altération de l'expression de nombreux gènes aux fonctions variées suite à l'exposition des cellules à l'uranium (182 pour HK2).

Cellules osseuses

Milgram *et al.*, Pierrefitte-Carle *et al.* et Grietsaenko *et al.* ont étudié 3 modèles cellulaires osseux : des ostéoblastes de rat (ROS17/2.8, UMR-106) et des ostéoclastes de souris (RAW 264.7).^{44,51,52} Les Cl_{50} ont

été évaluées à 393, 390 et 273 μM respectivement pour ces 3 lignées (U sous la forme $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$). Les cellules osseuses sont donc plus sensibles à la présence d'uranium que les cellules rénales. Milgram *et al.* ont par ailleurs montré que l'uranium était 10 fois plus accumulé au niveau des cellules osseuses qu'au niveau des cellules rénales et que, si l'uranium est 3 à 15 fois plus internalisé que le plomb, sa toxicité est néanmoins moins sévère que celle du plomb.⁵¹ L'inhibition de la fonction de minéralisation par les ostéoblastes et de la capacité de résorption osseuse par les ostéoclastes ont été constatées.^{44,52} La spéciation joue également un grand rôle et la présence de citrate augmente le pourcentage de métal internalisé et la cytotoxicité de l'uranium.

Cellules pulmonaires

L'expression du génome de cellules épithéliales est altérée en présence d'uranium, mais dans une moindre mesure par rapport à celle de cellules rénales humaines matures. Seules les expressions de 10 gènes sont modifiées d'après les études de Prat *et al.*, ce qui est très faible en comparaison des cellules rénales (182 gènes). La CI_{50} est évaluée à 500-1000 μM ce qui est plus élevé que pour des cellules rénales ou osseuses.⁵³

Cellules neuronales

Très peu d'études ont été menées sur des modèles de cellules neuronales. Paredes *et al.* ont identifié un phénomène de fractionnement isotopique lors de l'internalisation de l'uranium dans des neuroblastes humains. L' ^{235}U est internalisé plus efficacement ($\delta = 0,38 \pm 0,13 \text{ ‰}$) que l' ^{238}U lorsque les cellules sont exposées à des doses sub-toxiques.⁵⁴

En résumé, les études cellulaires réalisées sont complémentaires des études menées *in vivo*. Les informations obtenues sur les mécanismes de cytotoxicité et de génotoxicité induits par l'uranium permettent d'analyser certains phénomènes observés *in vivo* comme, par exemple, l'impact de l'uranium sur le turn-over osseux. La plupart des effets observés au niveau de l'organisme ou à l'échelle cellulaire ne peuvent cependant être complètement compris sans la description précise des mécanismes moléculaires altérés ou mis en jeu par la présence du métal.

1.3.4. Interactions à l'échelle moléculaire

Au sein de chaque compartiment – tissu sanguin, organe, cytoplasme, noyau cellulaire – et à chaque interface, les interactions moléculaires sont responsables du comportement de l'uranyle UO_2^{2+} , espèce de l'uranium soluble et mobile. En section 1.1.3 nous avons montré que la spéciation de l'uranyle

dépendait d'un nombre important de paramètres : pH, force ionique, composition ionique et moléculaire du milieu,... La notion de spéciation est cruciale en toxicologie : elle permet de définir les formes sous lesquelles un radionucléide est biodisponible ou non. Les mécanismes d'absorption, de rétention, de stockage et d'excrétion gouvernant le comportement de l'uranyle *in vivo* sont intimement liés à sa spéciation en milieu biologique (figure 10).^{35,55}

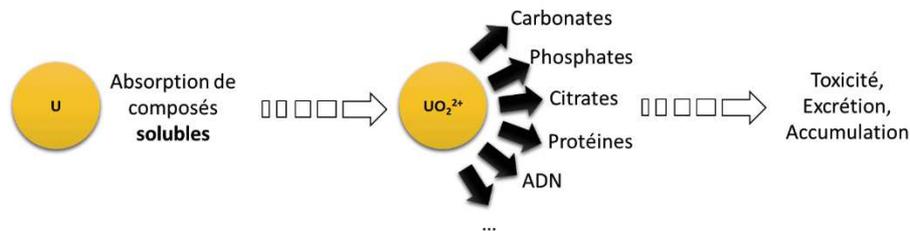


Figure 10 - Spéciation de l'uranyle en milieu biologique et interactions moléculaires conduisant à la toxicité de l'uranium

Des études de spéciation menées par Sutton et Burastero sur des fluides biologiques simulés (sérum, urine, bile...) montrent que l'uranyle n'apparaît que sous forme complexée par diverses molécules telles que les phosphates et carbonates.⁵⁶ Ces résultats ne prennent cependant pas en compte la complexité des matrices biologiques et notamment la présence de nombreuses autres entités dans ces fluides biologiques : cellules en suspension, protéines, molécules organiques exogènes, Des études, menées par Osman *et al.* et Scapolan *et al.* montrent que la présence de biomolécules impacte la spéciation de l'uranyle dans les urines et dans le sang.^{57,58}

Répartition de l'uranyle dans le sang

Le sang est un tissu particulier par lequel transite obligatoirement l'uranyle, quelle que soit la voie de contamination considérée. Il est constitué à 55% de plasma, fraction aqueuse du sang dans laquelle les cellules sanguines en suspension représentent les 45% restant. Le plasma est constitué de protéines et de diverses molécules inorganiques et organiques (glucose, lipides, résidus exogènes, carbonates, etc). La répartition de l'uranium dans le sang est présentée en figure 11. Les protéines plasmatiques initialement identifiées comme étant les cibles de l'uranyle sont l'albumine et la transferrine.⁵⁹⁻⁶² Plus récemment, la fétuine-A a été identifiée comme la cible protéique majeure de l'uranyle dans le plasma.⁷ Les associations protéines plasmatiques-uranyles font l'objet de recherches approfondies. La section 2.3 de ce chapitre traite plus particulièrement de ce point. L'équilibre des complexes de l'uranyle formés dans le sang est perturbé aux interfaces flux sanguin-organe cible, par exemple en cas de filtration des complexes bicarbonates-uranyle par les reins.^{19,63-65}

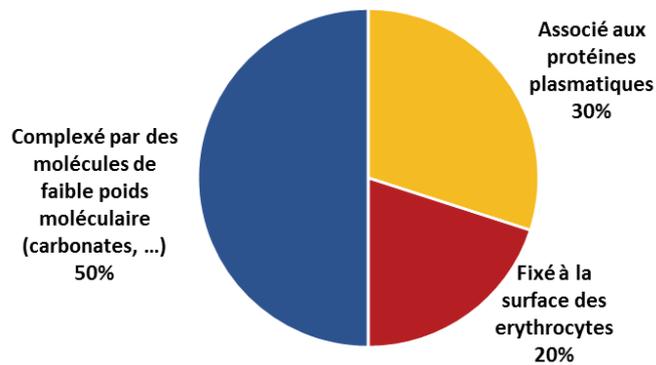


Figure 11 – Répartition de l’uranyle dans le tissu sanguin. D’après Ansoborlo et al.⁶⁶

Au niveau rénal

La rétention d’uranium au niveau des tubules proximaux décrite en section 1.3.2 est liée à diverses interactions entre l’uranyle et des molécules – phosphates et protéines – qui favorisent sa précipitation. L’exposition *in vitro* de cellules rénales épithéliales humaines a montré que la présence de phosphates conduisait à la précipitation de l’uranyle *via* la formation de clusters denses en électrons.⁶⁷

Au niveau osseux

L’os est un organe complexe fortement vascularisé et la perméabilité des parois des capillaires permettent au métal d’être au contact de la matrice et des cellules osseuses. Comme nous l’avons vu en section 1.3.2., les interactions entre l’uranyle et l’hydroxyapatite font intervenir de nombreux échanges ioniques. De plus des protéines circulantes impliquées dans l’homéostasie osseuse comme la fétuine, ou exprimées *in situ* par les cellules, comme l’ostéopontine, et qui présentent une affinité importante pour l’uranyle ont été identifiées et étudiées.^{8,68} Ce point est détaillé plus en détail en section 2.4.

Interactions avec l’ADN

Comme explicité en section 1.3.3., l’uranyle peut induire une instabilité génomique en raison de dommages causés à l’ADN. D’après une étude de Miller *et al.* sur des ostéoblastes humains, l’uranyle pourrait interagir directement avec l’ADN et causer des cassures simple et double brins. D’après les travaux de Stearns *et al.* sur des cellules ovariennes de hamster chinois, l’uranyle interagit avec les fonctions phosphates du squelette de l’ADN. Ces fonctions ont en effet des propriétés chélatantes intéressantes pour l’uranyle comme le prévoit la théorie HSAB (voir section 1.1.3).

En résumé, si la toxicité chimique de l’uranium ne dépend pas de sa composition isotopique, elle dépend en revanche fortement de sa forme chimique *in vivo*. Les recherches mettent en évidence certaines

interactions privilégiées entre l'uranyle et des molécules très différentes (voir plus haut, figure 8). Les mécanismes conduisant à la toxicité de l'uranyle sont cependant aujourd'hui encore mal connus.

1.3.5. Traitements en cas de contamination

Suite à une contamination de l'organisme par un radionucléide, le traitement administré varie d'une situation à l'autre. Divers facteurs doivent être pris en compte, tels que la voie de contamination (ingestion, inhalation ou contact cutané) ou le mode de contamination (aiguë ou chronique). Par ailleurs, la toxicité des radionucléides est double : radiologique et chimique. Les traitements non spécifiques permettent de diminuer l'absorption du métal dans l'organisme par lavage externe (peau), lavage interne (stomacal ou plus rarement trachéo-bronchique), chirurgie locale en cas de blessure ou encore par administration de laxatifs ou diurétiques. L'élimination du métal peut également être augmentée par administration d'un agent décorporant. Ce type de traitement par chélation est employé pour l'ensemble des métaux possiblement toxiques (fer, cuivre, mercure, plomb,...). Un agent décorporant est une molécule chimique permettant de former avec le cation métallique un complexe stable, dans le but d'inhiber l'effet toxique du métal. Il doit montrer des propriétés d'affinité et de sélectivité très élevées envers le métal ciblé, afin de perturber le moins possible l'équilibre d'autres métaux *in vivo*. Outre ces caractéristiques, la cinétique de complexation doit être suffisamment rapide, et les formes libre et complexée de l'agent doivent (i) être stables, (ii) pouvoir être excrétées facilement et (iii) être non toxiques.^{5,66}

Bicarbonate de sodium

A l'heure actuelle, en cas de contamination aiguë à l'uranium, les patients sont habituellement traités au bicarbonate de sodium dans le but d'augmenter l'excrétion urinaire d'uranium *via* la formation du complexe $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ dans le sang (figure 12).

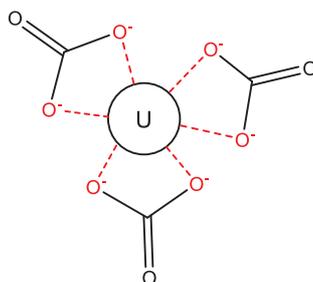


Figure 12 - Complexation de l'uranyle par les carbonates dans le système sanguin sous la forme $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$. Visualisation depuis l'axe O—U—O. Les atomes d'oxygènes ont été supprimés pour plus de lisibilité.

Le traitement est administré par perfusion d'une solution isotonique de bicarbonate de sodium à 1,4% (passage direct dans le sang), ou bien par administration de tablettes de bicarbonate de sodium (passage par le tractus gastro-intestinal puis absorption dans le tissu sanguin).⁶⁹ Ohmachi *et al.* ont montré que le bicarbonate de sodium permet de protéger les reins de la néphrotoxicité induite par une contamination aiguë à l'uranyle chez le rat.⁷⁰ En revanche, ce traitement n'est bénéfique que s'il est administré immédiatement après contamination à l'uranium. Un rapport de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) indique, qu'outre le fait que ce traitement possède une efficacité limitée, il peut augmenter la néphrotoxicité de l'uranium en favorisant la formation de cristaux d'uranium dans les reins.⁷¹ De plus, il n'a pas d'effet en cas d'accumulation dans les os résultant d'une contamination chronique.

Acide diéthylène triamine pentaacétique (Ca-DTPA)

Un agent décorporant autorisé en France depuis 2008, le Ca-DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique) permet d'augmenter l'élimination de la plupart des actinides de l'organisme (figure 13). Comme nous l'avons vu en section 1.1.3., une analogie entre UO_2^{2+} et Pu^{4+} n'est pas pertinente en raison de leurs différences de tailles et de géométries de coordination.¹³ Le Ca-DTPA ne convient donc pas à la décorporation de l'uranium.⁷² Des études ont par ailleurs confirmé le faible effet décorporant du DTPA pour une contamination du rat à l'uranium.^{5,73}

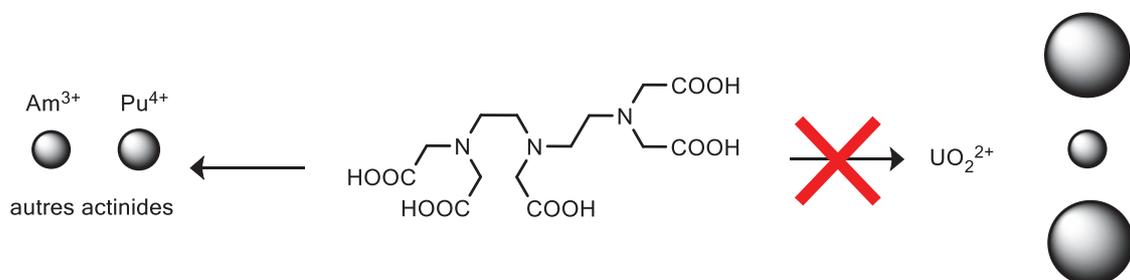


Figure 13 - Le Ca-DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique) est adapté à la décorporation des actinides sauf dans le cas de l'uranium, sous la forme uranyle UO_2^{2+} .

De nouvelles molécules ont donc été développées dans le but de concevoir un agent chélateur spécifique de l'uranium. Des calixarènes⁷⁴, des éthers couronnes, des binaphtyles⁷⁵, des acides polyaminocarboxyliques (EDTA, DTPA et dérivés)⁷⁶ ou encore des analogues de desferrithiocine⁷⁷ n'ont pas donné les résultats souhaités avec l'uranyle. Les études les plus prometteuses ont été initiées par K. Raymond, P. Durbin et M.-T. Hengé-Napoli et remontent aux années 2000.⁵ Elles concernent des biphosphonates et des ligands synthétiques dérivés de sidérophores.⁷⁸⁻⁸²

Biphosphonates

Les travaux menés par Jacopin *et al.* ont montré que l'acide 1-hydroxyéthane-1,1'-diphosphonique (figure 14a) présentait des propriétés intéressantes pour la conception de chélateurs appropriés à la chélation de l'uranium, plus spécifiquement au niveau osseux.⁷⁸ Ce composé, qui possède déjà une autorisation de mise sur le marché, est utilisé pour le traitement de la maladie de Paget et permet de ralentir le processus de remodelage osseux qui est anormalement excessif chez les patients atteints. Sawicki *et al.* ont développé 23 bipodes et tripodes porteurs de fonctions biphosphonates, dans le but de concevoir un agent décorporant spécifique à l'uranyle.^{79,80} Malheureusement, malgré les fortes affinités mesurées la plupart des complexes formés entre ces composés et le métal ne sont pas éliminés de l'organisme du rat. Seul le dipode biphosphonate a montré la capacité à augmenter de 10% l'excrétion de l'uranium (figures 14b et 14c). Des études complémentaires portant sur l'évaluation de sa toxicité sont aujourd'hui nécessaires.

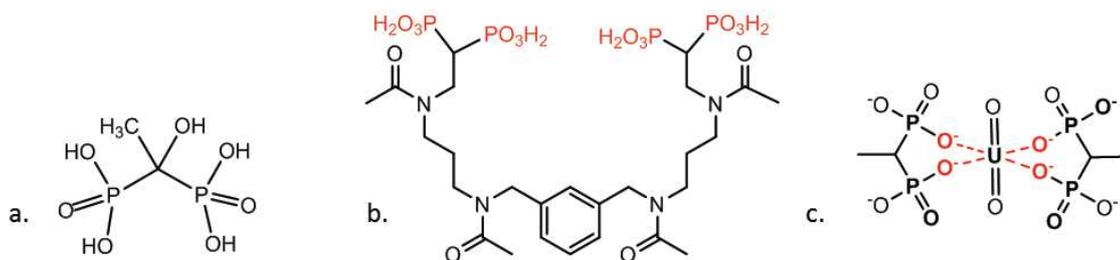


Figure 14– a. HEDP ou acide 1-hydroxyéthane-1,1'-diphosphonique ; b. Dipode biphosphonate développée par Sawicki *et al.*⁸⁰ c. Environnement de coordination de l'uranyle par formation d'un complexe uranyle-biphosphonate.

Dérivés de sidérophores

Des dérivés de sidérophores (composés organiques naturels complexant le fer chez certaines bactéries) porteurs de fonctions hydroxypyridinate ou catécholates ont été développés et étudiés par K. Raymond, P. Durbin et R. Abergel.^{81,82} Parmi l'ensemble des molécules testées, soit plus de 60 composés, 3 se sont avérés pertinents pour la décorporation de l'uranium chez le rat (figure 15). Le 5-LICAM(S) serait principalement efficace pour éviter le dépôt d'uranyle au niveau des os tandis que les composés 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et 5-LIO(Me-3,2-HOPO) seraient principalement efficaces au niveau rénal. Des études précliniques animales ont par ailleurs été réalisées sur les deux derniers composés, indiquant que leurs toxicités respectives étaient faibles. Des études complémentaires sont cependant nécessaires avant de pouvoir autoriser la mise sur le marché de ce traitement.

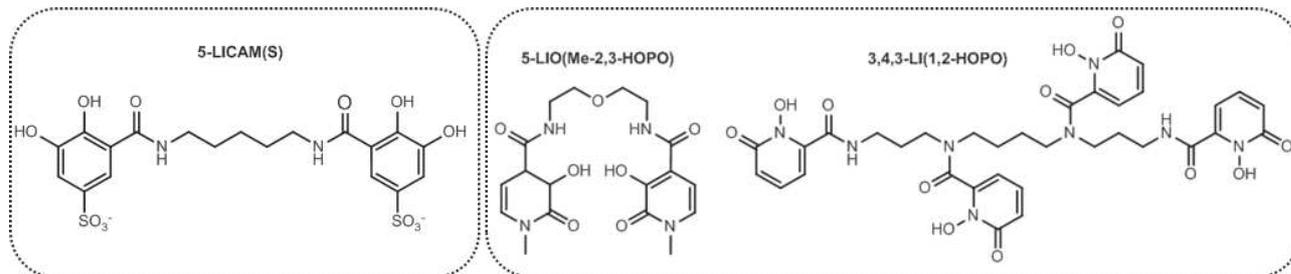


Figure 15 – Les molécules 5-LICAM(S), 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et 5-LIO(Me-3,2-HOPO) permettraient de décorporer l'uranium des os et des reins en cas de contamination aiguë.^{81,82}

En résumé, des bibliothèques de molécules ont été développées à la recherche de nouvelles thérapeutiques pour décorporer l'uranium en cas de contamination aiguë. Une grande majorité des molécules se sont avérées toxiques pour l'organisme et, parmi celles qui ne sont *a priori* pas toxiques, seules quelques-unes ont effectivement la possibilité d'augmenter l'élimination de l'uranium *in vivo* chez l'animal. Malgré les avancées significatives réalisées au cours des dernières décennies, la conception d'agents thérapeutiques spécifiques constitue une démarche longue et incertaine. Aucun agent décorporant spécifique à l'uranium n'est aujourd'hui disponible et en cas de contamination aiguë, le bicarbonate de sodium est le seul traitement approuvé malgré son efficacité relative.

1.4. Conclusion

Du fait de son origine naturelle et de son exploitation anthropogénique, l'uranium se retrouve en concentrations variables dans les différents compartiments de la géosphère. Les voies de contamination des êtres vivants, et plus spécifiquement des êtres humains, sont multiples : ingestion, inhalation, contact cutané ou subcutané.

Faible radiotoxique, l'uranium est en revanche un toxique chimique avéré qui cible principalement les reins et les os. Les traitements de décontamination actuels sont relativement efficaces dans le cas d'intoxication aiguë, pour protéger les reins. Cependant, ils ne permettent pas d'augmenter la résorption de l'uranium à partir de la matrice osseuse. Les mécanismes de toxicité induits par la présence d'uranium *in vivo* dépendent en grande partie de la biodisponibilité de l'élément et donc de sa spéciation en un milieu donné. L'uranyle UO_2^{2+} est la forme chimique de l'uranium la plus mobile et la plus stable. C'est celle que l'on retrouve en milieux aqueux, physiologiques et biologiques.

Deux types de ligands majoritaires présents *in vivo* ont été identifiés : les ligands de faibles poids moléculaires et les protéines. Certaines protéines sont responsables de la rétention, du transport et la

distribution de métaux, qu'ils soient endogènes ou non. Une meilleure compréhension des interactions entre l'uranyle et certaines protéines cibles, notamment au niveau des organes cibles, permettrait en partie d'interpréter les mécanismes de toxicité de l'uranium et de développer de nouveaux traitements appropriés en cas de contamination à l'uranium.

2 Interactions uranyle-protéines

L'étude des interactions uranyle-protéines nécessite, d'une part, d'identifier les cibles protéiques spécifiques de ce métal, et, d'autre part, d'avoir des méthodes adaptées à l'étude des complexes qu'elles forment avec l'uranyle.

2.1 Identification des protéines cibles

Deux types d'approches ont été envisagées pour identifier les protéines cibles de l'uranyle : *in silico* (par bio-informatique), ou *in vitro* (par études expérimentales).⁵⁵

2.1.1 Criblage *in silico*

Les données structurales des protéines sont de plus en plus nombreuses : plus de 120 000 structures de protéines aujourd'hui disponibles dans la base de données PDB (Protein Data Bank). L'uranyle est parfois utilisé pour le phasage dans la résolution de structures protéiques par rayons X. Van Horn et Huang ont mené une étude sur les quelques structures contenant de l'uranyle, de façon à déterminer par quelles fonctions le cation était complexé.¹³ La plupart des structures protéiques au sein desquelles se trouve l'uranyle montrent un environnement du métal par des résidus acides tels des aspartate et des glutamates en première sphère de coordination, ce qui est en accord avec ce que prévoit la théorie HSAB. Ces résidus sont à une distance inférieure à 3.2 Å. Des acides aminés comme l'histidine, qui porte un groupement imidazole ayant la possibilité de former une liaison hydrogène avec l'uranyle intervient plutôt en deuxième sphère de coordination, à une distance supérieure à 3.2 Å. L'étude de l'environnement de l'uranyle au sein des structures PDB a permis de conclure qu'il n'y avait aucune séquence spécifique plus favorable à la chélation du dioxocation. Il semblerait que l'uranyle puisse être complexé par toute molécule disposée à lui présenter des ligands porteurs d'oxygènes donneurs dans son plan équatorial.

La bio-informatique fait appel aux bases de données structurales pour développer des algorithmes de criblage qui permettent de discriminer des sites putatifs d'interaction provenant de structures existantes à partir de paramètres géométriques identifiés. Pible *et al.* ont réalisé une étude statistique à partir des données structurales relatives à l'uranyle disponibles dans deux bases de données : structures protéiques issues de la PDB et structures de complexes issue de la CSD (Cambridge Structural Database). Cette étude a défini un ensemble de critères géométriques et énergétiques importants pour

la complexation de l'uranyle : nature des acides aminés, possibilité de rotation des chaînes latérales, géométrie du site de liaison, distances inter-atomes. Un algorithme de criblage a ainsi été développé afin de sonder un grand nombre de structures de la PDB ayant les caractéristiques de structures protéiques natives à l'aide des critères géométriques et énergétiques définis au préalable (figure 16).⁸³

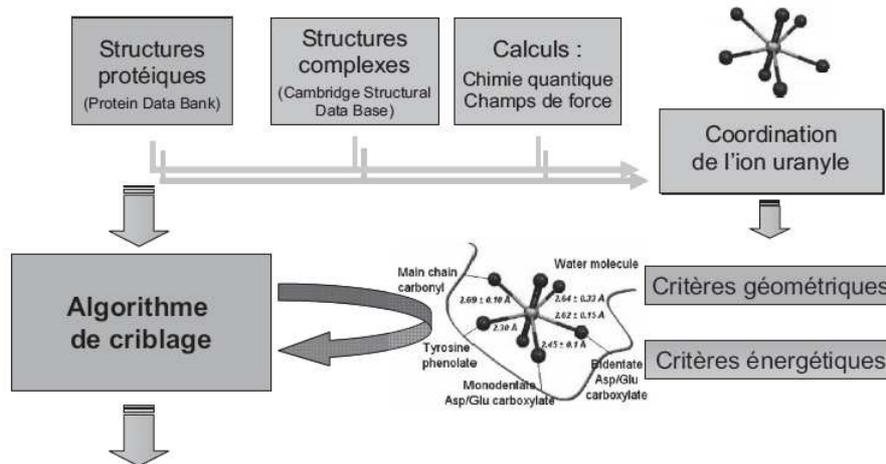


Figure 16 - Stratégie de criblage *in silico*. D'après Pible et al. Source : Vidaud et Hagège.⁸⁴

Parmi toutes les protéines cibles identifiées à l'aide de cet algorithme, la CRP « *C-Reactive Protein* » a été sélectionnée pour valider expérimentalement la méthode de criblage. La CRP présente plusieurs sites de liaisons dont un pour le calcium et un pour la phosphocholine. La phosphocholine ne se fixe qu'au complexe CRP-calcium. Le potentiel site de complexation de l'uranyle a été identifié par l'algorithme à proximité du site de liaison du calcium. Une étude *in vitro* a confirmé que la protéine complexe l'uranyle au niveau du site de liaison identifié, avec une affinité environ 100 fois supérieure à celle du calcium, ce qui a permis de valider l'algorithme. La géométrie et la taille de l'uranyle sont telles que la fixation du métal impacte la géométrie du site à calcium situé à proximité et inhibe la fonction de la protéine en prévenant la complexation de la phosphocholine.⁸⁵

La bio-informatique est un outil puissant permettant de définir les caractéristiques géométriques et énergétiques nécessaires à la chélation d'un cation métallique. Elle repose toutefois sur l'existence de structures de protéines entières déposées dans la PDB et reste donc une technique de criblage non-exhaustive, de nombreuses structures protéiques n'ayant pas encore été identifiées. Par ailleurs, des analyses expérimentales *in vitro* doivent authentifier la spécificité de l'interaction afin de valider les prédictions de cibles par l'algorithme.

2.1.2 Criblage *in vitro*

Différentes méthodes permettent d'identifier les cibles protéiques de l'uranyle *in vitro* (figure 17). Les techniques chromatographiques permettent *a priori* d'isoler les complexes métalliques provenant d'un échantillon de protéines complexe (figure 17). L'échantillon est soit incubé en présence de métal (interaction en solution, à l'équilibre), soit analysé par chromatographie d'affinité (interaction avec métal immobilisé sur support). Dans les deux cas, des méthodes de protéomique permettent d'identifier, de caractériser et de quantifier les protéines cibles de l'uranyle. Une troisième méthode, basée sur le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) a permis de mettre au point une technique de criblage individuel sans *a priori*.

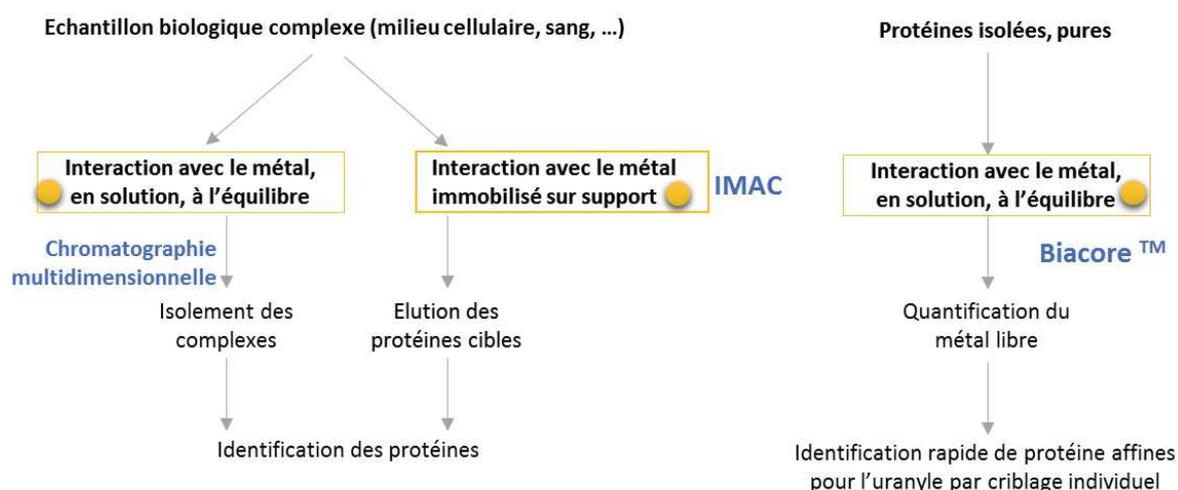


Figure 17 - Identification de cibles protéiques de l'uranyle *in vitro* dans des échantillons complexes ou par criblage individuel

Méthodes chromatographiques multidimensionnelles

Dans l'idéal, l'objectif est d'isoler un complexe protéine-uranyle à partir d'un fluide biologique (sérum, extrait cellulaire, etc) au préalable incubé en présence de métal. Suite à l'isolement de complexes protéines-métal formés *in situ*, l'analyse par spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) permet l'identification des protéines issues de ces complexes. Les principaux travaux ont été menés par l'équipe de R. Lobinski.⁸⁶⁻⁸⁸ Szyrwił *et al.* ont centrifugé un sérum bovin dans lequel les complexes uranyle-protéines étaient peu solubles.⁸⁸ L'analyse des complexes a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une technique d'analyse élémentaire ; puis par électrophorèse sur gel en conditions non dénaturantes. Finalement les bandes de gel contenant les protéines ont été digérées à l'aide d'une endopeptidase et les peptides ont été analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à la MS/MS de façon à identifier les 74 protéines issues des complexes protéine-métal isolés. Une étude de Xu *et al.* reporte l'isolement des complexes uranyle-protéines issu du cytosol

d'appareils digestifs d'écrevisses par méthode bidimensionnelle sur gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes, couplée à un détecteur élémentaire ICP-MS. Six protéines liées à l'uranyle ont été identifiées.⁸⁶

Pour simplifier le système à étudier, il est possible de préfractionner l'échantillon avant incubation du métal. Cette méthode de criblage permet de travailler sur des sous-unités du système plus simples à étudier mais nécessite de disposer de quantités suffisantes d'échantillon, et n'est donc pas applicable aux extraits cellulaires. Une étude de Vidaud *et al.* a identifié certaines protéines du sérum humain comme cibles majoritaires de l'uranyle.⁵⁹ Les échantillons ont été préfractionnés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la chromatographie à échange d'ions, avant d'être incubés avec le métal. Les analyses des fractions incubées ont été réalisées par fluorescence et par détection élémentaire. Les fractions retenant le métal ont été analysées par chromatographie bidimensionnelle sur gel avant d'être caractérisées par spectrométrie de masse de façon à connaître sa composition en protéine.

Le nombre d'études menées par chromatographie multidimensionnelle sur des échantillons complets ou préfractionnés est relativement restreint. Les échantillons sont très complexes et constitués de milliers de protéines en concentrations variables qu'il faut être capable de discriminer. Il faut également que la méthode puisse détecter et isoler le complexe protéine-uranyle, formé en faible concentration. Ce type de méthode repose par ailleurs sur l'utilisation de techniques séparatives (gel d'électrophorèse). Or la dissociation de complexes est inhérente à toute technique séparative et est fonction de la dilution, de la durée de l'analyse et des cinétiques de formation et de dissociation des complexes.⁸⁹ L'utilisation de méthodes séparatives favorise donc la dissociation de complexes protéine-uranyle qui, comme nous l'avons évoqué en section 1.1.3, est de nature non covalente. Les paramètres de séparation des complexes sont donc restreints et ne permettent parfois pas d'obtenir une résolution suffisante.

Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés

La chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) est une technique qui a été développée pour la purification de protéines recombinantes portant une étiquette 6-His. Cette technique repose sur l'affinité particulière de protéines pour un cation métallique immobilisé sur une phase stationnaire. Seules les protéines de forte affinité seront retenues par la phase stationnaire et sont ensuite éluées sélectivement.

Une méthode d'isolement de protéines cibles de l'uranyle a été mise au point par IMAC. La méthode repose sur la formation d'un complexe ternaire entre une protéine et l'uranyle lié à un groupe aminophosphonate présent sur la phase stationnaire (figure 18).

Initialement mise au point et validée sur des protéines du sérum par Basset *et al.*, elle a été employée pour identifier des protéines cibles de l'uranyle issues de cellules rénales.⁹⁰

Les limites de cette approche sont liées aux affinités même des protéines relativement à celle des phosphonates pour l'uranyle : une affinité supérieure peut entraîner une dissociation de l'équilibre phosphonate-uranyle. L'accessibilité des sites de fixation de l'uranyle dans la protéine peuvent limiter les interactions avec le métal immobilisé et des interactions protéine-protéine peuvent générer de faux positifs.

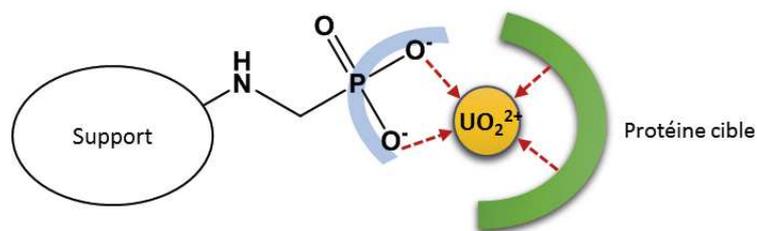
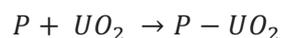


Figure 18 – Illustration de la capture de protéines affines pour l'uranyle par immobilisation d'un complexe ternaire aminophosphonate-uranyle-protéine sur support.

Criblage individuel de protéines affines pour l'uranyle

La dernière méthode utilisée pour identifier de façon systématique sans aucun *a priori* des cibles potentielles de l'uranyle repose sur l'utilisation du Biacore™, un appareil permettant de mesurer des interactions moléculaires grâce à la quantification des variations d'un signal de résonance plasmonique de surface (SPR). Un biocapteur est immobilisé de façon covalente à la surface d'une unité microfluidique où circule la molécule cible à quantifier. La variation de l'indice de réfraction générée au voisinage du biocapteur par la fixation de la molécule est directement corrélée à la quantité fixée. La conception particulière du système microfluidique permet de mesurer très précisément les variations d'indice de réfraction grâce à la variation du signal SPR. Cette méthode a été adaptée à la quantification de l'uranyle libre dans l'équilibre suivant :



Un anticorps spécifique a été développé pour reconnaître les formes libres de l'uranyle et le complexe particulier uranyle-dicarboxyphénanthroline (DCP).⁹¹ Le principe est schématisé en figure 19. Des dilutions d'une solution d'une protéine pure sont mises au contact d'une solution d'uranyle. Les solutions sont injectées à l'équilibre et l'uranyle libre est capturé par l'anticorps. L'utilisation de la DCP permet d'amplifier les variations d'indice de réfraction permettant ainsi une quantification de l'uranyle pour des gammes de concentration allant du nanomolaire au micromolaire. Cette technique a permis

de sélectionner les protéines sériques les plus affines de l'uranyle dans le sérum dont on connaît les concentrations relatives dans le sérum humain.⁷

Les avantages de cette technique sont la capacité de travailler en tampon physiologique, d'utiliser de très faibles quantités de protéines, et de disposer d'un système de quantification du métal sans déplacement des équilibres. Ses limitations sont la possible adsorption non spécifique des protéines sur les surfaces actives de l'unité microfluidique.

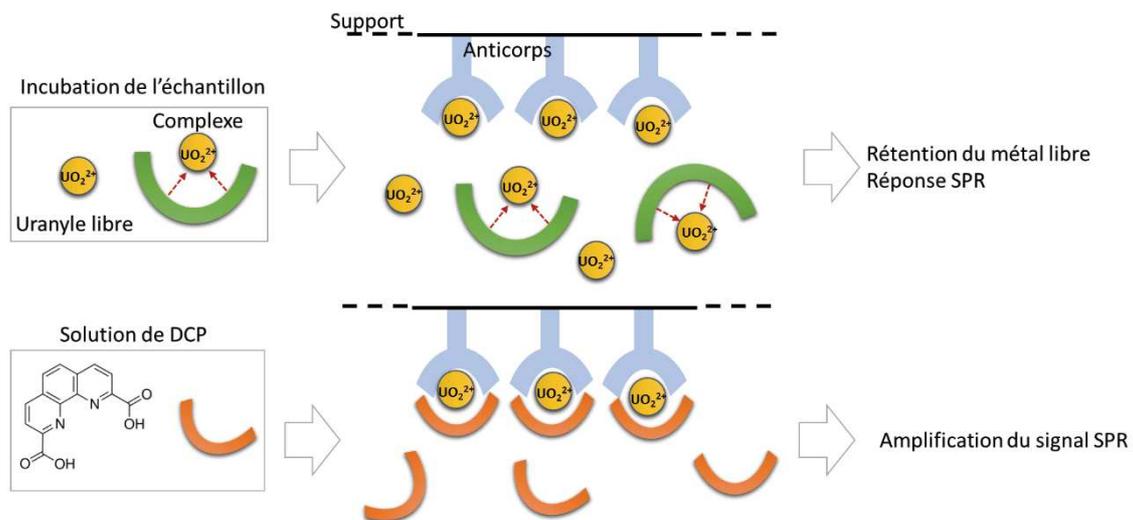


Figure 19 – Identification de protéines cibles de l'uranyle par criblage individuel en détectant l'uranyle libre par SPR après incubation du métal dans un échantillon de protéine pur. La technique développée par Averseng et al. permet de lier l'uranyle à un anticorps puis d'amplifier la réponse SPR par interaction de la DCP avec le métal immobilisé.⁹¹

En résumé, le développement de méthodes expérimentales permettant d'identifier les cibles protéiques de l'uranyle est une étape cruciale, souvent difficile à mettre en œuvre. La qualité des outils existants repose sur leur sensibilité, sur leur aptitude à identifier et à isoler le complexe formé, ou encore sur leur capacité à déterminer si la réaction de complexation est spécifique ou non. Sauf dans le cas d'une analyse SPR, ces méthodes mènent à l'identification d'un nombre important de cibles potentielles de l'uranyle qu'il est nécessaire d'étudier individuellement par la suite, notamment pour s'assurer de la spécificité de l'interaction, grâce à un ensemble des techniques adaptées à l'étude de complexe uranyle-protéine en milieu aqueux ou physiologique.

2.2 Etude de complexes uranyle-protéine en milieux aqueux et physiologique

Avant tout, il est essentiel de prendre conscience des difficultés liées à l'étude des complexes protéines-uranyle en solution, et notamment des paramètres qui sont à même de perturber la formation de ces

complexes. Les conditions expérimentales (milieu d'étude, ajout d'entités protectrices ou compétitrices) sont donc choisies avec attention.

2.2.1 Milieu d'étude

La présence de nombreuses molécules pouvant interagir avec l'uranyle (protéines et ligands de faible poids moléculaire) complique la spéciation du métal en milieu biologique.^{35,56} De nombreuses études portant sur des interactions entre une protéine et l'uranyle visent à déterminer quels sont les complexes formés et leurs constantes apparentes de formation. Ces études sont généralement réalisées dans un milieu dont la spéciation est relativement simple comme un fluide simulé dans lequel les espèces les moins pertinentes sont omises, ou un milieu aqueux. Les protéines, et plus particulièrement leurs conformations, sont sensibles à leur environnement (température, pH, force ionique, solvants etc.). Elles peuvent être dénaturées de façon irréversible, s'agréger ou précipiter si aucune précaution n'est prise. En milieu aqueux, il apparaît alors nécessaire de travailler en milieu tamponné, avec des caractéristiques le plus proche possible des conditions biologiques : pH, force ionique, composition saline. Les solutions tampons permettent d'imposer le pH d'étude et présentent des charges positives et négatives (N^+ , O^- , SO_3^-) masquant les sites chargés de la protéine afin d'éviter toute interaction protéine-protéine. Les solutions tampons utilisées sont généralement à base de Tris (ou Trizma base, 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol), pour un intervalle de pH [6,5 - 9], ou d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique) pour un intervalle de pH [6,8 - 8,2] (figure 20).

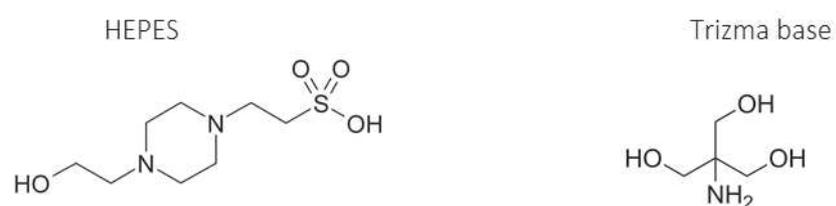


Figure 20 - Tampons utilisés pour l'étude de complexes uranyle-protéines en milieu aqueux

2.2.2 Hydrolyse de l'uranyle

Comme explicité en section 1.3.2, l'uranyle n'est que très rarement présent sous sa forme cationique libre UO_2^{2+} en milieu biologique. En milieu aqueux, il est sensible au phénomène d'hydrolyse, dès pH 3. En l'absence de toute autre molécule, l'hydrolyse domine largement la spéciation de l'uranyle. La stœchiométrie des complexes formés entre l'uranyle et les hydroxydes varie en fonction du pH et de la concentration d'uranyle. En résulte un certain manque de contrôle de la spéciation. Des diagrammes

de spéciation illustrent en figure 21 le comportement de l'uranyle en milieu aqueux non tamponné en fonction du pH, pour deux concentrations en métal différentes. A pH supérieur à 6, il existe un risque de précipitation de l'uranyle pour une concentration de 1 mM.

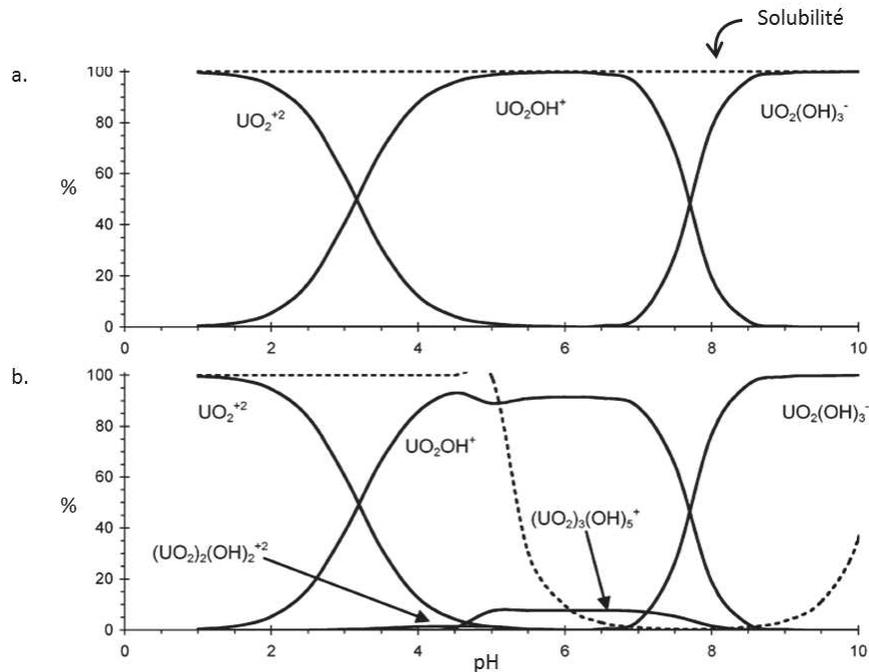


Figure 21 - Spéciation de l'uranyle en milieu aqueux non tamponné, en l'absence de ligands organiques et inorganiques. a. $[UO_2^{2+}] = 1 \mu M$ et b. $[UO_2^{2+}] = 1 mM$. La ligne en pointillée indique la solubilité des espèces formées. Source : Sutton et Burastero⁵⁶

Des ligands protecteurs permettent de retarder les phénomènes d'hydrolyse de l'uranyle, notamment à pH physiologique. Ils forment avec l'uranyle des complexes plus stables que les complexes formés par hydrolyse. Le nombre de complexes formés avec ces agents protecteurs est également plus faible. Des protecteurs comme l'IDA (acide iminodiacétique, figure 22) ou les carbonates sont utilisés. Ils contribuent au contrôle et à la simplification de la spéciation de l'uranyle en milieu aqueux, tamponné ou non.

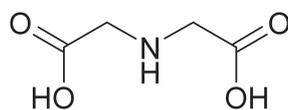


Figure 22- Acide iminodiacétique

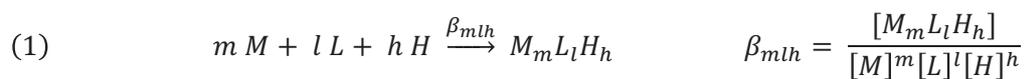
2.2.3 Equilibres de complexation et constantes de stabilité et de dissociation

Lors de la formation ou de la dissociation d'un complexe entre un métal et un ligand, différents équilibres peuvent être définis, selon que l'on considère la complexation sous sa forme globale ou

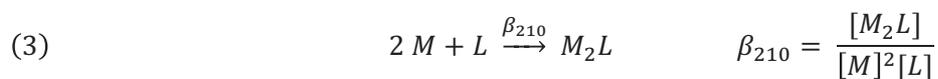
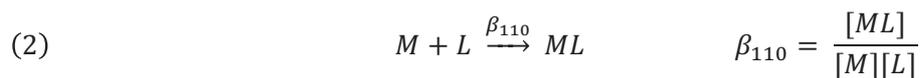
comme la suite de réactions successives. Des constantes de stabilité et de dissociation sont définies pour chacun de ces équilibres.

Constantes de stabilité globales

La réaction de formation du complexe $M_mL_lH_h$ (M pour le métal, L pour le ligand sous sa forme totalement déprotonnée et H pour le proton) conduit à la détermination de la constante de formation globale notée β_{mlh} .

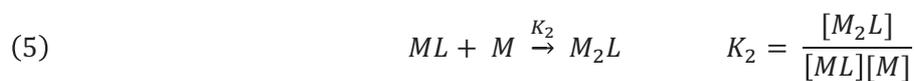
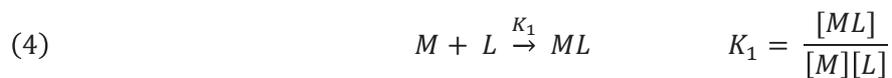


Ainsi en présence de plusieurs complexes, par exemple mono et bimétalliques, les équilibres réactionnels et les constantes globales peuvent s'écrire :



Constantes de stabilité successives

On peut également considérer des équilibres successifs, avec des constantes de formation successives, notées K_i .



Les constantes successives K et globales β_{mlh} sont reliées de la façon suivante :

$$(6) \quad K_1 = \beta_{110}$$

$$(7) \quad K_2 = \frac{\beta_{210}}{\beta_{110}}$$

Constantes de stabilité apparentes

Les constantes globales et successives définies ci-avant sont des constantes absolues qui ne dépendent pas du pH du milieu. La constante globale apparente à pH fixé est définie selon l'équation (8).

$$(8) \quad \beta_{ml}^{pH} = \frac{[M_m L_l]}{[M]^m [L]_{tot}^l}$$

$[L]_{tot}$ est la concentration en ligand libre présent sous toutes ses formes et est défini par l'équation (9).

$$(9) \quad [L]_{tot} = [L] + [LH] + [LH_2] + \dots = \sum_i [LH_i]$$

Dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1:1, la constante globale apparente à pH donné est liée à la constante globale absolue selon l'équation (10).

$$(10) \quad \beta_{11}^{pH} = \beta_{110} \times \alpha_H \quad \beta_{11}^{pH} \leq \beta_{110}$$

Le facteur α_H représente la fraction de ligand libre L sous sa forme totalement déprotonnée (équation 11). A pH donné, il est inférieur ou égal à 1, puisque tout ou partie des fonctions du ligand sont protonnées.

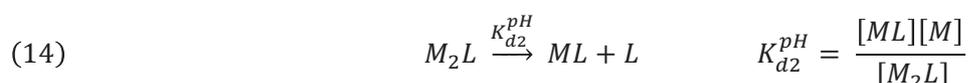
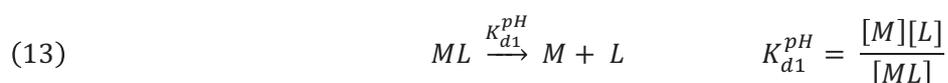
$$(11) \quad \alpha_H = \frac{[L]}{[L]_{tot}} = \frac{[L]}{[L] + [LH] + [LH_2] + \dots [LH_i]}$$

α_H^{-1} est fonction du pH et des pKa des fonctions du ligand. Il est calculé selon l'équation (12).

$$(12) \quad \alpha_H^{-1} = 1 + \frac{[H]}{K_{a1}} + \frac{[H]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \dots = 1 + \sum_i [H]^i \times \beta_{0i}$$

Constantes de dissociation successives

En biologie, les constantes de dissociation apparentes, notées K_{di}^{pH} , sont davantage utilisées. Les constantes de dissociation successives K_{di} mesurées à pH donné sont définies de la façon suivante (équations 13 et 14) :



Elles sont reliées aux constantes apparentes de complexation apparentes successives K_i par l'équation (15).

$$(15) \quad K_{di}^{pH} = \frac{1}{K_i^{pH}}$$

Les constantes de complexation ou de dissociation apparentes permettent d'établir, à pH physiologique une comparaison des cibles de l'uranyle entre elles. Les méthodes adaptées à la détermination de telles constantes doivent (i) être menées à pH fixe, ce qui est le cas en milieu tamponné, (ii) préserver l'équilibre au risque de voir les complexes formés se dissocier.

Contrôle de la spéciation par compétition et évaluation de constante apparente

Outre leur rôle de protecteur, l'IDA (acide iminodiacétique) et les carbonates peuvent également servir de compétiteurs. Une expérience de compétition entre un ligand protecteur et une protéine permet de remonter jusqu'à la constante de stabilité de la protéine. Les interactions entre l'IDA (ou les carbonates) et l'uranyle ont été largement étudiées et les constantes de complexation à pH physiologique (pH d'intérêt pour la plupart des études de complexes protéine-uranyle) sont connues (tableau 5). On notera que le nombre de complexes formés avec l'IDA est plus restreint qu'en présence de carbonates.

Tableau 5 - Constantes de stabilités globales apparentes uranyle-protecteur à pH 7.4

Système uranyle-IDA		Système uranyle-carbonates	
$\log \beta_{11}^{pH}$	7,8	$\log \beta_{11}^{pH}$	5,9
$\log \beta_{12}^{pH}$	12,2	$\log \beta_{12}^{pH}$	11,1
$\log \beta_{22}^{pH}$	21,4	$\log \beta_{13}^{pH}$	14,1
		$\log \beta_{36}^{pH}$	38,8
		$\log \beta_{21}^{pH}$	18,7
		$\log \beta_{31}^{pH}$	20,4
		$\log \beta_{116}^{pH}$	107,6

Les complexes uranyle-compétiteurs prédominants sont les complexes $[(UO_2)(IDA)_2]^{2-}$ en présence d'IDA, et $[UO_2(CO_3)_3]^{4-}$ en présence de carbonates (figure 23).

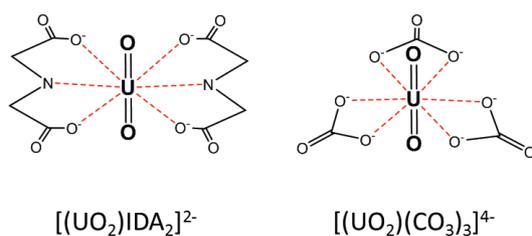


Figure 23 - Complexes prédominants à pH physiologique pour les compétiteurs IDA et carbonates

2.2.4 Méthodes de caractérisation des complexes protéine-uranyle

Les méthodes de caractérisation des complexes protéines-uranyle permettent de déterminer les stœchiométries des complexes, d'évaluer les constantes apparentes de stabilité et d'obtenir des informations structurales sur le complexe ou sur un site d'interaction spécifique. L'utilisation de ces méthodes est généralement complémentaire et nécessite de travailler sur des échantillons de protéine purifiée en amont afin de ne visualiser que l'interaction souhaitée.

Informations structurales

- Le **dichroïsme circulaire (CD)** permet d'obtenir des informations globales sur la structure de la protéine, et éventuellement à proximité du site d'interaction si une bande caractéristique est modifiée par l'interaction. Cette méthode permet de voir si la structure secondaire de la protéine est modifiée (en UV lointain, figure 24), et/ou si l'environnement des résidus aromatiques et des ponts disulfures est modifié (en UV proche).

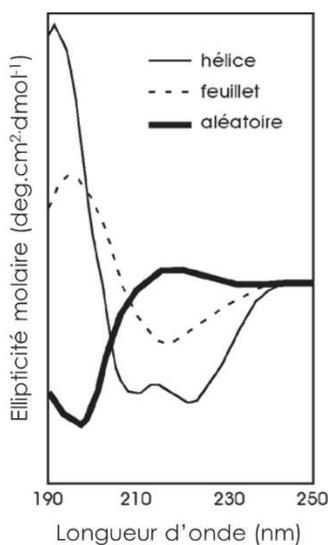


Figure 24 - Spectres dichroïques caractéristiques de structures secondaires de protéines obtenues dans la région UV-lointain. Source de l'image : <http://biochimej.univ-angers.fr>

- La **spectroscopie d'absorption des rayons X** et notamment l'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) est appropriée pour obtenir des informations sur la nature des atomes voisins de l'atome métallique U à une distance inférieure à 5 Å, ainsi que sur les distances inter-atomes au sein du site de liaison de l'uranyle à la protéine.
- La **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)** permet de caractériser l'environnement moléculaire d'un métal en observant les vibrations de liaisons chimiques (bandes caractéristiques).

- La **spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)** et la **crystallographie aux rayons X (RX)** sont des outils de choix pour obtenir des informations structurales sur la protéine en l'absence et en présence de métal. La RMN permet de travailler en solution afin de déterminer une structure tridimensionnelle et permet d'étudier la dynamique de la structure. La RX permet d'obtenir des informations sur le repliement d'une protéine et l'exposition de certains sites au solvant. Malheureusement ces techniques n'ont pas été appliquées à l'étude de complexes protéine-uranyle. La RX nécessite de cristalliser une protéine ce qui peut s'avérer parfois très difficile ; et la RMN implique l'utilisation de concentrations et volumes relativement élevés, parfois incompatibles avec les productions de protéines.

Stabilités des complexes uranyle-protéine

Dialyse à l'équilibre

- Cette méthode consiste à mettre deux compartiments au contact d'une même surface membranaire semi-perméable. L'un des compartiments contient l'échantillon protéine-métal. Le métal a la capacité de traverser la membrane alors que les protéines (complexées ou non) n'en ont pas la capacité. A l'équilibre, l'uranium est dosé afin de quantifier le métal libre. Cette méthode permet de déterminer la stœchiométrie et les constantes apparentes de stabilité des complexes. La dialyse à l'équilibre est la méthode la plus simple à mettre en œuvre. Selon la surface d'échange et le coefficient de diffusion de l'ion, l'expérience est plus ou moins longue.

L'électrophorèse capillaire d'affinité

- L'EC permet de séparer des espèces selon le ratio charge/masse. Pour des protéines ayant des masses moléculaires et un nombre de charges élevés, le ratio varie peu après complexation de l'uranyle, conférant au complexe une migration similaire à celle de la protéine seule. Scapolan *et al.* ont mis en évidence l'interaction uranyle-transferrine pour la première fois à l'aide de cette technique.⁵⁸ Couplée à un détecteur élémentaire (ICP-MS), l'EC permet d'observer la répartition de l'uranyle dans un échantillon i.e. pour une protéine pure, la quantité d'uranyle libre et la quantité d'uranyle complexé à la protéine. En présence d'un compétiteur dont les constantes de stabilité sont connues (par exemple une protéine ou des carbonates), la constante apparente de stabilité peut être déterminée. L'EC-ICP-MS présente l'avantage de ne consommer que très peu d'échantillon. Elle nécessite cependant de pouvoir déterminer les temps de migration individuels de chaque complexe protéine-uranyle et donc de disposer de protéines pures. En cas de complexe labile, si les ratios charge/masse de la protéine et du

complexe sont différents, cette technique séparative ne peut être employée car il y a une dissociation du complexe.

Les études menées grâce à des techniques séparatives permettent d'isoler le complexe uranyle-protéine et de quantifier les quantités de métal libre et complexé. Un risque de dissociation des complexes est cependant toujours présent. C'est pourquoi un grand nombre d'étude détermine les constantes apparentes de complexation en phase homogène. Les études, menées sur des solutions à l'équilibre, permettent de quantifier la formation du complexe à l'aide d'un paramètre spécifique : SPR, méthodes spectroscopiques et méthodes calorimétriques.

Méthodes en phase homogène

- L'outil Biacore® décrit en section 2.1.2 reposant sur la **résonance plasmonique de surface** permet de déterminer rapidement si une protéine est une cible potentielle de l'uranyle *in vitro* grâce à la détection de l'uranyle libre dans un échantillon de protéine préalablement incubé en présence de métal. La SPR permet également de déterminer les constantes de stabilité apparentes à partir de l' EC_{50} i.e. la concentration pour laquelle 50% de la protéine est complexée. L' EC_{50} est obtenue en analysant des échantillons pour diverses concentrations de protéine incubées avec la même quantité de métal.⁹¹
- Les **spectroscopies UV-visible et de fluorescence** sont des techniques très employées pour les protéines portant des acides aminés aromatiques capables d'absorber à des longueurs d'ondes précises (transition $\pi-\pi^*$) et d'émettre en fluorescence. En UV-Vis, les spectres obtenus avant et après ajout de métal présentent des différences : déplacement du maximum d'absorption, augmentation de l'intensité d'absorption à une longueur d'onde caractéristique de l'interaction. La spectrométrie UV-Vis a notamment été utilisée pour caractériser la bande d'absorption caractéristique du complexe transferrine-(UO_2)₂.⁶⁰ La spectrométrie de fluorescence est employée si le processus de désexcitation radiatif du fluorochrome est affecté par la complexation du métal. La fluorescence induite par laser résolue dans le temps (TRLIF) permet quant à elle de suivre les changements induits sur la fluorescence de l'uranium lors de complexation. A l'aide de logiciels informatiques, les courbes obtenues par spectrométrie UV-Vis ou en fluorescence peuvent être modélisées pour obtenir les constantes apparentes de stabilité de complexes. A noter que les études par CD permettent également d'accéder à ce type d'information.

- Les **méthodes calorimétriques** permettent d'obtenir des informations thermodynamiques sur les interactions protéine-métal. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) mesure l'absorption de chaleur due à la redistribution des liaisons non covalentes (dont les liaisons métal-ligand) lors des changements de conformation d'une protéine soumise à une augmentation de température (dénaturation). Dans le cas de la transferrine, il a été montré que la protéine se restructure peu lors de la complexation de l'uranyle.⁶¹ Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) permet de mesurer l'enthalpie et l'entropie d'une réaction. Les appareillages actuels sont suffisamment sensibles pour appliquer cette méthode à l'étude de processus d'association variés parmi lesquels le processus d'association protéine-métal. Duff et Kumar ont étudié la réaction d'association entre l'uranyle et des protéines sériques (albumine), ce qui a permis d'obtenir des informations sur la stœchiométrie des complexes formés et sur les constantes de stabilité de ces complexes.⁹²

L'ensemble des méthodes décrites ci-dessus ont permis de caractériser les complexes protéine-uranyle pour diverses protéines cibles de l'uranyle identifiées à l'aide des techniques présentées en section 2.1. Parmi ces protéines se trouvent des protéines du sérum, responsables à hauteur de 30% de la rétention d'uranyle dans le sang, et des protéines phosphorylées de l'os.

2.3 Protéines sériques

Les premières études menées sur la spéciation de l'uranyle dans un fluide sanguin ont supposé que l'albumine et la transferrine étaient les cibles majeurs de l'uranium dans le sérum.^{58,59,63} L'étude de 2013 de Basset *et al.* propose une révision de la distribution de l'uranyle parmi les 13 protéines du sérum les plus abondantes chez l'homme (figure 25).⁹³ Comme explicité en section 2.1.2, la répartition de l'uranyle a été calculée à partir des constantes apparentes et des concentrations relatives de chaque protéine. Cette étude a montré que la féтуine-A a la capacité de retenir 80% du métal et apparaît comme étant la cible majeure de l'uranyle dans le sérum, loin devant l'albumine (7 %) et la transferrine (2,4 %).⁷

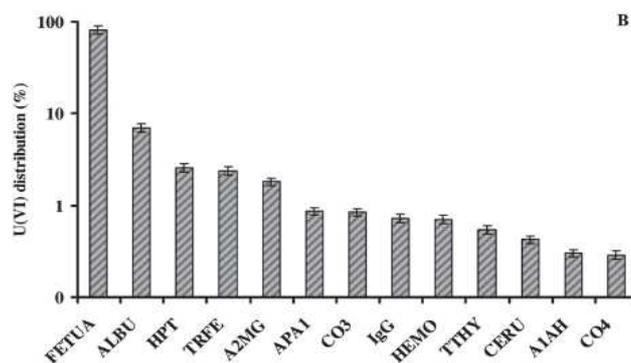


Figure 25 - Distribution de l'uranyle (%) parmi les 13 protéines sériques les plus abondantes, calculée à partir des constantes obtenues par SPR (Cl_{50}) et des concentrations relatives de chaque protéine. Source : Basset et al.⁹³ FETUA :fétuine-A ; ALBU : albumine ; HPT : haptoglobuline ; TRFE : transferrine ; A2MG : α -2-macroglobuline ; APA1 : apolipoprotéine A1 ; CO3 : complément sérum 3 ; IgG : immunoglobuline ; HEMO : hémopexine ; TTHY : transthyretine ; CERU : céruloplasmine ; A1AH : α -1-glycoprotéine ; CO4 : complément sérum 4.

2.3.1 Transferrine

La transferrine (Tf) est une protéine produite par le foie dont la séquence est constituée d'environ 700 acides aminés (679 chez l'humain) et dont le poids moléculaire est d'environ 80 kDa. Elle se structure en deux domaines, deux lobes, qui portent chacun un site de fixation du fer ferrique Fe^{3+} ($\log K_1 = 20,7$ et $\log K_2 = 19,4$).⁹⁴ Le site de fixation du fer sur le lobe N-terminal, identique à celui du lobe C-terminal, est présenté en figure 26. Deux tyrosines, un aspartate et une histidine participent à la fixation du fer.

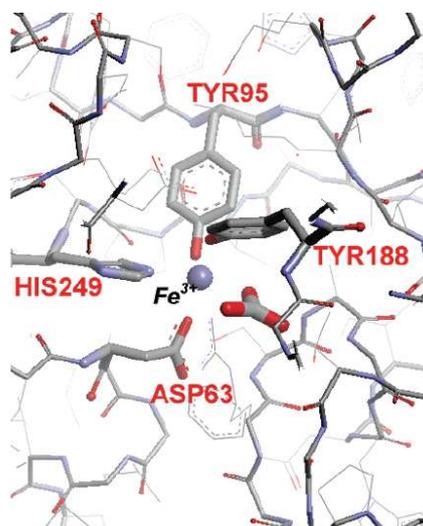


Figure 26 - Site de fixation du $Fe(III)$ dans le lobe N de la Tf. Source : Vidaud et al.⁶⁰

La transferrine assure un rôle de régulation de l'homéostasie du fer *in vivo*. Elle peut adopter plusieurs conformations, selon le nombre de cations ferriques complexés. Elle peut être non complexée (apo-Tf), former un complexe mono ferrique, ou bien former un complexe di ferrique (holo-Tf) (figure 27)

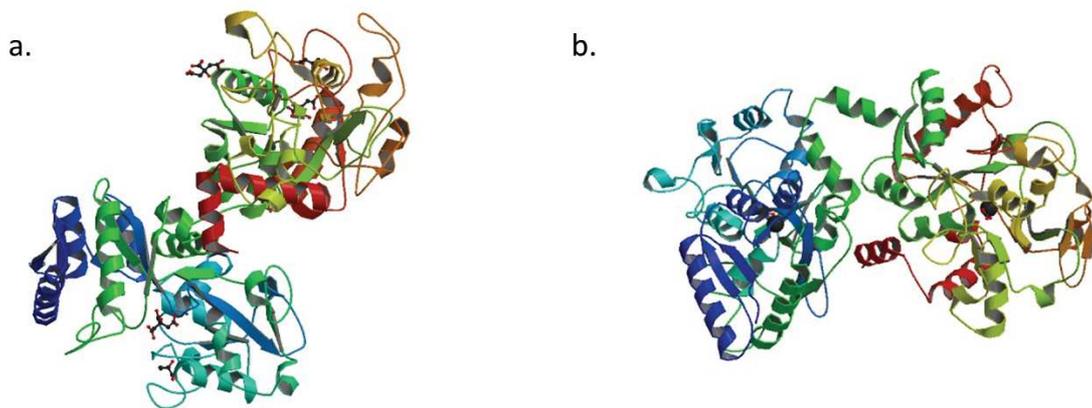


Figure 27 - Conformations adoptées par la Tf. a. apo-Tf : les deux lobes sont ouverts ; b. holo-Tf : les deux lobes se font face, cette conformation est reconnue par les récepteurs membranaires des cellules. Sources : Wally et al. et Yang et al.^{95,96}

La conformation holo-Tf est la seule à être reconnue par les récepteurs de la transferrine à la surface des cellules. Le complexe dimétallique se forme dans le sang et est internalisé dans la cellule qui est à pH plus acide (environ 5,5). Le fer est libéré *via* l'ouverture des deux lobes C et N dans le milieu cellulaire. Le récepteur ayant une forte affinité pour l'apo-Tf à pH acide, la protéine est retenue par le récepteur et transportée vers le milieu extracellulaire.^{97,98}

La Tf a également montré ses capacités à lier un grand nombre de métaux exogènes dont le Pu^{4+} qui a un rayon ionique similaire à celui du fer. Elle peut également complexer l'uranyle, sur deux sites d'interaction, l'un fort ($\log K_1 = 12,4$) et l'autre plus faible ($\log K_2 = 11,4$).⁶⁰ Des complexes ternaires protéine-uranyle-carbonate existent et sont les espèces dominantes dans le sérum ($\log K$ de 20,8 et 19,8 pour les deux sites).⁶¹ Vidaud et al. ont montré que l'holo-Tf peut retenir 0,3 à 0,4 cation/protéine alors que l'apo-Tf, libérée du fer, a la capacité de retenir 1,4 cation/protéine.⁵⁹ La conformation adoptée par la protéine lorsqu'elle complexe l'uranyle est plus proche de la conformation de l'apo-Tf que de celle de l'holo-Tf.⁶⁰ Le site du Fe(III) est organisé pour la fixation d'un cation sphérique, ce qui n'est pas le cas du cation uranyle qui présente une taille et une géométrie très particulière (figure 28). Les récepteurs situés à la surface des cellules ne reconnaissent donc pas le complexe uranyle-Tf et la Tf n'est probablement pas responsable de l'internalisation de l'uranyle dans les cellules. Ainsi, si la Tf est une des cibles protéiques de l'uranyle, elle ne peut expliquer à elle seule les mécanismes liés à sa toxicité.

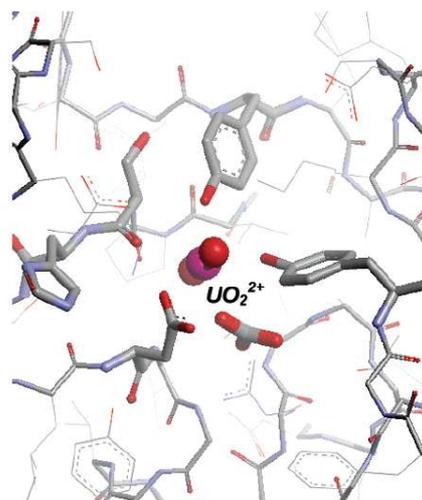


Figure 28 - Complexation de l'uranyle par le site de fixation du fer dans le lobe N de la Tf. La sphère de coordination de l'uranyle est occupée par des tyrosines et un aspartate. Source : Vidaud et al.⁶⁰

2.3.2 Albumine

L'albumine (HSA pour *human serum albumin*) est la protéine la plus abondante du sérum humain. Elle représente près de 50% des protéines sériques, sa concentration étant de l'ordre de 40 à 50 g/L. Produite dans le foie, la HSA est une protéine non glycosylée d'environ 69 kDa. Elle présente un cœur hydrophobe propice à la rétention de certains ligands et une surface hydrophile. Ses fonctions sont multiples : elle maintient la pression osmotique dans le flux sanguin, assure la rétention et le transport de nombreuses entités (acides gras, hormones, drogues, tryptophane), et assure un rôle de tampon pour le pH sanguin grâce à ses nombreuses charges négatives. La HSA est à même de complexer les ions calcium Ca^{2+} et également d'autres cations métalliques. Les interactions métal-albumine sont de nature complexe et caractérisées par la présence de plusieurs sites de complexation.

L'albumine et la transferrine ont des affinités similaires pour l'uranyle : la constante apparente de formation du complexe HSA-uranyle est évaluée à $10^{10,8}$.⁶¹ Par ailleurs, les deux protéines permettent la formation de complexes ternaire protéine-uranyle-carbonates.⁶³ La constante calculée par Montavon *et al.* est de $10^{17,7}$ pour le complexe HSA-uranyle-carbonate.⁶¹ En raison de leurs abondances respectives, l'albumine semble avoir un rôle plus important dans la rétention et le transport de l'uranyle dans le sang. Ali *et al.* ont par ailleurs montré que l'interaction uranyle-HSA pouvait avoir un impact sur la structure de la protéine, et notamment que la protéine perdait en partie sa conformation native (perte d'une partie de la conformation hélicoïdale, exposition de l'intérieur hydrophobe), ce qui suggère une éventuelle perte des propriétés initiales de la protéine.⁶²

2.3.3 Féтуine-A

La féтуine-A (α -2-HS-glycoprotéine, FETUA) a récemment été identifiée comme cible majeure de l'uranyle parmi les treize protéines les plus abondantes du sérum.⁷ La h-FETUA et la b-FETUA (formes humaine et bovine) sont des protéines glycosylées circulantes, produites principalement par le foie. Elles présentent une forte homologie de séquence. La concentration plasmatique en h-FETUA varie d'un individu à l'autre. Elle est supérieure à 1 g/L chez le fœtus et le nouveau-né puis décroît avec l'âge. Chez un adulte, sa concentration est de l'ordre de 0,4 à 0,9 g/L. Un des rôles majeurs de la FETUA est de prévenir la calcification ectopique en complexant le phosphate de calcium pour le piéger sous forme soluble.⁹⁹ Elle est également impliquée dans les processus de formation de l'os : elle représente 25% des protéines non collagéniques de l'os et participerait à sa formation en lui apportant les phosphates de calcium à la surface.

Sa structure se divise en trois domaines (figure 29). Les domaines 1 et 2 sont des domaines structurés de type cystatine, i.e. présentant une hélice α et des feuillets β antiparallèles. Ils sont plus riches en résidus acides que le troisième domaine (domaine C-terminal). Ce dernier ne présente pas de structure secondaire ou tertiaire particulière.¹⁰⁰ De poids moléculaire moyen de 48 kDa, elle peut subir des modifications post-traductionnelles qui vont induire une modification de masse moléculaire (50 à 67 kDa) : phosphorylations, sulfatations et glycosylations. Sa forme sérique est non phosphorylée à 80%.¹⁰¹ Les fonctions de la FETUA sont activées si l'un de ses trois sites phosphorylables est effectivement phosphorylé.¹⁰⁰

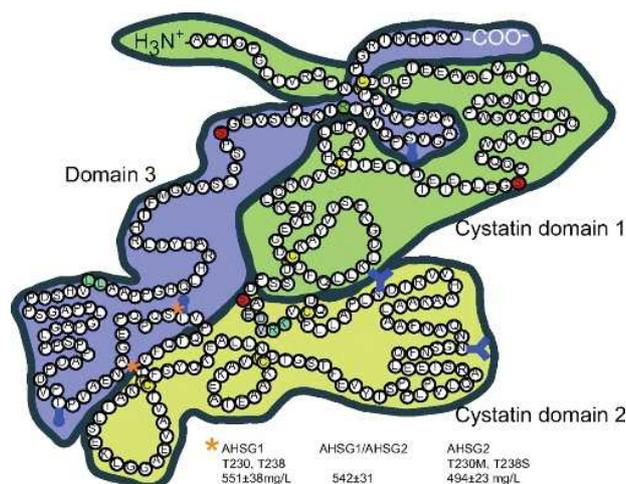


Figure 29- Représentation schématique de la FETUA¹⁰⁰

L'étude de Basset et al. indique que la constante de dissociation apparente du complexe ternaire FETUA(UO₂)(CO₃) s'élève à $K_d = 30$ nM à pH 7,4.⁷ *In vivo*, ce complexe serait prépondérant.¹⁰² Une étude

réalisée en EC-ICP-MS indique que la constante de formation apparente du complexe FETUA-UO₂ est évaluée à $K_1 = 10^{11,4}$ à pH 7,4.¹⁰² Les sites d'interaction, évalués au nombre de trois, seraient pour deux d'entre eux coopératifs et de forte affinité. La structure secondaire de la protéine est faiblement impactée lors de la chélation de l'uranyle, et le complexe conserve la fonction initiale de la protéine *in vitro* : le complexe est à même d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium. La phosphorylation de la protéine n'a pas d'impact sur la complexation du cation uranyle, les sites d'interaction ne font donc pas intervenir de fonctions phosphates *a priori*.

2.4 Protéines phosphorylées de l'os

L'os est un organe en constant remodelage dont les processus de régulation sont assurés par les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes). On distingue deux fractions dans l'os : une fraction minérale, constituée d'hydroxyapatite de calcium Ca₅(PO₄)₃(OH) et une fraction organique, constituée principalement de protéines. Ces protéines représentent 50% du volume de l'os et environ un tiers de sa masse. Elles occupent des fonctions essentielles à la formation et au maintien de la matrice. On distingue deux grands types de protéines : 90% de protéines collagéniques et 10 % de protéines non collagéniques. Parmi ces dernières, une grande variété de protéines existe : ostéocalcine, ostéonectine, ostéopontine, protéines morphogéniques, sialoprotéines et également des protéines du sérum dont la FETUA est la représentante de loin la plus abondante. Parmi les protéines non collagéniques se trouvent des protéines hyperphosphorylées se présentant comme des cibles privilégiées potentielles de l'uranyle *in vivo*, l'uranyle ayant une forte affinité pour les ligands phosphatés.

2.4.1 Ostéopontine

L'ostéopontine humaine (h-OPN) est une protéine exprimée dans les cellules de divers organes (os, reins, cerveau, tissus vasculaires, ...). Dans l'os elle est produite par les ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes, à divers stades de différenciation. Une fois sécrétée, elle se retrouve dans certains fluides comme le sang (22 à 122 µg/L pour une femme adulte), le lait (1,3 à 4,3 mg/L), l'urine ou la bile.⁷⁶ C'est par ailleurs à partir du lait de vache que la protéine bovine (b-OPN) peut être extraite et purifiée. La protéine est très conservée d'une espèce à l'autre, aussi les formes humaine et bovine sont-elles très similaires, ce qui permet de mener les études sur la forme la plus disponible (b-OPN). Les fonctions de l'OPN sont multiples :

- dans l'os elle assure une fonction structurale essentielle permettant de lier les cellules osseuses à la matrice extracellulaire ;

- produite en quantité par les lymphocytes-T activés, elle joue un rôle important en immunologie grâce à son caractère pro-inflammatoire ;
- elle permet d'inhiber la minéralisation osseuse et, d'une façon générale, elle inhibe les calcifications ectopiques comme par exemple la formation de calculs rénaux.

L'OPN est un monomère d'environ 60 kDa qui contient un grand nombre de résidus pouvant subir des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations et des phosphorylations, ce qui induit des poids moléculaires variables. Elle possède un site de clivage par la thrombine. En solution, l'OPN est une protéine intrinsèquement non structurée qui présente quelques feuillets β et hélices α . Elle adapte sa structure aux cations métalliques lors de la complexation. Une structure hypothétique a cependant été proposée à partir de sa séquence linéaire (figure 30).¹⁰³

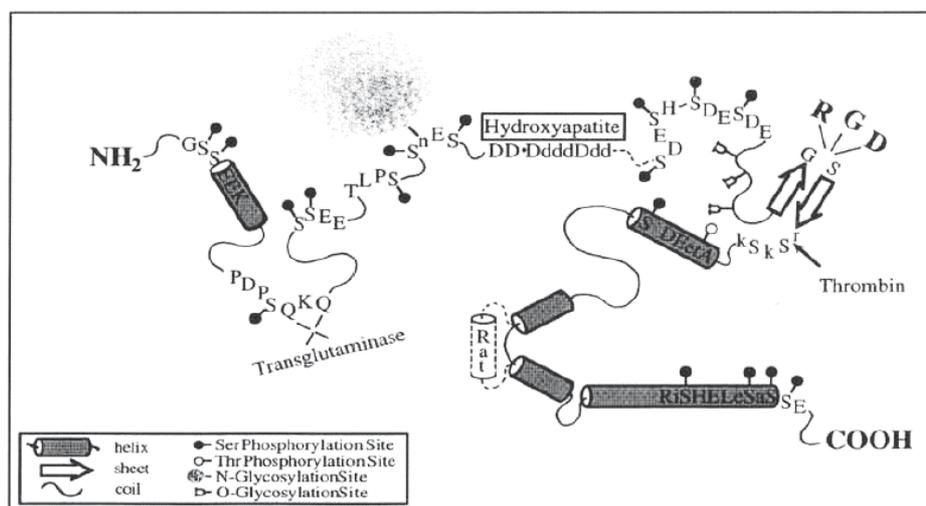


Figure 30- Structure hypothétique de la h-OPN. Source : Sodek et al.¹⁰³

Une étude menée par Klänning *et al.* a montré que la b-OPN était capable de complexer environ 10 cations Ca^{2+} avec une affinité élevée ($K_d = 35 \pm 15$ nM) et ce indépendamment du nombre de phosphorylations. En effet les sites à calcium sont identifiés comme des sites riches en aspartates et glutamates.¹⁰⁴ Qi *et al.* ont montré que la phosphorylation de l'OPN a en revanche un impact significatif sur la complexation de l'uranyle.⁸ La constante apparente de dissociation de la b-OPN est divisée par un facteur 100 suite à sa déphosphorylation ce qui indique une moindre affinité de la protéine pour l'uranyle lorsqu'elle est sous sa forme déphosphorylée : $K_D = 315 \pm 15$ nM pour la protéine déphosphorylée et $K_d = 3,2 \pm 1,3$ nM pour la protéine phosphorylée. La h-OPN et la b-OPN contiennent respectivement 26 ± 1 et 28 ± 1 sites phosphorylés et sont capables de retenir respectivement 6 et 9 cations UO_2^{2+} par protéines. Ces ratios sont maximaux, les sérines et thréonines n'étant statistiquement

pas toutes phosphorylées *in vivo*. Une étude plus récente utilise les atouts de la technique de couplage EC-ICP-MS pour déterminer l'affinité d'un fragment de la b-OPN qui est stable et possède un nombre quasiment aussi important de phosphorylations que la protéine entière (moins de 10% de phosphorylation en plus sur la protéine entière). La constante apparente de stabilité du complexe 1:1 formé avec le fragment est évaluée à $10^{11,5 \pm 0,3}$ à pH 7,4.⁶⁸

2.4.2 Ostéonectine

L'ostéonectine (ON) est une glycoprotéine dont le poids moléculaire est de 32 kDa. Sa séquence est riche en aspartates et en cystéines. L'ON se structure en trois domaines. Le domaine N-terminal (domaine 1) est un segment de 52 résidus riche en aspartates et glutamates. Le domaine C-terminal (domaine 3) est riche en cystéines et contient deux motifs « EF-hand ». Ces motifs sont constitués de deux hélices α reliées entre elle par une région flexible. Le domaine intermédiaire (domaine 2) s'apparente à une follistatine. L'ON a un rôle activateur et inhibiteur de la minéralisation de l'os et permet grâce aux interactions domaine 3 - collagène et domaine 1 - hydroxyapatite de faire le lien entre ces entités.

De même que l'OPN, l'ON peut chélater le calcium Ca^{2+} . Elle présente également un nombre important de résidus phosphorylables par modification post-traductionnelle. Plus difficile à isoler en quantité que l'OPN, cette protéine n'a pas été étudiée pour son interaction avec l'uranyle, mais est une cible protéique potentielle de l'uranyle.

2.5 Ingénierie de protéine

La majorité des sites d'interaction uranyle-protéine sont aujourd'hui encore méconnus ou difficiles à caractériser. Diverses équipes se sont interrogées sur les caractéristiques géométriques et moléculaires qui favorisent la complexation de l'uranyle. La section 2.2.1 présente l'apport de la bio-informatique et du criblage « *in silico* » dans ce processus de réflexion. L'ingénierie de protéines ou de sites de protéines permet d'étudier de façon expérimentale les relations entre la séquence, la structure et les propriétés d'un site d'interaction. Deux équipes ont proposé des mutations ciblées dans des sites de protéines initialement conçus pour chélater des cations divalents tels que le calcium ou le nickel afin de les rendre affins et sélectifs pour l'uranyle.^{105,106} Une autre équipe a proposé une protéine conçue *de novo* de façon à avoir une structure et une séquence affines pour l'uranyle, puis a induit des mutations pour améliorer les performances de complexation de la protéine.^{107,108}

2.5.1 Protéine NikR – mutation du site à Ni²⁺

NikR (nickel(II)-responsive protein) est une protéine bactérienne (*E. coli*) possédant un site de fixation pour le Ni²⁺. Cette protéine se présente sous la forme d'un tétramère en solution. Sa forme apo n'est pas en mesure d'interagir avec l'ADN, contrairement à sa forme holo. Le rôle de NikR est de réguler le système nikABCDE (système d'homéostasie du nickel). Le site de fixation du Ni²⁺ a une géométrie plan-carrée dans laquelle une cystéine et trois histidines interagissent avec le nickel. Cette géométrie plan-carrée est favorable à la complexation de l'uranyle dans son plan équatorial. Les mutations de la cystéine 95 et de l'histidine 76 en aspartates, ainsi que la mutation de la valine 72 en sérine ont permis de concevoir un site plus affiné et plus sélectif pour le cation uranyle au sein de NikR' (forme mutée) (figure 31).¹⁰⁵

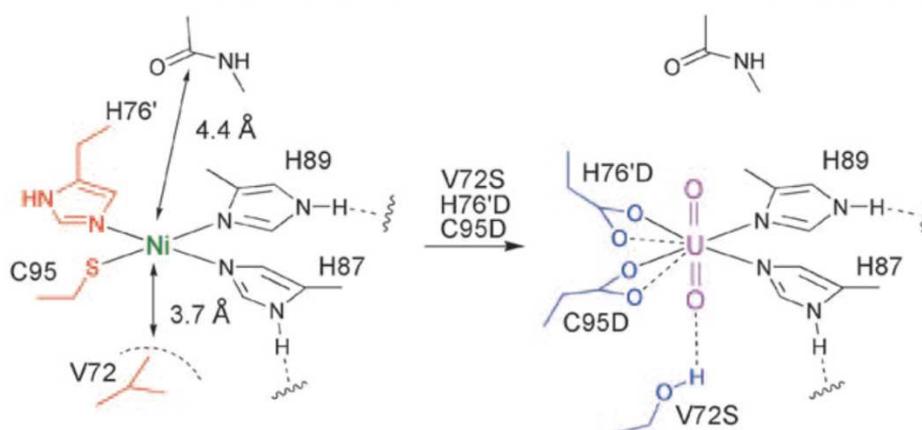


Figure 31 - Modification par mutations ciblées du site plan carré de fixation du nickel (II) sur NikR¹⁰⁵

La caractérisation du complexe uranyle-NikR' montre qu'il s'agit bien d'un complexe monométallique et la constante de dissociation du complexe est évaluée à $K_d = 53$ nM, sachant que la protéine native NikR ne complexe pas l'uranyle. Les données obtenues par EXAFS indiquent une coordination de l'uranyle par 6 atomes : 4 oxygènes (deux carboxylates bidentés provenant des deux aspartates) et deux azotes (imidazoles des histidines). La protéine mutée NikR' ne lie pas à l'ADN en l'absence de métaux, ni en présence de métaux divalents (Ni, Cu, Fe, Cd, Zn, Mn) mais peut interagir avec l'ADN après avoir complexé l'uranyle, ce qui confirme la sélectivité élevée du site muté vis-à-vis de l'uranyle.

2.5.2 CaM et motif EF-hand – mutation du site à Ca^{2+}

La calmoduline (CALcium MODULated protein, CaM) est une protéine ubiquitaire du corps humain. Elle a une affinité particulière pour les ions calcium Ca^{2+} , et lors de la formation de complexes calcium-CaM, la conformation de la protéine est modifiée, ce qui lui permet d'activer d'autres protéines. La séquence de CaM comprend 148 acides aminés, pour un poids moléculaire moyen de 17 kDa. La protéine est divisée en deux domaines, reliés entre eux par une région flexible. Chaque domaine comprend une paire de motifs EF-Hand, constitués de deux hélices α reliées entre elles par une boucle formée d'une douzaine d'acides aminés (figure 32a). Ces motifs sont responsables de la complexation du calcium *in vivo*, à raison d'un cation par motif. La constante de dissociation du premier site est évaluée à 30 μM . Le calcium est coordonné par les résidus Asp20, Asp22, Asp24, Glu31 et Tyr26 (figure 32b).

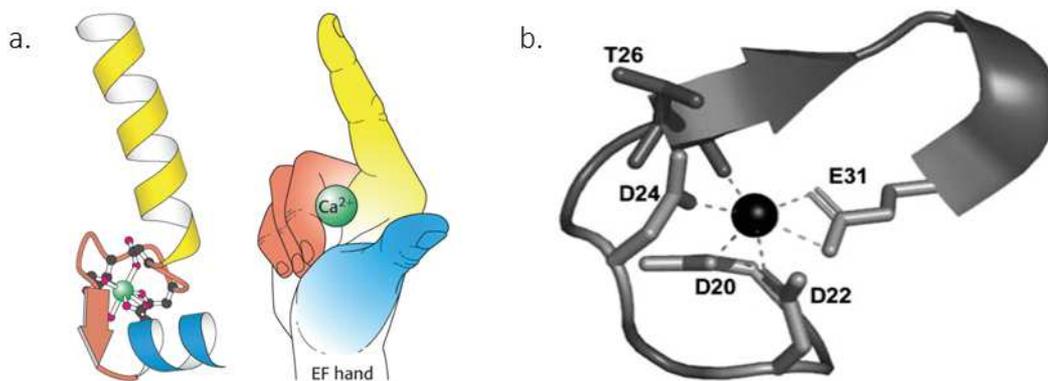


Figure 32- a. Motif EF-Hand pour la chélation du calcium. B. Site de fixation du calcium dans un peptide mime du motif EF-Hand du domaine 1 de la CaM native

Le Clainche et Vita ont synthétisé un peptide de 33 acides aminés reproduisant le motif EF-hand du domaine 1 de la CaM (figure 32). Ce peptide est à même de complexer l'uranyle de façon affine et sélective à condition de générer des mutations sur la séquence peptidique : deux aspartates aux positions 20 et 24 du peptide initialement impliqués dans la chélation du calcium sont mutés en thréonines, ce qui génère un peptide affin et sélectif pour l'uranyle.¹⁰⁶

L'étude de Pardoux *et al.* montre l'effet de la phosphorylation sur un peptide mime du domaine 1 de la protéine native au sein de laquelle le site de fixation 2 est inhibé en mutant deux aspartates en alanines. En phosphorylant la thréonine du site 1 (Thr26, voir figure 32), cela a permis d'augmenter l'affinité du site 1 pour l'uranyle, par un facteur 5 à pH 6 et 80 à pH 7. Dans le même temps, la phosphorylation n'induit pas de changement pour la complexation du calcium. Le peptide phosphorylé présente donc une sélectivité importante pour l'uranyle vis-à-vis du calcium.⁷⁶

2.5.3 Conception d'une protéine *de novo* : super binding protein

La SUP (Super Binding Protein) a été développée par Zhou *et al.* à partir d'une protéine trouvée chez la bactérie *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Cette protéine a été choisie par criblage informatique, avec l'algorithme URANTEIN. De façon analogue au programme développé par Pible *et al.*, URANTEIN a pour objectif de distinguer les sites permettant de convenir à la géométrie de coordination de l'uranyle (4 à 6 ligands dans son plan équatorial). Cet algorithme prend également en compte l'existence de résidus proches du site préétabli qui pourraient éventuellement stabiliser le complexe par formation de liaison hydrogène avec les atomes d'oxygène de l'uranyle. La protéine ciblée par l'algorithme est constituée de 3 hélices α . Fixée sur support solide, elle a été modifiée par mutations successives (Leu13Asp, Asn47Glu et His6Glu) permettant de disposer d'une protéine à l'affinité subnanomolaire à pH 6 (figure 33).¹⁰⁷

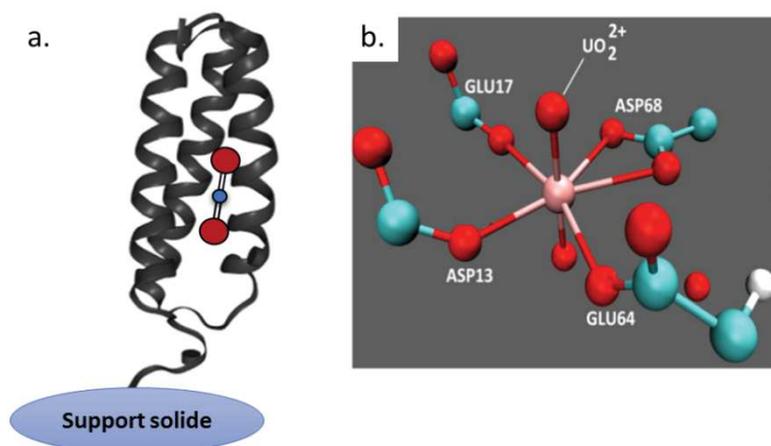


Figure 33 – a. La Super Binding Protein est constituée de trois hélices α et est fixée sur support. b. L'uranyle est complexé par des résidus acides (aspartates et glutamates). D'après : Zhou *et al.* et Odoh *et al.*^{107,108}

La présence de résidus acides dans la première sphère de coordination de l'uranyle est le facteur principal d'augmentation de la stabilité du complexe. Des simulations publiées par Odoh *et al.* montrent que l'uranyle serait effectivement entouré de 4 résidus acides dans sa première sphère de coordination (Asp68, Glu17, Glu64, Asp13, les trois derniers résultant des mutations proposées).¹⁰⁸ Deux fonctions carboxylates sont monodentes et les deux autres peuvent tour à tour prendre un caractère monodente ou bidente, impliquant 5 liaisons O—U (2.38 à 3.17 Å) dans le plan équatorial de l'uranyle. Des liaisons hydrogène H—O_{ax} quant à elles favorisent la stabilité du complexe.

2.6 Conclusion

L'uranyle interagit avec des protéines localisées dans le sérum ou au niveau des organes de dépôt. La détermination de telles cibles n'est pas évidente et nécessite la mise en place de méthodes qui ne perturbent pas l'équilibre et qui sont sensibles à la formation de complexes spécifiques. Les cibles natives suspectées ou confirmées possèdent des structures et fonctions variées. Certaines participent à l'homéostasie de métaux essentiels aux organismes (fer : Tf ; calcium : HSA, OPN). Trois d'entre elles sont potentiellement impliquées dans les processus de dépôt de l'uranium dans le squelette (FETUA, OPN, ON). L'étude d'interactions individuelles uranyle-protéine donnent accès à plusieurs types d'informations : constante apparente de stabilité, nature et stœchiométrie des complexes formés, éventuelles données structurales. Pour certaines protéines, la structure et la fonction ne sont pas affectées lors de la complexation (fétuine-A). Pour d'autres, la chélation implique un changement de structure (ostéopontine) ou une inhibition de la fonction (transferrine).

La bio-informatique a permis de rationaliser l'existence de certains sites plus favorables à la rétention d'un cation à la géométrie de coordination aussi spécifique que celle de l'uranyle. Elle a également montré sa faculté à déterminer l'existence de cibles potentielles de l'uranyle jusqu'alors non identifiées. La bio-informatique reste néanmoins dépendante de l'approvisionnement de bases de données structurales. Les études réalisées sur les sites d'interaction uranyle-protéine, qu'ils soient originaux ou créés par ingénierie, permettent de conclure que l'uranyle est essentiellement complexé par des carboxylates ou des phosphates dont le positionnement dans l'espace s'organise autour du plan équatorial de l'uranyle.

Malgré l'ensemble des informations obtenues, récapitulées dans le tableau 6 ci-après, seuls de rares sites d'interactions uranyle-protéine ont pu être identifiés. Il subsiste un nombre important d'interrogations relatives à la localisation et à la caractérisation de sites d'interaction au sein des cibles protéiques de l'uranyle. La détermination de l'environnement de coordination de l'uranyle dans de tels sites est cruciale pour comprendre les mécanismes de toxicité mis en jeu et pour développer des traitements de décorporation plus adaptés.

Tableau 6 - Etude des interactions protéines-uranyle à l'aide des méthodes décrites en section 2.2.4. HSA : albumine humaine, Tf : transferrine, FETUA : fétuine-A et OPN : ostéopontine. n représente le nombre de sites de liaison de l'uranyle sur la protéine.

Protéine	HSA	apo-Tf	FETUA	OPN phosphorylée
Références	61,62,93,102,110	60,93,61,110,102	7,68,102,68	8,68,111
UV-Vis	Augmentation de l'absorbance à 213 nm (hélices α) et 277 nm (Tyr/Trp).	Augmentation de l'absorbance à 242 nm (tyrosinates-UO ₂) n = 2.		
FLUO	Extinction Trp/Tyr n= 5 U-HSA $\log K_1^{\text{pH}} = 6,1$ U ₂ -HSA $\log K_2^{\text{pH}} = 4,8$	Extinction Trp/Tyr n= 2 U-Tf $\log K_1^{\text{pH}} = 7,7$ U ₂ -Tf $\log K_2^{\text{pH}} = 4,6$	Extinction Trp/Tyr n= 3	
TRLIF	U-HSA $\log K_1 = 10,8$	n = 2 U-Tf $\log K_1 = 12,4$ U ₂ -Tf $\log K_2 = 11,4$		
SPR	$IC_{50} = 2,8 \mu\text{M}$	$IC_{50} = 17 \mu\text{M}$	$IC_{50} = 30 \text{ nM}$	$IC_{50} = 3,6 \text{ nM}$
EC-ICP-MS			U-FETUA $\log K_1^{\text{pH}} = 11,4$	U-OPN $\log K_1^{\text{pH}} = 11,5$
CD	Perte d'une partie de la conformation en hélice α , augmentation de la bande caractéristique des feuillets β .	Structure tertiaire du complexe uranyle-Tf proche de celle de la protéine apo.	n = 3 Pas de modification de la structure secondaire.	n = 6 à 9 Structuration de la protéine lors de la complexation.
ITC	n = 2 U-HSA $\log K_1^{\text{pH}} = 7,2$ U ₂ -HSA $\log K_2^{\text{pH}} = 5,4$			
DSC		Température de dénaturation du complexe proche de celle de l'apo-Tf.		
FTIR	Interactions de l'uranyle avec des groupes amides C=O (dans le plan équatorial) et N-H (liaisons H)	Complexation de UO ₂ ²⁺ sur le site de Fe ³⁺ ; implication des tyrosinates et de l'aspartate mais pas de l'histidine.		

3 Objectifs du projet

L'objectif de ces travaux de thèse est de contribuer à la caractérisation des sites de complexation de l'uranyle au sein de cibles biomoléculaires. Parmi les protéines cibles de l'uranyle, deux retiennent plus particulièrement notre attention : la FETUA et l'OPN présentent des affinités similaires et élevées pour l'uranyle à pH physiologique, bien qu'elles aient des structures et séquences très différentes. Nous proposons deux premiers axes de recherche distincts adaptés à l'étude des sites d'interactions de l'uranyle au sein de chacune de ces deux protéines : le premier axe vise à obtenir des informations structurales sur les sites uranyle-FETUA, et le second à élucider l'impact de la phosphorylation sur l'interaction uranyle-OPN à l'aide de structures peptidiques bioinspirées. A ce jour, les constantes apparentes de stabilité obtenues pour les protéines et les peptides reposent sur l'utilisation de techniques différentes. L'idéal serait de pouvoir comparer l'ensemble des cibles à l'aide d'une seule et même technique, quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques et structurales des ligands. Le dernier axe de ce projet concerne donc la mise au point d'une méthode de compétition qui permet d'obtenir une information directe, rapide et qualitative sur l'affinité d'une cible protéique ou peptidique pour l'uranyle.

3.1 Apport d'informations structurales sur les sites d'interaction uranyle-FETUA

Le premier axe d'étude porte sur les interactions entre l'uranyle et la fétuine-A. Nous savons que cette protéine sérique possède trois sites de complexation pour ce métal mais nous ignorons où ces sites se trouvent ou encore quel est l'environnement de coordination du métal au sein de chacun de ces sites. La protéine est structurée aux deux tiers grâce à la présence de deux domaines cystatines D1 et D2, qui sont par ailleurs particulièrement riches en résidus acides. Nous proposons de tirer avantage de cette structuration et d'utiliser la RMN multidimensionnelle à haut champ pour localiser les sites d'interactions domaine-uranyle. A notre connaissance, cette technique n'a pas été utilisée pour résoudre une structure de complexe uranyle-protéine ou uranyle-site au sein d'une protéine cible. Afin de faciliter les études, les domaines D1 et D2 de la protéine ont été produits par l'équipe de Claude Vidaud, séparément et sous forme recombinante à partir de leur expression chez *E.coli*. L'objectif de cet axe du projet est d'étudier indépendamment les interactions entre ces deux domaines et l'uranyle afin d'obtenir des informations concernant la localisation des sites d'interaction de l'uranyle ainsi que son environnement de coordination (figure 34). L'ensemble de la stratégie développée et des résultats obtenus sont discutés au chapitre II.

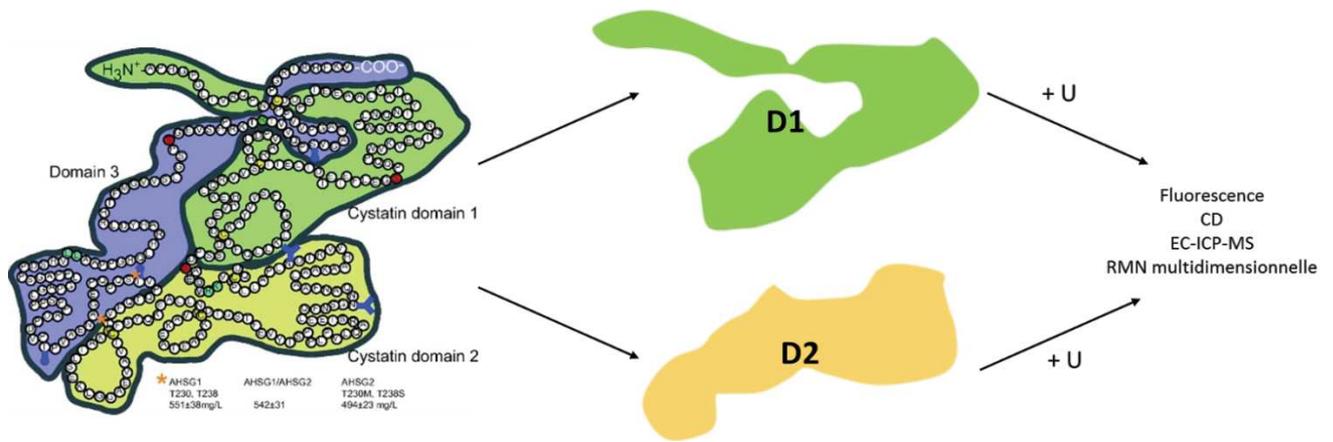


Figure 34 - Etudes des interactions uranyle-D1 et uranyle-D2 à l'aide de méthodes physico-chimiques et structurales

3.2 Approche biosinspirée pour l'étude des sites d'interactions uranyle-OPN

Le second axe d'étude du projet concerne les interactions uranyle-OPN. Cette protéine ne présente aucune structure secondaire ou tertiaire définie. Nous savons cependant que la protéine se réorganise autour de l'uranyle, au gré des complexations, et est d'autant plus affine lorsqu'elle est phosphorylée, i.e. lorsque le complexe formé implique une ou plusieurs interactions uranyle-phosphates. Les sites d'interaction uranyle-OPN sont multiples et difficiles à caractériser à l'aide des techniques structurales. La stratégie envisagée repose sur l'étude de modèles peptidiques permettant de reproduire l'environnement de coordination du métal dans cette protéine (figure 35). Le candidat de référence choisi est un cyclodécapeptide portant des résidus acides et dont la séquence peut être modulée par synthèse peptidique, de façon à étudier l'impact de phosphorylations successives sur l'interaction avec l'uranyle. Le chapitre III présente cette approche.



Figure 35 - Approche chimie bioinspirée pour mimer l'environnement de coordination de l'uranyle dans l'OPN

3.3 Méthode de compétition *in situ* suivie par fluorescence

Le troisième et dernier axe de ce projet porte sur le développement d'une méthode de compétition suivie par fluorescence. La fluorescence est une technique particulièrement intéressante pour réaliser

des compétitions *in situ* car une fois l'équilibre atteint, les complexes formés ne sont pas perturbés lors de l'analyse. De plus elle permet d'exciter un fluorochrome à une longueur d'onde caractéristique et donc de visualiser une interaction spécifique. Cette technique présente cependant des limites : une protéine ne portant pas de fluorochrome ne peut pas être étudiée par fluorescence car il y a absence de réponse, et deux cibles en compétition portant des fluorochromes identiques donnent une superposition des réponses. L'objectif de cet axe du projet est de pouvoir réaliser des compétitions entre une molécule dont on souhaite déterminer la constante apparente (une protéine, un peptide) et une sonde dont la constante apparente est connue. Nous proposons donc de mettre en œuvre une méthode basée sur un fluorophore non naturel dont la réponse en fluorescence permet de s'affranchir du signal de toute autre espèce biologique. Le compétiteur sur lequel le fluorochrome a été greffé est un analogue peptidique de l'EDTA développé au laboratoire en amont de ce projet. Le choix du fluorophore, la validation du compétiteur et les premières compétitions réalisées sont discutés au chapitre IV.

La suite du manuscrit présente l'ensemble des stratégies et approches développées ainsi que les résultats obtenus pour ces trois études.

CHAPITRE II – IDENTIFICATION DES SITES D'INTERACTION FETUA-URANYLE

Introduction au chapitre II

Ce premier axe d'étude porte sur les interactions entre l'uranyle et la fétuine-A (FETUA). Comme énoncé au chapitre I, l'étude de Basset *et al.* a montré que cette protéine sérique possède trois sites de complexation pour l'uranyle.⁷ Les trois sites n'ont pas été identifiés à ce jour et de nombreuses interrogations persistent quant à leur localisation dans la protéine et quant à l'environnement de coordination du métal au sein de chacun de ces sites.

Les protéines sont étudiées en biologie structurale grâce à des techniques qui permettent de résoudre une structure à l'échelle atomique comme la cristallographie des rayons X et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). La première étude de biomolécule par RMN a été réalisée en 1957 par Saunders *et al.* sur des ribonucléases.¹¹² Ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard que la première structure de protéine a été résolue par RMN en solution par l'équipe de K. Wüthrich.¹¹³ Très développée depuis lors, la RMN en solution est appréciée pour sa capacité à élucider une structure dans des conditions proches des conditions physiologiques.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Les spectromètres de RMN à haut champ ont permis de procéder à des analyses de plus en plus sensibles, avec de meilleures résolutions.¹¹⁷⁻¹²⁰ Plus de 11000 structures déterminées par RMN en solution sont disponibles sur la PDB (Protein Data Bank). La RMN à haut champ a également permis d'étudier les interactions protéines-partenaires parmi lesquelles des interactions protéine-métal.¹²¹⁻¹²⁴ A notre connaissance, la RMN n'a cependant pas été utilisée pour résoudre une structure de complexe uranyle-protéine ou uranyle-site au sein d'une protéine cible du métal.

Nous proposons d'utiliser la RMN multidimensionnelle à haut champ pour élucider les sites d'interactions uranyle-FETUA afin d'obtenir des informations sur leur localisation ainsi que sur l'environnement de coordination du métal. La première partie de ce chapitre porte sur les caractéristiques structurales connues de la FETUA et sur l'étude des interactions uranyle-FETUA *via* un rappel des expériences menées par Basset *et al.* et Huynh *et al.* Afin de faciliter les études RMN, deux des trois domaines de la protéine ont été produits séparément sous formes recombinantes par l'équipe de C. Vidaud. Le choix des systèmes et de leurs limites est discuté en deuxième partie, après une présentation du phénomène de résonance magnétique nucléaire et de son application à l'étude de protéines. Enfin les résultats obtenus et les difficultés rencontrées au cours des études des interactions domaines-uranyle par RMN et à l'aide de techniques physico chimiques usuelles sont discutés.

1 FETUA et uranyle

1.1 Rappels sur les structures des protéines

1.1.1 Structure primaire

La séquence d'une protéine – ou structure primaire – est un enchaînement de L- α -acides aminés naturels au sein d'une chaîne polypeptidique. Les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques qui relient le groupement carbonyle d'un acide aminé au groupement amine d'un autre acide aminé (figure 36). La liaison C(O)-N est plane en raison de la délocalisation des électrons dans deux formes mésomères et les atomes N, H amide, C (carbonyle) et O sont donc dans le même plan.

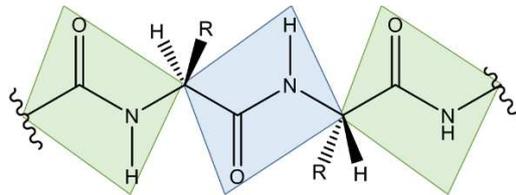


Figure 36 - Liaisons peptidiques planes dans une chaîne peptidique. Les chaînes latérales des acides aminés sont désignées par R.

1.1.2 Structures secondaires

Les chaînes polypeptidiques ont la capacité de s'organiser de façon à avoir une conformation locale bien définie et régulière. La conformation en hélice α et la conformation en feuillet β sont les deux structures secondaires préférentielles adoptées par les chaînes peptidiques, dans lesquelles des liaisons hydrogènes assurent le maintien de la structure (figure 37). Deux types de feuillets β dits antiparallèles (les plus stables) et parallèles existent et diffèrent par le réseau de liaison hydrogènes formé. Dans un feuillet β , la chaîne s'organise de façon à former une structure plane et les chaînes latérales des résidus sont orientées de part et d'autre du plan formé par la chaîne peptidique. Dans une hélice α , elles sont orientées vers l'extérieur de l'hélice.

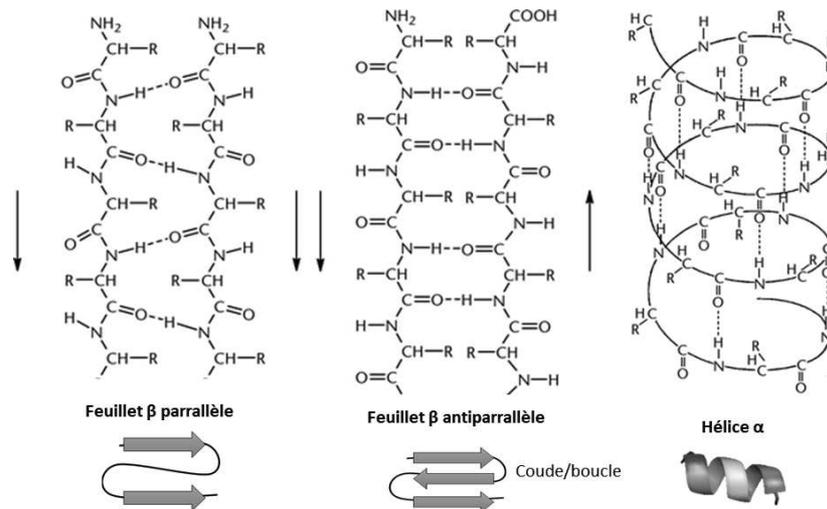


Figure 37 - Structures secondaires préférentielles adoptées par une chaîne peptidique, dans lesquelles les liaisons H (en pointillé) permettent de stabiliser ces structures secondaires. Les chaînes latérales sont désignées par le groupe R. Source : http://www.nature.com/horizon/protein folding/background/images/importance_f3.gif

1.1.3 Structure tertiaire

Les structures secondaires peuvent s'organiser les unes par rapport aux autres de façon à former la structure tertiaire (tridimensionnelle) de la protéine. La stabilité d'une structure tertiaire est associée à la présence d'un réseau d'interactions. Quatre types d'interactions peuvent aider à stabiliser la structure de la protéine : des interactions faibles (interactions de Van Der Waals et liaisons hydrogènes) et des interactions fortes (liaisons ioniques entre résidus chargés et liaisons covalentes induites par la formation de ponts disulfures entre deux cystéines) (figure 38). Les chaînes latérales hydrophobes sont généralement orientées vers l'intérieur de la structure et les chaînes latérales hydrophiles (éventuellement chargées) sont davantage exposées à la surface de la structure. La structure native d'une protéine résulte d'un équilibre entre des interactions stabilisantes et l'entropie conformationnelle liée à l'ensemble des conformations que la protéine peut adopter. Certaines protéines ne présentent cependant aucune structure tertiaire définie, même si localement quelques structures secondaires existent.

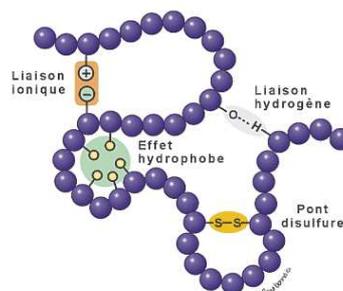


Figure 38 - Interactions faibles (liaisons hydrogènes, interactions de Van der Waals) et fortes (ponts disulfures et liaisons ioniques) favorisant la stabilité de la structure tridimensionnelle d'une protéine. Source : <http://www.cegep-ste-foy.qc.ca>

1.2 Informations structurales sur la FETUA

1.2.1 Séquence de la protéine

La séquence de la FETUA est présentée en figure 39. Elle se divise en trois domaines notés D1, D2 et D3.

```

      10      20      30      40      50
MKSLVLLLCL AQLWGCHSAP HGPGLIYRQP NDDPETEEA ALVAIDYINQ
      60      70      80      90     100
NLPWGYKHTL NQIDEVKVWP QPSPGELFEI EIDTLETTCH VLDPTPVARC
      110     120     130     140     150
SVRQLKEHAV EGDCDFQLLK LDGKFSVVYA KCDSSPDSAE DVRKVCCQCDCQCP
      160     170     180     190     200
LLAPLNDTRV VHAAKAALAA FNAQNNGSNF QLEEISRAQL VPLPPSTYVE
      210     220     230     240     250
FTVSGTDCVCA KEATEAAKCN LLAEKQYGFC KATLSEKLGCAEVAVTCTVCF
      260     270     280     290     300
QTQPVTSQPQ PEGANEAVPT PVVDPDAPPS PPLGAPGLPP AGSPDCSHVCL
      310     320     330     340     350
LAAPPGHQLH RAHFCDLRHTF MGCVVSLGSPS GEVSHPRKTR TVVQPSVGAA
      360
AGPVVPPCPG RIRHFKV
```

Figure 39 - Séquence de la h-FETUA: [1-18] peptide signal ; [19-367] chaîne. Les domaines D1 [19-137] (en vert) D2 [144-255] (en jaune) et D3 (en bleu) sont signalés, ainsi que les cystéines (en rouge) permettant la formation de ponts disulfures. Sources : www.uniprot.org, ID n° P02765

La h-FETUA et son homologue bovine, b-FETUA, présentent une forte homologie de séquence : les séquences de ces deux protéines sont similaires à 83% et identiques à 64%, d'après le logiciel LAlign utilisant l'algorithme développé en 1991 par Huang et Miller (Matrice BLOSUM 50 ; voir en annexe 2 pour plus d'informations sur le fonctionnement du logiciel LAlign).¹²⁵

1.2.2 Structure tridimensionnelle de la protéine

Yoshioka *et al.* ont montré que les domaines D1 et D2 sont structurés de façon analogue à des cystatines, des protéines qui présentent des structures tertiaires similaires, incluant des structures secondaires (hélices α , feuillets β) et des cystéines formant des ponts disulfures deux à deux (figure 40).¹²⁶

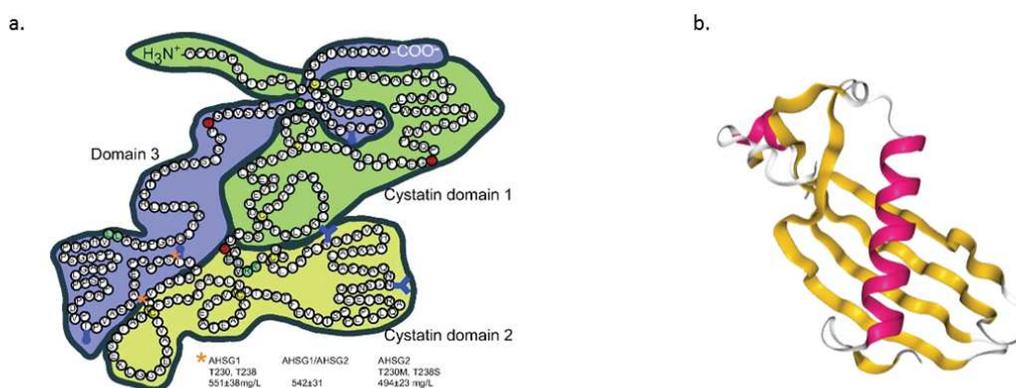


Figure 40 – a. Représentation schématique de la FETUA (Source : Jahnen-Dechent et al.¹⁰⁰). b. Structure représentative d'un domaine cystatine (structure de la cystatine humaine sous forme monomérique d'après Kolodziejczyk et al.¹²⁷). Les hélices α (rose) et les feuilletts β (jaune) sont indiqués.

Dans la FETUA, 6 ponts disulfures sont dénombrés : 2 ponts intra-domaines au domaine D1, 3 ponts intra-domaines au domaine D2 et 1 pont inter-domaines D1-D3 (figure 41)¹⁰⁰. Le dernier domaine (D3, domaine C-terminal) ne présente pas de structure secondaire ou tertiaire particulière.

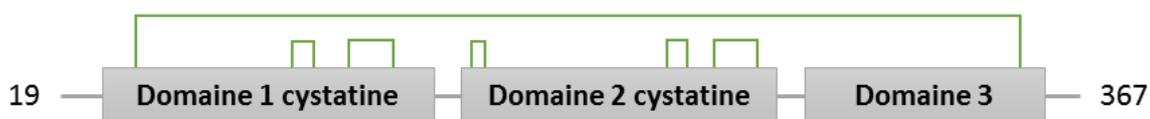


Figure 41 – Représentation schématique de l'organisation des domaines de la FETUA avec indications des ponts disulfures (en vert). D'après Jahnen-Dechent et al.¹⁰⁰

La structure de la protéine entière n'a pas été déterminée à ce jour. D'après les informations dont nous disposons, des tentatives de cristallisation de la protéine après déglycosylation enzymatique ont été effectuées mais n'ont pas été fructueuses.

1.3 Etat des connaissances sur les interactions FETUA-uranyle

Comme explicité dans le chapitre I, l'interaction FETUA-uranyle a été étudiée pour la première fois par Basset *et al.* à l'issue des criblages individuels des 13 protéines les plus abondantes du sérum humain et au calcul de la distribution de l'uranyle dans le sérum. Ce calcul montre que la FETUA lie 80% du métal mis en jeu, loin devant l'albumine et la transferrine.⁷

1.3.1 Stœchiométrie des complexes

Comme nous l'avons dans le chapitre I, la spectrométrie de fluorescence est une technique particulièrement adaptée aux molécules fluorescentes dont le processus de désexcitation est altéré lors

de la complexation du métal (phénomène d'extinction). Elle permet notamment d'avoir accès à deux types d'informations : stœchiométries des complexes et constantes apparentes de stabilité.

L'extinction de fluorescence du tryptophane, résidu naturellement présent dans la FETUA, est due à la formation d'un complexe à l'état fondamental. Le mécanisme d'extinction de la molécule est favorisé par l'effet d'atome lourd externe : l'uranyle complexé favorise le croisement inter-système ($S_1 \rightarrow T_1$) (figure 42). Le retour à l'état fondamental s'opère *via* des processus non radiatifs.¹²⁸

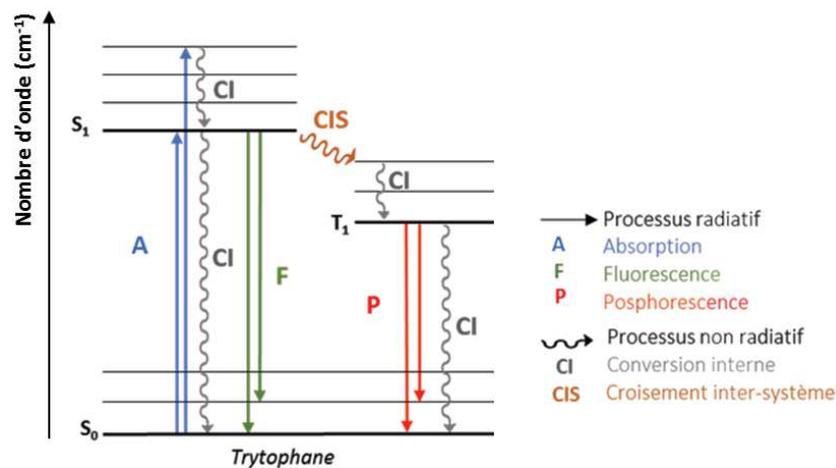


Figure 42 - Diagramme de Perrin-Jablonski du tryptophane

Les résultats obtenus par Basset *et al.* en fluorescence lors du dosage de la b-FETUA à pH 7,4 montrent que la formation des complexes d'uranyle induit une extinction de fluorescence de la protéine à 342 nm, longueur d'onde d'émission des tryptophanes (figure 43). La rupture de pente de la courbe d'extinction de fluorescence est à 3 équivalents d'uranyle, indiquant la formation de trois complexes FETUA-uranyle de stœchiométrie ML , M_2L et M_3L .

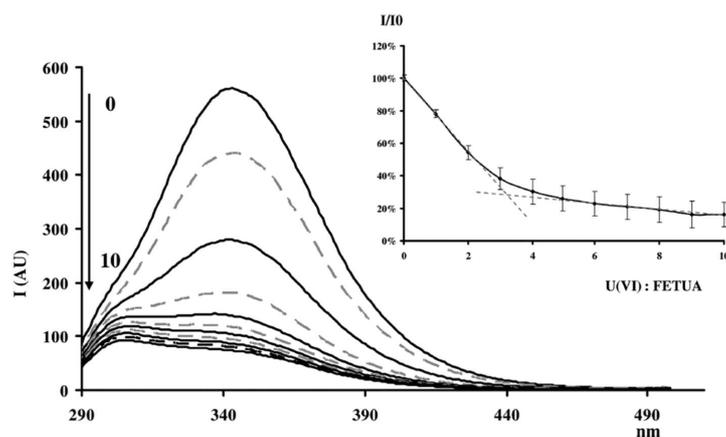


Figure 43 – Spectres d'émission de fluorescence de la FETUA (10 μ M) après excitation à 276 nm à pH 7,4 en milieu Tris 50 mM, NaCl 140 mM. L'uranyle est ajouté sous forme de solution mixte uranyle/carbonates (1/3). Encart : courbe d'extinction de fluorescence à 342 nm par normalisation de l'intensité émise (I/I_0) en fonction du ratio [uranyle]/[FETUA]. I est l'intensité de fluorescence du complexe UO_2 -FETUA et I_0 l'intensité de fluorescence initiale de la FETUA, avant ajout d'uranyle. Source : Basset *et al.*⁷

Le dosage de la b-FETUA par l'uranyle suivi par dichroïsme circulaire en UV proche montre que les bandes négatives à 255-284 nm et 224-330 nm sont impactées par l'ajout d'uranyle en solution et par la formation des complexes uranyle-FETUA (figure 44). Ces bandes caractéristiques sont les contributions des tyrosines et des ponts disulfures. L'ajout d'1 à 3 équivalents d'uranyle implique la diminution de l'ellipticité molaire de la protéine dans les deux zones caractéristiques mentionnées. L'ajout d'un 4^{ème} équivalent d'uranyle n'induit pas de modification du spectre dichroïque. Ces résultats corroborent l'existence de trois sites d'interaction et de la formation de complexes mono, di et tri métalliques.

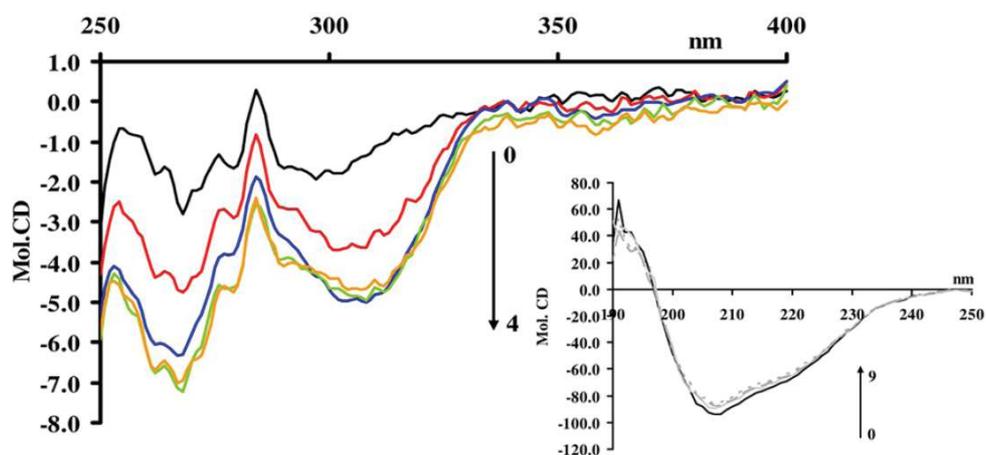


Figure 44 – Evolution des spectres dichroïques de la FETUA lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle en UV proche (en couleur) et lointain (encart). L'ellipticité molaire de la protéine (6,2 μ M) est suivie de 250 à 390 nm en UV proche pour l'ajout de 0 (en noir), 1 (en rouge), 2 (en bleu), 3 (en orange) et 4 (en vert) équivalents d'uranyle (milieu Tris 2,5 mM, NaCl 7 mM, pH 7,4). Encart : suivi de l'ellipticité molaire de la protéine (150 μ M) de 190 à 250 nm en UV lointain pour l'ajout de 0 (en noir), 3, 6 et 9 (en gris) équivalents d'uranyle (milieu Tris 50 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4). Source : Basset *et al.*⁷

1.3.2 Constantes apparentes de stabilité ou de dissociation

Basset *et al.* ont évalué la concentration pour laquelle 50% de la protéine est complexée (IC_{50}) par résonance plasmonique de surface (voir chapitre I). L' IC_{50} s'élève à 30 nM à pH 7,4 pour la FETUA. Cette valeur correspond également à la constante de dissociation du complexe ternaire FETUA(UO_2)(CO_3), l'uranium étant ajouté sous la forme d'une solution mixte UO_2^{2+}/CO_3^{2-} 1/3. Ce complexe ternaire serait prépondérant *in vivo*. En complément, une analyse réalisée en EC-ICP-MS par Huynh *et al.* indique que la constante de formation apparente K_1 du complexe FETUA(UO_2) s'élève à $10^{11,4}$ à pH 7,4.^{7,68,102}



1.3.3 Environnement de coordination du métal

D'après les travaux de Van Horn et Huong (voir chapitre I, section 2.1.1), il semblerait que l'uranyle puisse établir des liaisons de coordination avec toute molécule disposée à lui présenter des ligands porteurs d'oxygènes donneurs dans son plan équatorial. Les résidus porteurs de fonctions carboxylates, phosphates et phénolates représentent les chélateurs potentiels de l'uranyle les plus probables au sein d'une protéine.

La FETUA possède trois sites de phosphorylations et en moyenne un seul de ces sites est phosphorylé *in vivo*. L'équipe de C. Vidaud a par ailleurs confirmé que la protéine déphosphorylée ne perdait pas son affinité pour l'uranyle (données non publiées). Nous supputons donc que les aspartates, glutamates et tyrosinates de la FETUA sont responsables de la coordination du métal, bien qu'aucune preuve directe de cette hypothèse n'ait été fournie à ce jour.

1.3.4 Impact de l'uranyle sur la structure et la fonction de la protéine

La formation du complexe FETUA-uranyle est a priori sans conséquence majeure sur la structure tridimensionnelle de la protéine et sur l'une de ses fonctions principales. D'après les spectres dichroïques de la FETUA obtenus en UV lointain par Basset *et al.* (encart de la figure 44), l'uranyle n'a qu'un très faible impact sur les structures secondaires de la protéine. Un des rôles majeurs de la protéine est de complexer des nanoparticules de phosphate de calcium afin d'éviter une calcification ectopique pathologique.⁹⁹ Particulièrement impliquée dans les processus de formation de l'os, elle participerait à sa formation en lui apportant les phosphates de calcium à la surface, initiant ainsi le processus de minéralisation. L'étude menée par C. Vidaud et son équipe a montré que le complexe uranyle-FETUA conserve cette fonction de la protéine *in vitro* et est à même d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium.

En résumé, peu d'informations sont disponibles quant à l'interaction entre l'U(VI) et la FETUA. Basset *et al.* sont les premiers à avoir identifié cette protéine comme cible prépondérante de l'uranyle. Les complexes FETUA-uranyle et FETUA-uranyle-carbonates ont également été étudiés par Huynh *et al.* Les informations obtenues permettent d'établir que l'affinité de la protéine est particulièrement élevée par rapport à d'autres protéines sériques abondantes comme l'albumine ou la transferrine ($\log K_1 = 11,4$ à pH physiologique) et que le complexe formé n'entraîne ni changement de structure secondaire majeur, ni perte de fonctionnalité.

Les sites d'interactions uranyle-FETUA n'ont toutefois pas été identifiés à ce jour. Nous émettons l'hypothèse que les aspartates, glutamates et tyrosinates de la FETUA (environ 50 résidus sur 248, porteurs de fonctions carboxylates et phénolates) sont les groupes chélateurs de l'uranyle, *via* des interactions électrostatiques entre bases dures et acide dur de Lewis. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse. La RMN multidimensionnelle à haut champ peut permettre une résolution de structures de macromolécules à l'échelle atomique et ainsi donc identifier les sites d'interaction de l'uranyle dans la protéine.

2 Stratégie d'identification des sites d'interactions FETUA-uranyle par RMN

2.1 La spectroscopie RMN, une technique de choix en biologie structurale

2.1.1 Rappels sur la résonance magnétique nucléaire

Généralités

La résonance magnétique nucléaire (RMN) exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux dont le nombre quantique de spin nucléaire noté I est non nul. Soumis à un champ magnétique intense, les spins se comportent comme des dipôles, ce qui les amène à tourner autour d'eux-mêmes à une fréquence dite de Larmor qui dépend du champ appliqué et du moment gyromagnétique du noyau en question. Quelques exemples de noyaux dont le nombre quantique de spin est égal à $\frac{1}{2}$ sont présentés dans le tableau 7. Ces noyaux sont parmi les plus étudiés par RMN.

Tableau 7 - Propriétés de quelques noyaux atomiques de nombre quantique de spin $\frac{1}{2}$ détectés en spectroscopie RMN

	Moment gyromagnétique γ (rad.sec ⁻¹ . T ⁻¹)	$\gamma/2\pi$ (MHz.T ⁻¹)	Abondance Naturelle	Fréquence de Larmor (MHz) à 9,4 ou 20,1 T	
¹ H	267522000	42,576	99,98%	400,2	859,4
¹³ C	67283000	10,705	1,1 %	100,6	215,2
¹⁵ N	-27126000	-4,316	0,4 %	40,6	86,8
¹⁹ F	251662000	40,053	100%	376,5	805,1
³¹ P	108394000	17,235	100 %	162,0	346,42

Dans un échantillon, l'aimantation des noyaux est aléatoire et la résultante magnétique est nulle. En présence d'un champ magnétique statique, ces noyaux vont adopter $2I+1$ états. Pour les noyaux présentés dans le tableau 7, deux états sont possibles : soit ils s'alignent parallèlement au champ (état de spin α , énergétiquement favorable) soit de façon antiparallèle (état de spin β) (figure 45).

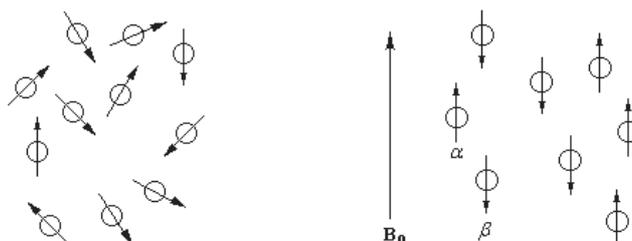


Figure 45 - Alignement des spins de façon parallèle ou antiparallèle au champ magnétique statique B_0

Lorsque l'échantillon est soumis à un second champ magnétique appliqué sous forme d'impulsions brèves, les spins basculent d'un angle θ (phase d'excitation). Après arrêt de l'impulsion, les spins reviennent à leur position d'équilibre (phase de relaxation). L'angle θ dépend de l'intensité et de la durée pendant laquelle est appliquée l'impulsion. Le mouvement de rotation des spins et leur retour à l'équilibre émet un signal électromagnétique qui est enregistré, amplifié et mathématiquement traité afin d'obtenir le spectre RMN de la molécule.

Temps de relaxation

La relaxation se décompose plus simplement en deux composantes dont les constantes de temps sont notées T_1 et T_2 . La relaxation longitudinale (T_1) est principalement liée à l'environnement moléculaire du noyau (atomes voisins). La relaxation transversale (T_2) dépend quant à elle principalement de l'homogénéité du champ intense du spectromètre et du temps de corrélation de la molécule τ_c , lui-même dépendant de la taille de la molécule. Plus T_2 est élevé, plus la largeur de raie d'un signal est faible et donc meilleure est la résolution.

Couplages scalaires et dipolaires

Deux types d'interactions entre noyaux peuvent être observés par RMN. Les interactions scalaires interviennent entre deux noyaux reliés par une ou plusieurs liaisons covalentes et donnent des informations sur la topologie de la molécule étudiée. Les constantes de couplage scalaires sont notées nJ , n étant le nombre de liaisons entre les deux noyaux considérés. Les interactions dipolaires quant à elles correspondent à des interactions dipôle-dipôle qui ne dépendent pas de la topologie de la molécule mais de la simple distance entre les noyaux. Cette interaction est due à l'effet Overhauser Nucléaire, noté NOE, qui correspond à un transfert d'aimantation dans l'espace. Notées D , les constantes de couplage dipolaires sont évaluées jusqu'à une distance maximale de 5 Å entre les noyaux.

2.1.2 Application de la spectroscopie RMN à l'étude de protéines

La mesure de contraintes géométriques comme objectif

En biologie structurale, la séquence de la protéine représente, comme explicité en section 1.1 de ce chapitre, la structure primaire de la molécule. La séquence d'une protéine est déterminable à l'aide de diverses méthodes : méthode chimique, méthode enzymatique ou spectrométrie de masse haute résolution. La RMN s'intéresse donc plutôt au repliement de la chaîne dans l'espace c'est-à-dire aux structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à leur dynamique et aux interactions protéine-partenaires.

Les paramètres suivants donnent des informations sur le repliement de la chaîne :

- distances inter-protons grâce à l'effet NOE et à la détermination de couplages dipolaires (figure 46a)
- angles dièdres ϕ et ψ grâce notamment à la mesure de constantes de couplage scalaire $^3J(\text{H}_\alpha\text{-H}_\text{N})$ (figure 46b).

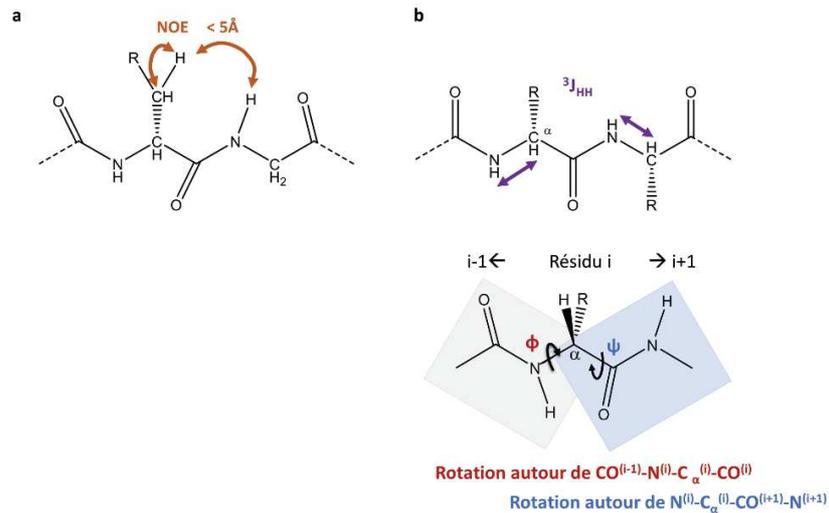


Figure 46 – La détermination de constantes de couplages scalaires J et dipolaires D (a) permet d'avoir accès aux distances entre noyaux et aux valeurs des angles dièdres (b).

Force du champ appliqué

Comme nous l'avons vu en section précédente, la relaxation transversale T_2 dépend notamment du temps de corrélation de la molécule τ_c . Les protéines sont de grosses molécules et ont donc des τ_c élevés. Or, plus le temps de corrélation de la molécule augmente, plus T_2 diminue (figure 47). Cela implique que la largeur de raie augmente et donc que la résolution spectrale diminue avec la taille de la molécule.

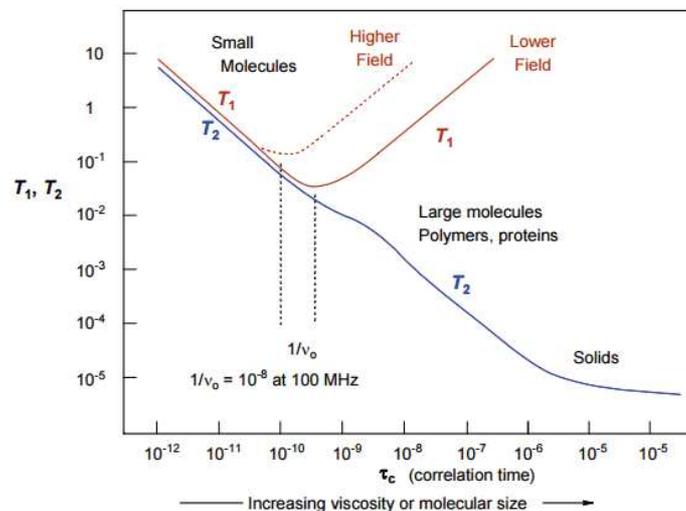


Figure 47 - Variation de T_1 et T_2 avec la taille d'une molécule. Source : Hans. J. Reich, accessible depuis <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/08-tech-01-relax.htm>

Les expériences de RMN effectuées sur des échantillons de protéines sont donc réalisées à l'aide de spectromètres à haut champ. Se placer dans des champs statiques intenses allant de 9,4 à 21,1 Tesla (environ 400 MHz à 900 MHz en fréquence de Larmor du proton ^1H) permet d'améliorer la résolution puisqu'au lieu d'avoir une plage de fréquence de 400 Hz pour 1 ppm on obtient une plage de fréquence de 900 Hz. Même si la largeur de raie n'est pas améliorée, la levée d'un certain nombre d'interférences est possible.

Par ailleurs, la sensibilité du spectromètre varie en fonction de B_0^2 . L'intensité du signal augmente donc avec la fréquence de résonance du noyau, variant elle-même en fonction du champ auquel le noyau est soumis. Ainsi le rapport signal sur bruit (S/N) augmente ce qui représente un atout en biologie structurale, la production de protéine en quantité importante pouvant s'avérer difficile.

La RMN à haut champ apporte donc résolution et sensibilité aux analyses. L'augmentation du champ magnétique des aimants RMN passant de 0,9 T (40 Mz) à des aimants supraconducteurs créant un champ supérieur à 22 T (950 MHz), a permis l'analyse de systèmes de plus en plus complexes et a contribué à l'élargissement du domaine d'application de la RMN.

Spectres à 1 dimension

Malgré l'augmentation du champ magnétique du spectromètre utilisé, la RMN du proton ne permet pas d'obtenir des spectres avec une résolution suffisante : les protéines sont constituées d'un grand nombre d'acides aminés et donc d'un très grand nombre de protons. La superposition des signaux obtenus en RMN du proton conduit à une perte importante d'information (déplacements chimiques et constantes de couplages scalaires entre protons). Le spectre ^1H de l'ubiquitine, une protéine de taille relativement faible (76 acides aminés et 8500 Da seulement) est présenté en figure 48. Ce spectre illustre parfaitement la difficulté d'étudier les protéines à l'aide d'expériences à une dimension.

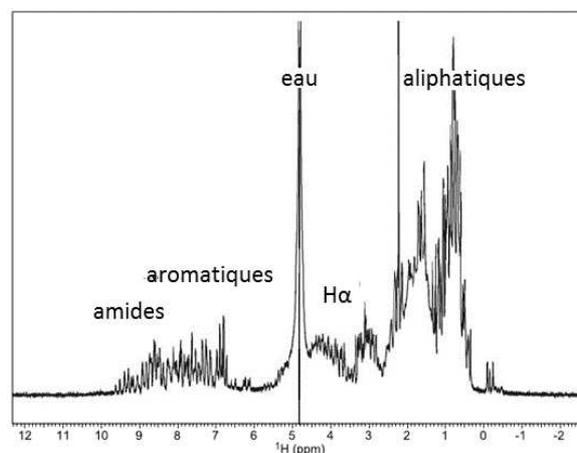


Figure 48 - Spectre RMN ^1H à 1 dimension de l'ubiquitine (solvant : 95/5 v/v $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$). Les régions caractéristiques des protons sont indiquées. Source : Breukels et al.¹¹⁶

Spectres à 2 dimensions

L'introduction d'une deuxième dimension apporte une meilleure résolution et permet la levée d'interférences. Il est possible de procéder à des expériences homonucléaires ou hétéronucléaires en fonction de l'information recherchée (tableau 8). Pour effectuer une expérience hétéronucléaire, il est nécessaire de procéder à un marquage de la protéine à l'aide d'azote ^{15}N ou de carbone ^{13}C , ces isotopes ayant un nombre quantique de spin $\frac{1}{2}$ et étant faiblement abondants à l'état naturel (voir tableau 7 en section 2.1.1).

Tableau 8 - Principales expériences bidimensionnelles

	Séquence	Noyaux	Information
Homonucléaires	TOCSY	^1H	$^3J_{\text{HH}}$
	NOESY	^1H	D_{HH}
Hétéronucléaires	HSQC	^1H et ^{15}N	$^1J_{\text{NH}}$
	C-HSQC	^1H et ^{13}C	$^1J_{\text{CH}}$

Les expériences **homonucléaires** comme la TOCSY (*total correlation spectroscopy*) ou la NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) sont respectivement utilisées pour obtenir des informations sur les couplages scalaires et dipolaires entre protons (figure 49). Une expérience TOCSY ^1H - ^1H permet d'étudier les interactions scalaires entre tous les protons d'un même résidu ($^3J_{\text{H(N)-H}\alpha}$, $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$, ...). Une expérience NOESY ^1H - ^1H permet d'étudier les interactions dipolaires entre protons distants de moins de 5 Å (D_{HH}).

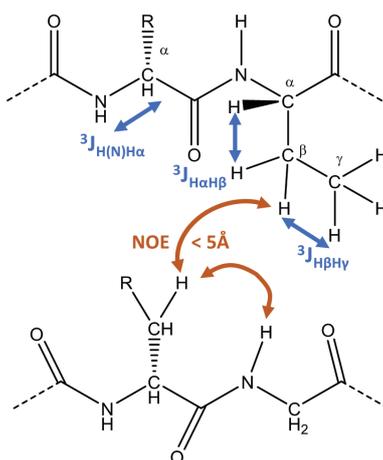


Figure 49 - Les expériences bidimensionnelles homonucléaires informent sur les couplages scalaires (TOCSY) et dipolaires (NOESY) entre deux protons.

Les spectres **hétéronucléaires** ^1H - ^{15}N de type HMQC (*heteronuclear multiple quantum correlation*) et HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) permettent d'obtenir des signaux correspondant aux corrélations proton-azote (1 seule liaison entre les deux noyaux) de liaisons peptidiques (hors Proline),

de certaines chaînes latérales (NH du tryptophane, NH₂ de la glutamine,...) et de la fonction amine N-ter (figure 50a, en rouge). Les spectres hétéronucléaires ¹H-¹³C C-HSQC, permettent quant à eux d'obtenir des signaux correspondant aux corrélations proton-carbone (1 seule liaison entre les deux noyaux) (figure 50a, en bleu).

Les expériences hétéronucléaires sont très utiles pour améliorer la résolution des spectres. Les noyaux ¹H, ¹⁵N et ¹³C ont des fréquences de résonance très différentes (tableau 7 en section 2.1.1) et leurs signaux ne se recouvrent donc pas. Par ailleurs, l'accès aux constantes de couplages hétéronucléaires ¹J entre protons et hétéroatomes voisins améliore la sensibilité de l'expérience car les constantes ¹J sont bien plus intenses que les constantes ³J entre protons en raison d'un transfert de l'aimantation des protons vers les hétéroatomes (figure 50b).

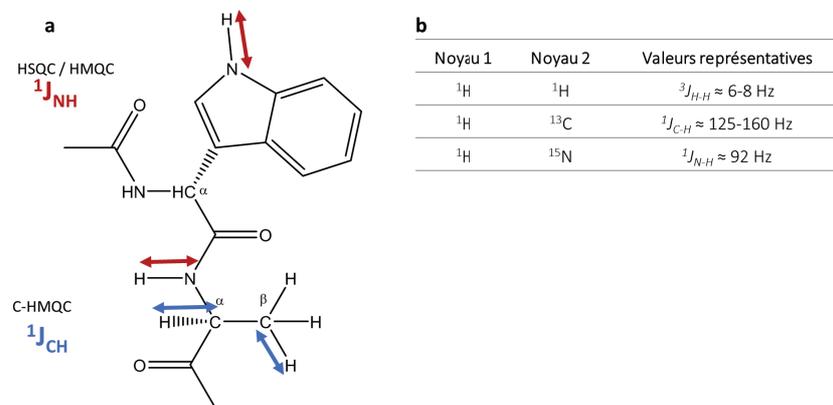


Figure 50 - Les expériences bidimensionnelles hétéronucléaires informent sur les couplages scalaires ¹J entre deux noyaux différents.

La RMN 2D ¹H-¹⁵N est particulièrement utile en biologie structurale pour sonder le squelette peptidique de la protéine et en obtenir une empreinte. Les protons amides sont en effet très sensibles à leur environnement chimique et donc à la fois à l'enchaînement de la séquence et au repliement de la chaîne dans l'espace. Par ailleurs, les HSQC ou HMQC (les HSQC sont plus résolutive et les HMQC plus sensibles) sont exploitées pour étudier des interactions protéine-partenaire (voir section 2.1.3 de ce chapitre).

Structures secondaire

Selon la structure de la molécule et la présence ou non de structures secondaires dans la molécule (hélice α et feuillet β), la signature du spectre HSQC (ou HMQC) ¹H-¹⁵N peut être radicalement différente. Le repliement d'une protéine structurée apporte une répartition des signaux facilitant la lecture du spectre 2D HSQC ¹H-¹⁵N. En figure 51 sont présentés des spectres HSQC ¹H-¹⁵N de deux

protéines dont les structures sont très différentes : l'ubiquitine qui possède une structure secondaire caractéristique (figures 51a et 51b) et une protéine intrinsèquement non structurée (figure 51c). La résolution du spectre est moins grande pour la protéine désordonnée que pour l'ubiquitine.

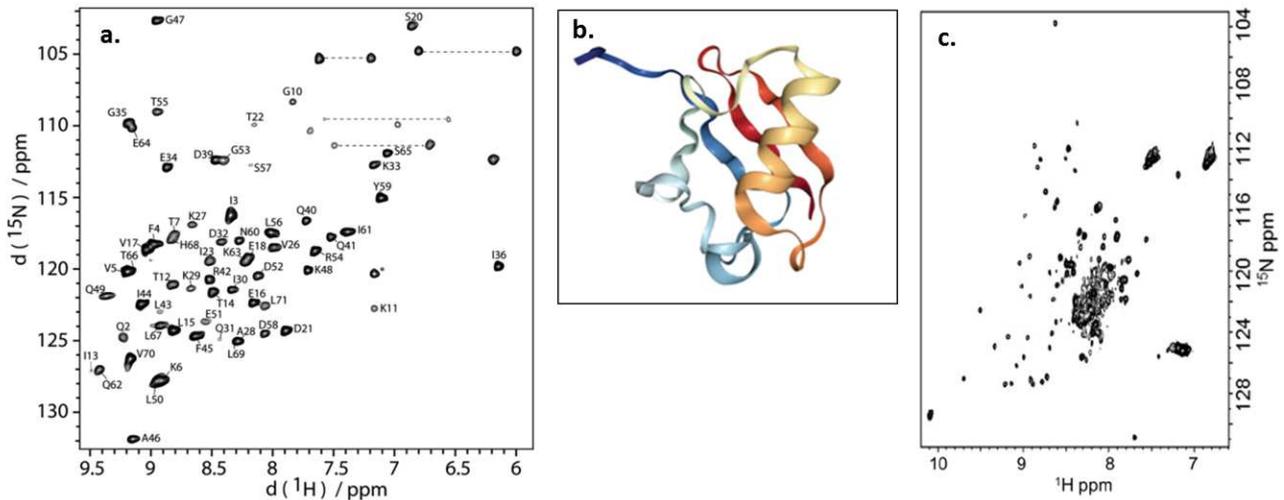


Figure 51 – a. Spectre HMQC ^1H - ^{15}N de l'ubiquitine (source : Schanda et al.¹²⁹); b. structure RX tridimensionnelle de l'ubiquitine sur laquelle on distingue la présence de structures secondaires (hélice α et feuilletts β) (source : Vijay-Kumar et al.¹³⁰); c. Spectre HMQC ^1H - ^{15}N d'une protéine intrinsèquement désordonnée avec une flexibilité de chaîne importante (source : Goda et al.¹³¹). L'absence de structure implique une moindre résolution des spectres à deux dimensions.

2.1.3 Interaction protéine-métal en RMN

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'interaction uranyle-FETUA. Lorsque l'interaction protéine-partenaire concerne un métal, deux méthodes peuvent être employées : (i) soit des spectres homonucléaires du métal et hétéronucléaires ^1H -métal sont enregistrés afin de détecter le métal directement, (ii) soit des spectres hétéronucléaires ^1H - ^{15}N sont enregistrés afin de sonder l'impact du métal sur le squelette peptidique de la protéine.

Dans le premier cas, il est nécessaire que le métal soit un noyau pouvant être étudié par RMN (spin nucléaire non nul).¹²³ C'est le cas de certains isotopes de spin nucléaire $\frac{1}{2}$ dont le cadmium ^{111}Cd et ^{113}Cd , l'argent ^{107}Ag et ^{109}Ag , le plomb ^{207}Pb ou le mercure ^{199}Hg . Des informations sur le nombre et la géométrie de coordination du métal sont obtenues. Pour certains métaux comme le ^{43}Ca et le ^{67}Zn , le nombre quantique de spin est non nul mais supérieur à $\frac{1}{2}$ ce qui diminue la sensibilité des analyses. Le cadmium ($I = \frac{1}{2}$) a notamment été proposé comme modèle pour étudier les sites métalliques de peptides β -amyloïdes pour lesquels le métal divalent d'intérêt (Zn^{2+}) peut être substitué par Cd^{2+} dont la géométrie de coordination et le rayon ionique sont similaires. Le Cd^{2+} a également remplacé certains autres métaux (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ou encore Fe^{2+}) pour étudier les sites métalliques de métalloprotéines, bien que l'utilisation de Cd^{2+} soit ici moins pertinente, ses propriétés de coordination pouvant différer de celles des cations métalliques considérés.^{123,124,132,133}

Le second cas, plus conventionnel, consiste à titrer une solution de protéine par ajout de quantités croissantes de métal. Des spectres 2D ^1H — ^{15}N HSQC (ou HMQC) sont enregistrés de façon à visualiser les variations de déplacement chimique des protons et azotes amides en raison d'une modification de leur environnement chimique. La modification du déplacement chimique peut résulter de la présence du métal à proximité du résidu (figure 52) ou d'effets indirects dus à un changement de conformation de la protéine lors de la fixation du métal. Ce type d'étude a notamment été utilisé pour étudier l'interaction entre la calmoduline (CaM) et divers cations métalliques (mono, di et trivalents).¹³⁴ Des analyses complémentaires à l'aide d'acquisition C-HSQC permettent également de sonder les chaînes latérales de la protéine en présence de métal.

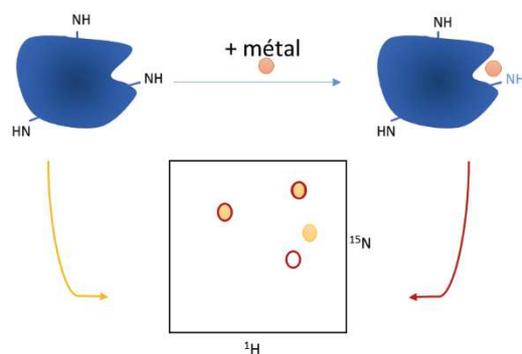


Figure 52 – Schéma illustrant l'interaction protéine-métal et la modification de l'environnement chimique du proton et de l'azote amides qui peut être détectée à l'aide d'une expérience hétéronucléaire à deux dimensions de type HSQC ou HMQC ^1H — ^{15}N . Les signaux de la protéine apo apparaissent en jaune et les signaux de la protéine métallée apparaissent cerclés de rouge.

Interaction protéine-uranyle

L' ^{238}U a un rapport gyromagnétique nul. Par ailleurs la géométrie de coordination et la taille du cation UO_2^{2+} ne permettent pas de substituer le métal par un autre en RMN. L'interaction protéine-uranyle doit donc être étudiée en sondant les corrélations ^1H - ^{15}N de la protéine.

Méthodologie

La méthodologie que nous avons appliquée pour étudier l'interaction protéine-métal en sondant l'environnement chimique des protons amides de la protéine est présentée en figure 53.

La préparation de l'échantillon correspond à l'étape de production de la protéine, généralement sous forme recombinante. Comme explicité au préalable, l'abondance isotopique naturelle en noyaux ^{15}N et ^{13}C est trop faible. Il est possible de préparer un échantillon simplement marqué (^{15}N) ou doublement marqué ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$). Pour une protéine dont les protocoles de production et de purification sont déjà au point, quelques semaines peuvent suffire. Pour une nouvelle protéine, l'adaptation du protocole de production et de purification s'avère être un processus parfois long et difficile.

Le spectre bidimensionnel HSQC ^1H - ^{15}N de la protéine est enregistré en l'absence de métal puis pour des quantités croissantes en métal. L'attribution de chaque signal à un résidu donnée réalisée à partir de la protéine apo permet d'identifier ceux dont l'environnement chimique a évolué lors de la complexation. Pour compléter ces résultats, la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine permet de visualiser le site de fixation du métal au sein de la protéine.

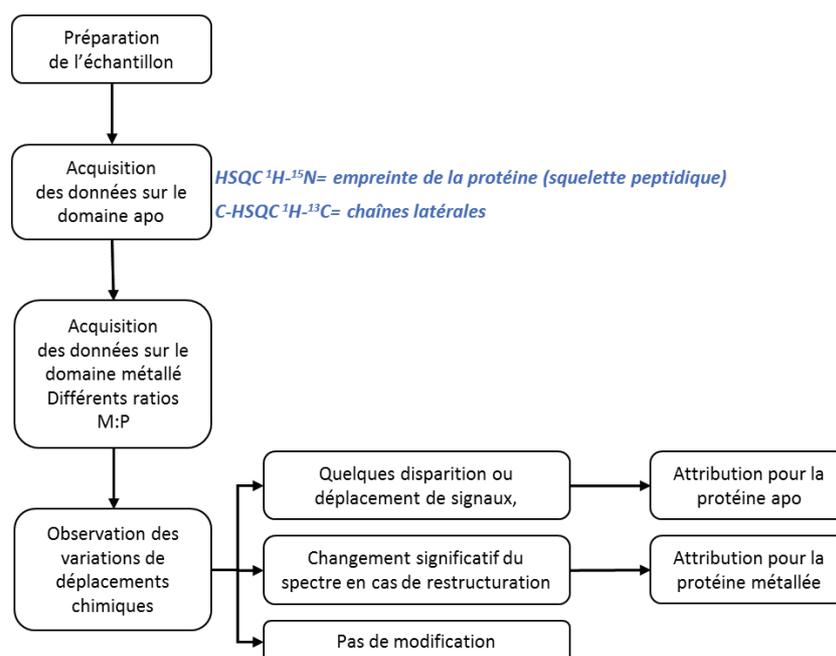


Figure 53 - Etude de l'interaction protéine-métal par RMN en solution

2.1.4 Détermination de structure protéique par RMN

Pour déterminer la structure d'une protéine de poids moléculaire inférieur à 30 kDa, il est nécessaire de disposer de contraintes géométriques et énergétiques. Les contraintes géométriques sont les contraintes de distance et les angles dièdres déterminés à l'aide de la RMN (voir section 2.1.2). On qualifie la structure comme étant très bien définie si plus de 12 contraintes géométriques ont été appliquées par résidu. Il est cependant généralement difficile d'attribuer le même nombre de contraintes à tous les résidus (mobilité interne plus ou moins grande, effets NOE plus ou moins marqués,...). À partir d'une conformation aléatoire de la molécule, à laquelle on ajoute progressivement les contraintes pour induire son repliement, une structure 3D est construite. Ce processus est répété à partir de plusieurs conformations initiales différentes. Un ensemble de conformations proches convergent vers une solution sans toutefois parvenir à une structure unique (figure 54). La durée du processus de détermination de structure varie d'une protéine à l'autre et peut être très longue, allant

de quelques semaines à plus d'un an, en fonction de divers paramètres : facilité de production de la protéine, taille de la molécule, difficultés d'attribution, etc (figure 55).^{116,120}



Figure 54 - Ensemble de conformations de l'ubiquitine calculées à partir d'une étude RMN multidimensionnelle à haut champ de la protéine. Source : Cornilescu et al.¹³⁵

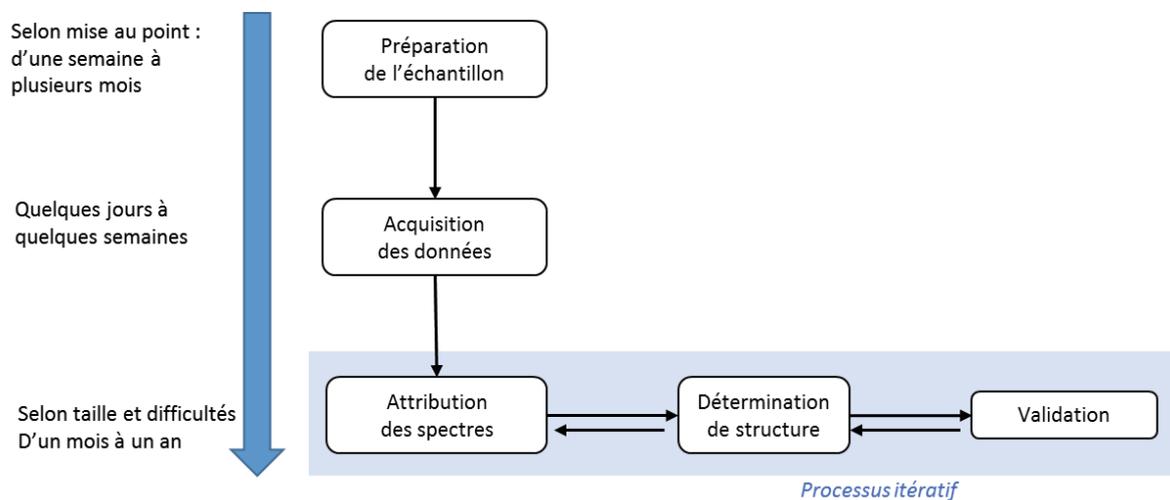


Figure 55 - Processus de détermination de structures protéiques par RMN en solution. D'après Breukels et al.¹¹⁶

2.1.5 Avantages et inconvénients de la RMN par rapport à la cristallographie des RX

Un des intérêts majeurs de la RMN réside dans le fait que l'échantillon de protéine est en solution, contrairement à la cristallographie des rayons X qui nécessite d'obtenir des cristaux, ce qui peut s'avérer très difficile en raison de divers facteurs : micro-hétérogénéités de séquence, micro-hétérogénéités conformationnelles, modifications post-traductionnelles partielles ou non hétérogènes, présence d'impuretés, etc. Le travail en solution facilite par ailleurs l'étude de la protéine dans des conditions proches des conditions physiologiques (pH, température) qui favorisent l'obtention de données sur la dynamique des protéines, informations inaccessible par cristallographie des RX.¹²⁰

Les inconvénients majeurs de la RMN sont liés à l'échantillon en lui-même et à sa préparation. Il est nécessaire de disposer d'échantillons purs en quantités suffisantes, la concentration optimale à obtenir allant de quelques centaines de μM à 1 mM, ce qui n'est pas toujours compatible avec la solubilité de la protéine et les rendements de production. Par ailleurs, le marquage des protéines est conseillé voire

indispensable en fonction de la taille de la molécule et du nombre de résidus dans la séquence. Il apparait donc nécessaire de procéder à la production de protéines recombinantes sous forme marquée, ce qui peut être très onéreux selon les organismes de production sélectionnés pour obtenir la protéine (eucaryote ou procaryote). L'idéal revient à travailler sur des systèmes de petite à moyenne taille et préférentiellement structurés. Comme nous l'avons vu en section 2.1.2, il est en effet plus aisé d'étudier une protéine bien structurée permettant d'avoir une résolution plus importante. Il est cependant possible d'étudier des protéines partiellement voire totalement déstructurées : il s'agit de l'un des aspects de la RMN les plus développés aujourd'hui.^{119,124}

2.2 Etude RMN des interactions FETUA-uranyle : quels systèmes étudier ?

2.2.1 Choix des domaines

Réduire la taille du système

La FETUA a une séquence d'environ 350 résidus et un poids moléculaire de 48 kDa. Une molécule de telle taille est difficile à étudier par RMN, mais son organisation en trois domaines plus petits bien identifiés (voir figure 40 en section 1 de ce chapitre) est idéale pour réduire la taille du système à étudier. Ces domaines contiennent un nombre de résidus similaire et des poids moléculaires moyens relativement proches (environ 11 à 13 kDa) et sont donc plus adaptés à une étude par RMN. Les séquences des trois domaines sont données en figure 56.

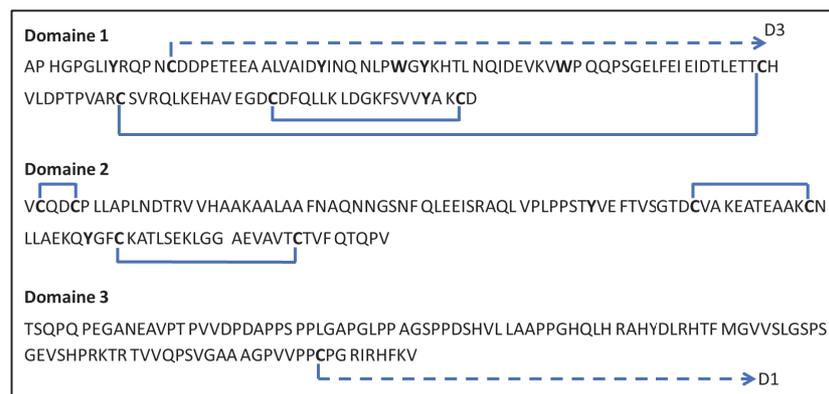


Figure 56 - Séquences linéaires des domaines D1 (115 résidus), D2 (111 résidus) et D3 (112 résidus) issus de la h-FETUA. Les ponts disulfures apparaissent en bleu. D'après Jahnen-Dechent et al.¹⁰⁰

Le choix des séquences de D1 et D2 est basé sur l'étude de Jahnen-Dechent et al.¹⁰⁰ Le domaine D1 est constitué de 115 acides aminés dont 5 cystéines. Quatre d'entre elles forment deux ponts disulfures intra-domaine deux à deux et la dernière est disponible pour la formation d'un pont disulfure inter-

domaines D1-D3. Le domaine D2 présente une séquence de 111 résidus, parmi lesquels 6 cystéines formant trois ponts disulfures intra-domaine deux à deux. Le domaine D3 contient 112 résidus et la dernière cystéine qui permet la formation du pont disulfure inter-domaines D1-D3.

Identifier les résidus aux propriétés de coordination intéressantes

La séquence de la FETUA est assez riche en glutamates, aspartates et tyrosines qui représentent 50 résidus des 348 de la séquence de la protéine. Ces résidus portent des fonctions carboxylates et phénolates, des bases dures adaptées à la coordination de l'uranyle. Les domaines D1 et D2 définis en figure 24 possèdent respectivement 50% et 32 % des résidus acides de la FETUA. Le domaine D3 ne contient que peu d'acides aminés potentiellement chélateurs (14% seulement). Les domaines D1 et D2 apparaissent donc comme étant les plus intéressants à étudier dans le cadre de ce projet.

Conclusion sur le choix des domaines

Le tableau 9 récapitule les informations pertinentes qui ont été prises en considération afin de choisir les domaines à produire dans le cadre du projet c'est-à-dire pour l'étude des sites d'interactions FETUA-uranyle par RMN.

Tableau 9 - Tableau comparatif des domaines de la FETUA. Le pourcentage de résidus chélateurs potentiels de chaque domaine a été calculé par rapport au nombre de résidus chélateurs potentiels dans la protéine, au nombre de 50. L'indication n.d. implique que l'information n'a pas été déterminée.

	D1	D2	D3
Séquence	115 résidus	111 résidus	112 résidus
PM (kDa)	13	12	11
Résidus	10 Glu + 11 Asp + 4 Tyr	9 Glu + 5 Asp + 2 Tyr	3 Glu + 4 Asp
chélateurs	Total = 25	Total = 16	Total = 7
potentiels	50 % / h-FETUA	32 % / h-FETUA	14 % / h-FETUA
Structures	1 hélice alpha	1 hélice alpha	n.d.
secondaires	4 feuillets beta	4 feuillets beta	
Structure	Structuré , de type	Structuré , de type	Non structuré
tertiaire	cystatine	cystatine	

Grâce à ces informations, nous avons conclu que les domaines structurés D1 et D2 étaient les plus pertinents à étudier dans le cadre d'une étude des sites d'interaction FETUA-uranyle par spectroscopie RMN à haut champ. Les séquences de D1 et D2 sont en effet plus riches en résidus acides que celle de D3 et réunissent à elles deux plus de 80% des groupes carboxylates et phénolates de la protéine, groupes potentiellement chélateurs favorables à l'interaction protéine-uranyle et domaine-uranyle. Les

structures des deux domaines sont proches car semblables toutes deux à des cystatines (présence d'une hélice α et de 4 feuillets β). La présence d'hélices α et des feuillets β est idéale pour une étude structurale par RMN car elle favorise une meilleure distribution des signaux, comme explicité précédemment. L'attribution des signaux serait donc *a priori* plus aisée pour ces deux domaines.

2.2.2 Limite des systèmes

Le choix d'étudier séparément les deux domaines D1 et D2 de la FETUA implique l'hypothèse qu'un à trois des sites de fixation de l'uranyle sur la h-FETUA sont au sein même des domaines cystatines D1 et/ou D2. Les systèmes choisis ne permettent pas de localiser d'éventuels sites inter-domaines : participation d'acides aminés issus de plusieurs domaines soit en première sphère de coordination (coordination de l'uranyle dans le plan équatorial) soit en seconde sphère de coordination (liaisons hydrogènes stabilisantes). Par ailleurs, aucune modification de séquence n'a été opérée dans le but d'être au plus proche de la séquence réelle de chaque domaine dans la protéine native. Selon les résultats obtenus par la suite, d'éventuelles mutations pourront être considérées.

2.2.3 Conditions requises pour les études RMN hétéronucléaires

Marquage isotopique

Comme explicité en section 2.1.2, le double marquage $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ facilite la résolution des spectres et l'attribution des signaux pour des protéines dont le poids moléculaire dépasse 10 kDa, ce qui est le cas des domaines D1 et D2. Deux techniques de production de protéine marquée peuvent être envisagées. Tout d'abord, il est possible de produire des fragments de protéine par synthèse peptidique et d'introduire des acides aminés marqués au cours de cette synthèse. Cette voie de production est onéreuse et ne convient qu'à des séquences protéiques très courtes. La deuxième solution la plus couramment utilisée est de produire la protéine sous forme recombinante marquée. Dans cette approche, une cellule (de bactérie, de levure, mammifère,...) dont le génome a été modifié par recombinaison génétique va sur-exprimer la protéine dans un milieu de culture constitué de molécules marquées permettant une production de la protéine avec 100% d'isotopes ^{13}C et ^{15}N . Notre choix s'est porté sur la production sous forme recombinante des domaines D1 et D2 à partir de leur expression chez la bactérie *E. coli*, en milieu marqué $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Les étapes de production sont présentées en section 2.3 de ce chapitre.

Quantités nécessaires à produire

Les quantités nécessaires aux études RMN sont particulièrement élevées, notamment par rapport à la plupart des techniques de caractérisation de complexes protéine-métal citées dans le chapitre I en section 2 (UV-Vis, Fluorescence, CD, ...). Il est nécessaire de disposer de 500 à 600 μL de protéine soluble à une concentration élevée, idéalement de l'ordre de 1 mM. Ces deux impératifs peuvent être limitants pour l'utilisation de la RMN. Comme explicité au préalable, les méthodes ayant gagné en sensibilité avec le développement des spectromètres à haut champ, la concentration de l'échantillon peut être diminuée jusqu'à environ 200 μM . Cette concentration reste néanmoins élevée car elle peut conduire à l'agrégation des protéines et peut constituer un défi par rapport aux rendements actuels de production de protéines recombinantes.

2.3 Production des domaines D1 et D2 sous forme recombinante marquée

2.3.1 Stratégie de production

Pour effectuer la production de protéines sous leur forme recombinante à l'aide d'un système vecteur-hôte il est nécessaire de disposer de la séquence d'ADN linéaire codant pour la protéine en question et d'un hôte dans lequel on peut insérer le vecteur d'ADN recombinant. L'hôte sur-exprime la protéine qui est ensuite extraite et purifiée avant d'être caractérisée (figure 57).

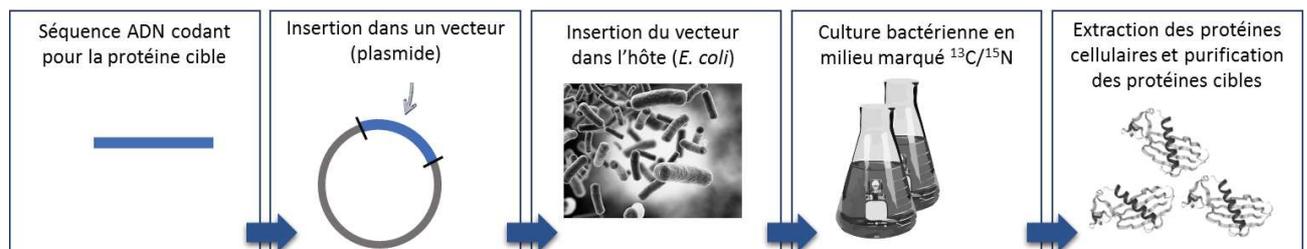


Figure 57 - Schéma simplifié des étapes de production d'une protéine sous forme recombinante.

Les domaines recombinants ont été produits par l'équipe de C.Vidaud, au CEA Marcoule. Les stratégies et protocoles de production et de purification des domaines D1 et D2 sont détaillés en Annexe 1. En résumé, D2 a été exprimé par la bactérie *E. coli* sous forme soluble dans le cytoplasme et a donc pu être purifié selon des protocoles classiquement utilisés dans ce type d'approche. D1 n'a pas pu être obtenu en quantités suffisantes sous forme soluble. Il a été produit sous la forme de corps d'inclusion insolubles. L'obtention du domaine D1 purifié a donc nécessité la solubilisation des corps d'inclusion ce qui a

conduit à l'obtention de la protéine sous forme dénaturée, forme sous laquelle elle a été purifiée. Son repliement a été assuré par des étapes de dialyses lentes successives dans des tampons optimisés pour limiter au mieux son agrégation.

Quel que soit le domaine purifié D1 ou D2, leur analyse chromatographique de contrôle en fin de purification a montré que l'un comme l'autre était présent sous la forme de populations monomériques et oligomériques. Une étape supplémentaire de « lissage » par chromatographie d'exclusion stérique a dû être mise en œuvre pour sélectionner pour chacun des domaines la population la plus homogène possible (monomérique ou dimérique) (figure 58).

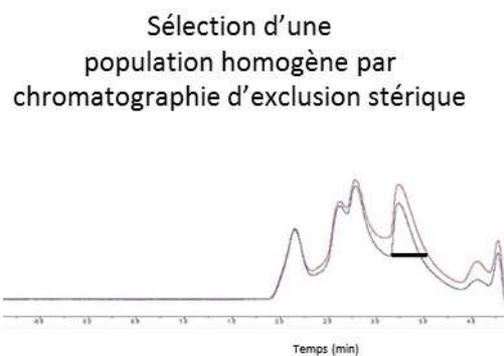


Figure 58 – Etape de lissage de D2 par sélection d'une population homogène par chromatographie d'exclusion.

Cette étape qui entraîne une dilution de la protéine a été suivie d'une concentration par centrifugation sur concentrateurs. Si cette démarche a bien fonctionné pour D2, D1 s'est avéré trop instable, des formes agrégées étant à nouveau générées lors de la concentration.

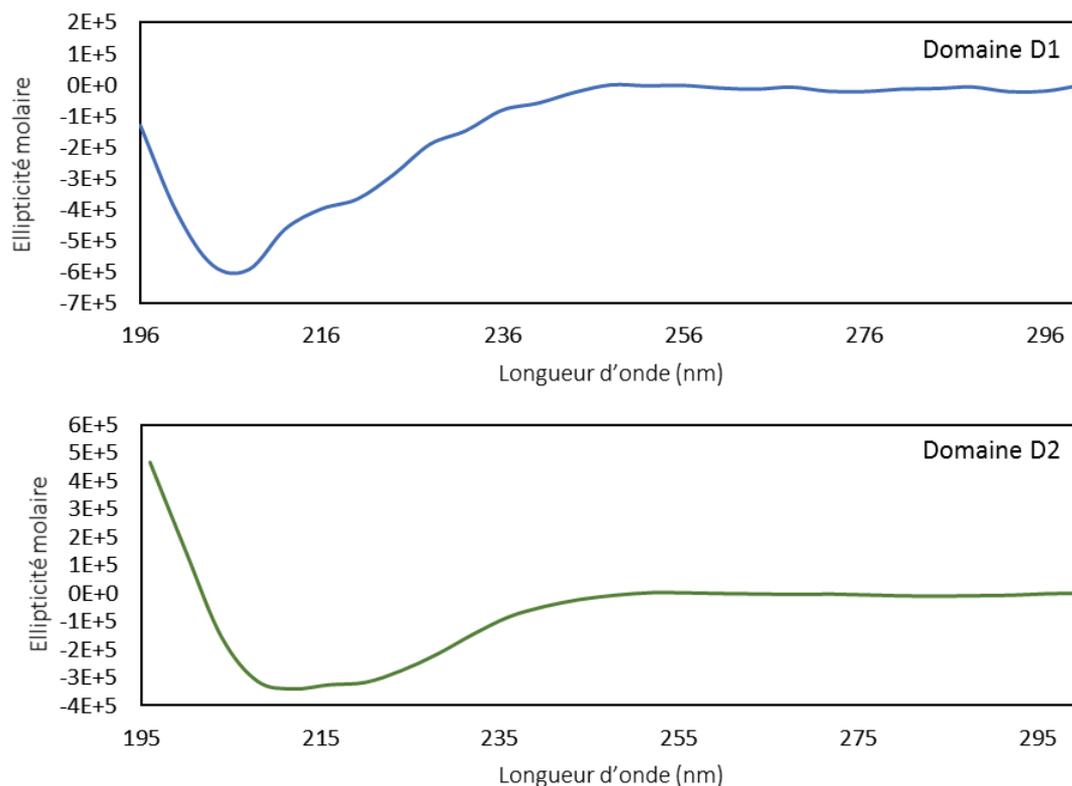
2.3.2 Contrôle des protéines recombinantes

La RMN nécessite de disposer d'échantillons de protéine pure et bien caractérisée. Par ailleurs, comme explicité en section 2.2.3 de ce chapitre, les contraintes imposées par les études RMN sont de disposer d'environ 600 μ L de protéine soluble, à environ 200 μ M.

Un premier contrôle en spectrométrie de masse des protéines a été réalisé lors des premières productions de D1 et D2 afin de vérifier la présence intégrale des deux domaines et l'absence de toute protéine contaminante à l'issue des procédés de purifications. Beaucoup plus sensibles que les

techniques d'électrophorèse sur gel, les résultats obtenus en spectrométrie de masse ont montré que seuls les deux domaines étaient présents dans les échantillons finaux.

Divers contrôles permettent de caractériser la protéine après l'ensemble des étapes de purification : concentration, état d'oligomérisation et contrôle du repliement. Ce dernier contrôle est effectué par dichroïsme circulaire, dans la région UV lointain de 190 à 230 nm. Les spectres obtenus pour D1 et D2 purifiés sont présentés en figure 59.



Si le spectre de D2 indique que le domaine est bien structuré, avec en particulier la présence de feuillets β tels qu'attendus dans un domaine de type cystatine, le spectre de D1 montre que la protéine est peu structurée. L'absence de feuillet β dans D1 peut s'expliquer par un repliement insuffisant de la chaîne polypeptidique résultant de l'obtention de la protéine sous forme de corps d'inclusion, de leur solubilisation et d'un repliement de la protéine effectué *in vitro* alors que le repliement de D2 a été naturellement assuré lors de son expression par l'organisme hôte *E. coli*. La présence d'une cystéine libre est un handicap supplémentaire pouvant générer un défaut d'appariement des cystéines constituant les ponts disulfures nécessaires à sa conformation.

Les concentrations en échantillon ont été contrôlées par dosage UV-visible pour D1 et par dosage des soufres sur D2 du fait de l'absence de tryptophane dans ce domaine. D2 a pu être obtenu avec une concentration finale de 197 μM alors que D1 n'a pu dépasser 28 μM . Cette concentration est particulièrement peu élevée pour une étude par RMN.

Notre projet a nécessité de produire les domaines D1 et D2 de la FETUA sous formes recombinantes chez l'organisme *E. coli* pour l'étude RMN. Ces domaines sont structurés et riches en résidus potentiellement liant. Leur production sous formes marquées $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ s'est avérée être une étape longue, et particulièrement difficile en ce qui concerne le domaine D1. En effet ce domaine est plus difficile à obtenir en raison de son expression sous forme de corps d'inclusion chez la bactérie, nécessitant donc de le purifier en conditions dénaturantes. Les tentatives de repliement de D1 par dialyses lentes ne permettent pas d'aboutir totalement à la conformation attendue. La concentration finale maximale atteinte en protéine pure dialysée ne peut dépasser de 28 μM . En revanche la protéine recombinante D2 a été obtenue sous forme structurée à la concentration adéquate pour l'étude RMN (environ 200 μM). Son contrôle en CD montre qu'elle présente une structuration majoritaire de type feuillets β comme attendu dans le repliement des domaines de type cystatine. Ce type de structuration est en revanche *a priori* absent ou très faiblement présent pour D1.

Les domaines D1 et D2 ont toutefois été obtenus en quantités suffisantes pour procéder à l'étude des interactions domaine-uranyle par RMN et à l'aide de techniques physico-chimiques plus usuelles. A noter que le mauvais repliement de D1 pourrait avoir un impact important sur l'affinité du domaine pour l'uranyle si les potentiels sites d'interactions avec l'uranyle sont dépendants de la structure du domaine.

3 Etudes des interactions domaine-uranyle

Les interactions entre uranyle et domaines D1 et D2 ont été étudiées par RMN mais également par dichroïsme circulaire, électrophorèse capillaire et fluorescence. Ces trois dernières techniques sont compatibles avec le marquage des domaines nécessaire pour la RMN. Par ailleurs elles ont été utilisées pour les études antérieures menées sur la FETUA et permettent une comparaison des résultats obtenus avec la protéine entière. Une étude comparative des domaines par bioinformatique a été réalisée au préalable afin de prendre conscience des similitudes et des différences existant entre les deux domaines.

3.1 Etude comparative des domaines D1 et D2 par bioinformatique

Comme nous l'avons vu en section 1.1.3, la structure de la FETUA n'a pas été élucidée, ni par cristallographie des rayons X, ni par RMN. Les outils proposés par le développement de la bioinformatique au cours de ces vingt dernières années sont extrêmement puissants. Ils sont particulièrement utiles en biologie structurale. Nous avons utilisé quelques-uns de ces outils pour comparer les séquences, structures et caractéristiques hydrophobes et hydrophiles des surfaces de D1 et D2. Les outils utilisés, à savoir LAlign, PSIPRED, SWISS-MODEL et INTERALIGN, sont présentés en Annexe 2. Les séquences utilisées pour l'ensemble des prédictions sont celle présentées en figure 56, en section 2.2.

Alignement de séquences

La simple comparaison de séquences de plus de 100 résidus deux à deux est relativement difficile. Des outils bioinformatiques de plus en plus performants permettent d'étudier l'alignement soit global, c'est-à-dire entre les deux séquences sur toute leur longueur, soit local, c'est-à-dire en maximisant la similarité entre une séquence et un segment de l'autre séquence. Dans le cas d'un alignement local, l'algorithme optimal le plus utilisé est celui développé par Smith et Waterman.¹³⁶ Maximiser la similarité entre les séquences revient à aligner deux résidus qui sont homologues, qui occupent une position équivalente dans les structures secondaires/tertiaires ou bien qui ont des fonctions similaires (par exemple Glu et Asp présentent tous deux des fonctions carboxylates).

Nous avons choisi d'aligner les séquences de D1 et D2 avec le logiciel LAlign, à l'aide d'une matrice BLOSUM 50 pour laquelle les paires de caractères alignées sont similaires à 50% ou plus. Le résultat est présenté en figure 60.

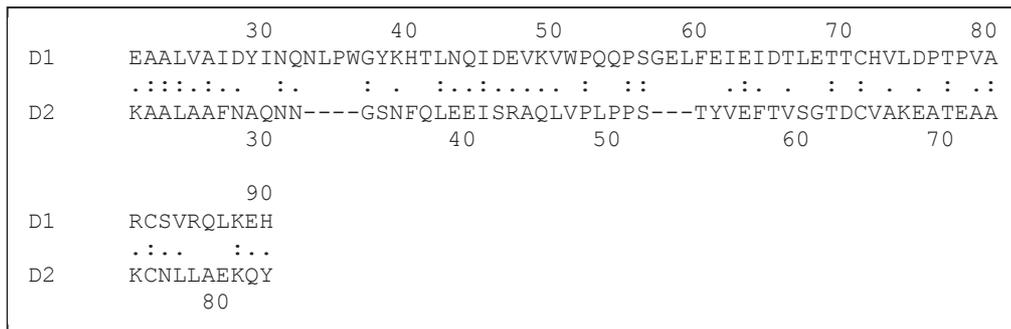


Figure 60- Alignement des séquences des domaines D1 (115 acides aminés) et D2 (111 acides aminés) de la FETUA sur un segment de 70 acides aminés à l'aide du logiciel LAlign, par utilisation d'une matrice BLOSUM 50. Les similarités sont indiquées par des points, les identités par des doubles points et les sauts de caractères par des tirets.

LAlign indique que D1 et D2 présentent 60 % de similarité et 26% d'identité sur un segment de 70 résidus. Ces résultats suggèrent que D1 et D2 présentent des séquences globalement similaires. Comme explicité en section 1, différents niveaux de structures peuvent être considérés. Les structures secondaires et tertiaires des protéines étant liées à leur structure primaire (chaîne polypeptidique) et au repliement de cette chaîne dans l'espace, il apparaît nécessaire d'approfondir ces premières investigations par l'utilisation d'outils de prédictions structurales.

Prédiction de structures secondaires

L'outil PSI-PRED (*PSI-BLAST based secondary structure PREDiction*) a permis de prédire la présence et la localisation de structures secondaires (hélices α , feuillets β ou sans particularités) au sein des domaines D1 et D2 à partir de leurs séquences peptidiques (figure 61).

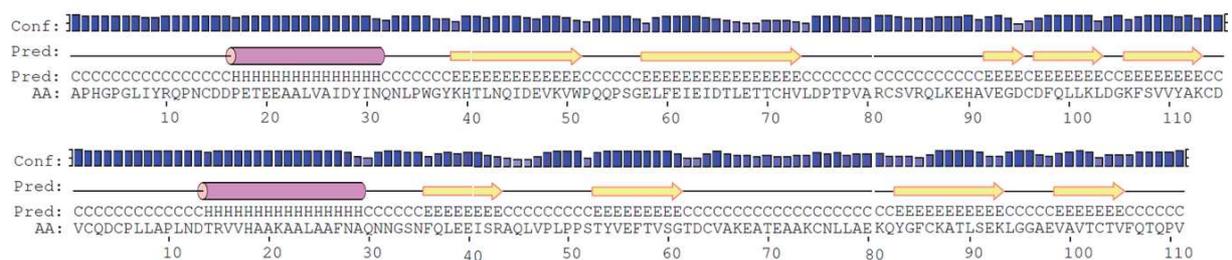


Figure 61 - Comparaison des prédictions de structures secondaires obtenues grâce à l'outil PSI-PRED pour les séquences de D1 (en haut) et D2 (en bas). Les hélices α sont indiquées en rose et les feuillets β en jaune. L'indice de confiance de la prédiction est indiqué à l'aide de barres bleues.

La prédiction des structures secondaires de D1 et D2 à l'aide du logiciel PSI-PRED montre que les deux sous-unités sont composées de structures secondaires bien définies, dans un ordre identique. D1 et D2 présentent tous deux une hélice α et 4 à 5 feuillets β , des structures caractéristiques pour une protéine

de type cystatine. L'organisation de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres peut être étudiée à l'aide d'outils de prédictions structurales plus complets.

Prédiction de structures tertiaires et de surface

Les deux structures les plus représentatives des domaines D1 et D2 de la h-FETUA ont été obtenues à partir de l'outil SWISS-MODEL : ce sont les structures 1rn7 (cystatine humaine D) et 4it7 (protéase à cystéine) (figure 62).¹³⁷⁻¹⁴⁰ La première présente 20 % d'identité avec le segment [26-133] de la FETUA (i.e. avec le domaine D1), et la seconde 20 % d'identité avec le segment [148-248] de la h-FETUA (i.e. avec le domaine D2).

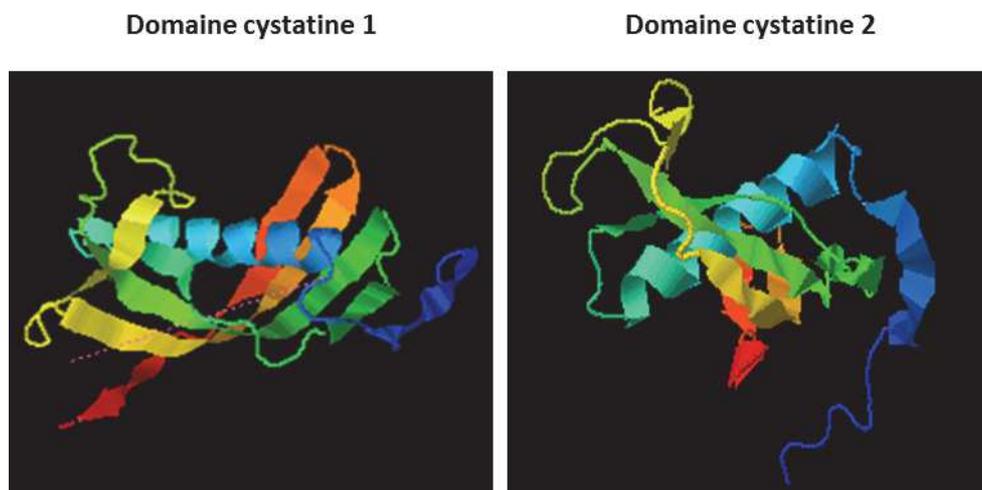


Figure 62 –Prédiction des structures 3D des domaines D1 et D2 à l'aide de l'outil de prédiction structurale SWISS-MODEL

La superposition des structures prédictives de D1 et D2 sur INTERALIGN est présentée en figure 63. Une superposition quasi-idéale des structures est observée, indiquant que les deux domaines ont des structures très proches.

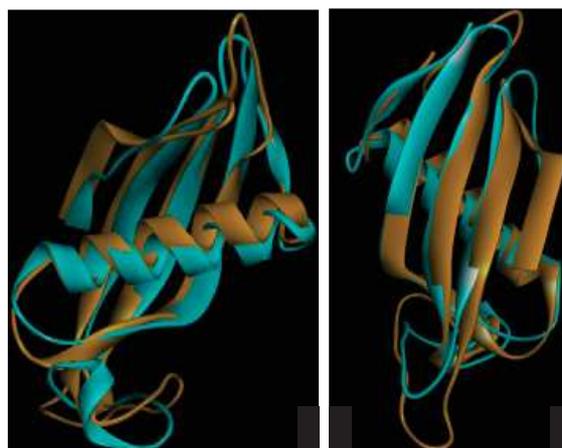


Figure 63- Superposition des structures de D1 (en bleu) et D2 (en orange) effectuée à partir des séquences linéaires des deux domaines, à partir de l'outil INTERALIGN développé par O. Pible, G. Imbert et J.-L. Pellequer.¹⁴¹

Le logiciel de visualisation (DS visualizer 1.6) a également permis de modéliser les surfaces des deux domaines (figure 64).

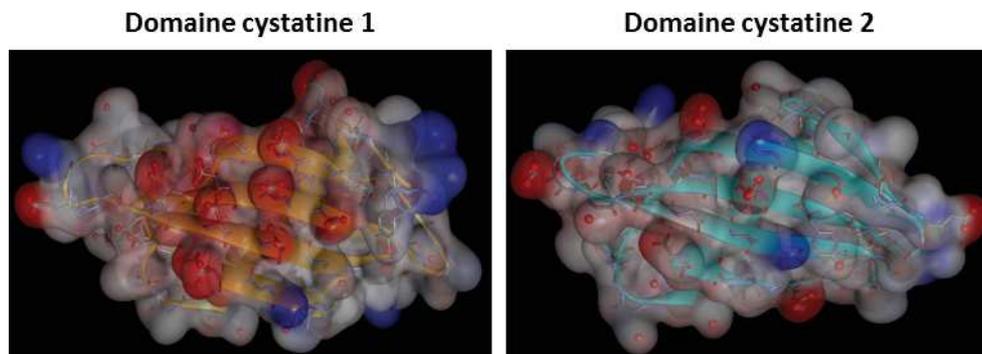


Figure 64 – Les modèles moléculaires des domaines 1 et 2 avec en rouge les surface chargées négativement et en bleu celles chargées positivement. Le domaine D1 présente un cluster acide particulièrement intéressant pour la chélation de l'uranyle. (outil DS visualiser 1.6)

Si les structures primaires, secondaires et tertiaires de D1 et D2 sont similaires, les surfaces exposées par chacun des domaines diffèrent. Le domaine D1 présente un cluster acide qui n'est pas présent sur D2. D'après Jahnhen-Dechant *et al.* cette surface hydrophile sur le domaine D1 serait celle qui est en contact avec la surface minérale extracellulaire osseuse principalement formée d'hydroxyapatite. Ce cluster serait particulièrement propice à la chélation de l'uranyle puisqu'exposé à son environnement. Cette illustration met en évidence la raison pour laquelle le mauvais repliement de D1 pourrait avoir un impact considérable sur l'affinité du domaine pour l'uranyle si les potentiels sites d'interaction avec l'uranyle sont dépendants de la structure du domaine et de la présence du cluster acide identifié par bioinformatique.

3.2 Dichroïsme circulaire

Comme décrit au chapitre I, le dichroïsme circulaire (CD) apporte des informations sur l'environnement des résidus aromatiques et des ponts disulfures, sur la structure secondaire d'une protéine ou d'un complexe, et éventuellement sur la spéciation en solution i.e. sur la stœchiométrie des complexes. Cette technique permet également de façon relativement rapide et qualitative d'obtenir une information sur l'existence ou non d'une interaction domaine-uranyle. Les titrages des domaines D1 et D2 ont été réalisés à pH 7,4 par ajout de quantités croissantes d'uranyle en milieu tamponné. Le dosage a été suivi en UV proche (ponts disulfures et tyrosines/tryptophanes) et en UV lointain (structures secondaires). Les spectres obtenus sont présentés en figure 65.

Que ce soit pour le domaine D1 ou pour le domaine D2, les spectres obtenus en UV proche (figures 65a et 65b) montrent un signal extrêmement bruité. Il est donc très difficile d'établir une quelconque conclusion quant à l'impact de l'uranyle sur l'environnement des résidus aromatiques et des ponts disulfures au sein des domaines D1 et D2. Ces résultats ne permettent pas d'établir de comparaison avec la FETUA pour laquelle l'évolution du signal en UV proche informait de la stœchiométrie des complexes ML, M₂L et M₃L (section 1.3.1).

Les dosages menés en UV lointain (figure 65c et 65d) montrent une évolution du signal pour l'ajout de 1 à 3 équivalents d'uranyle, aux alentours de 205 nm pour D1 qui n'a pas de structure particulière et de 220 nm pour D2 (présence de feuillets β et d'hélices α). Par ajout d'uranyle, l'amplitude de l'ellipticité molaire diminue légèrement dans les deux cas. Il est cependant difficile d'évaluer la stœchiométrie des complexes, l'amplitude de signal étant très faible.

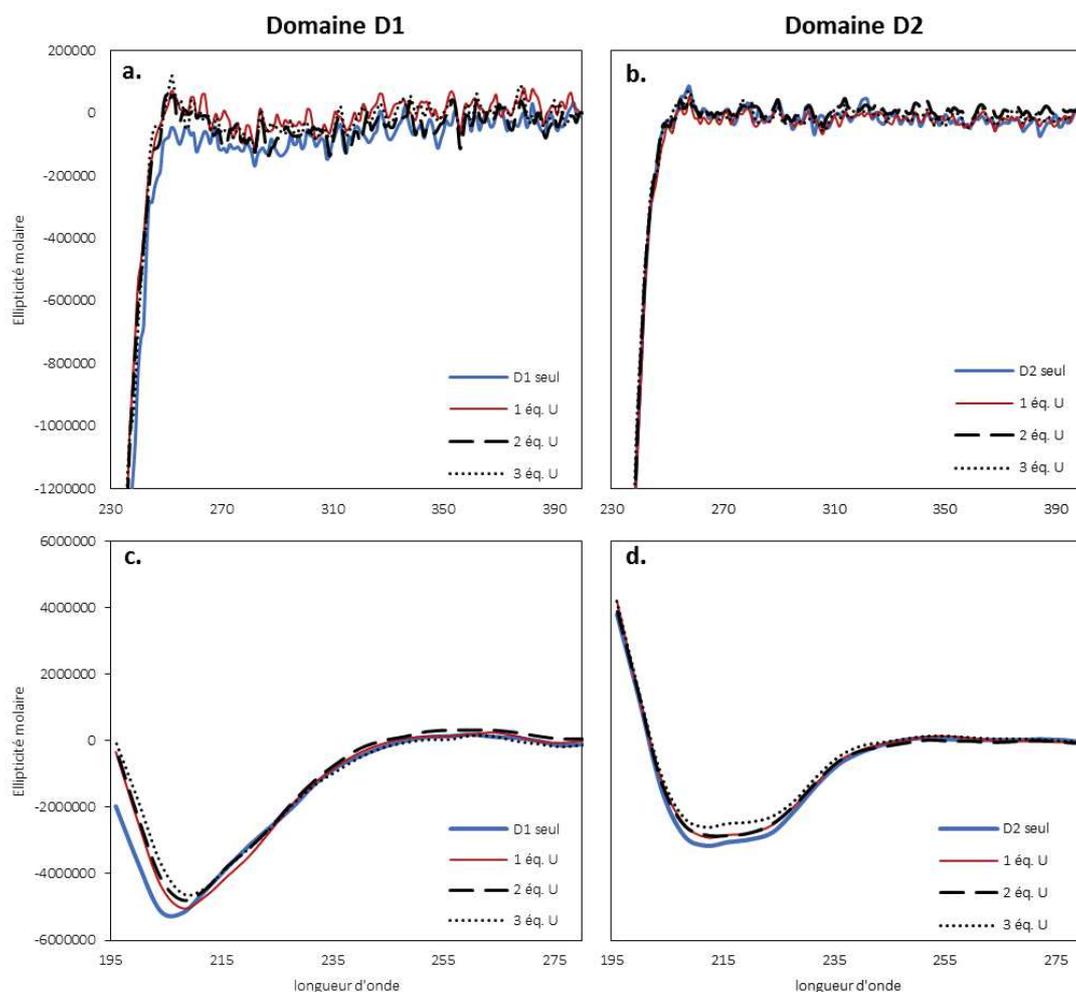


Figure 65 – Spectres dichroïques de D1 et D2 obtenus à 25°C a. en UV proche (D1 11 μ M, D2 13 μ M ; milieu Tris 50 mM / NaCl 150 mM) et b. en UV lointain (D1 25 μ M et D2 50 μ M ; milieu Tris 5 mM, NaCl 15 mM).

Les dilutions ayant été prises en considération et la force ionique étant maîtrisée, la diminution de l'amplitude du signal est imputée à un faible changement de structure secondaire de chaque domaine en présence d'uranyle, notamment pour le domaine D1 pour lequel un déplacement de la longueur d'onde de 205 à 210 nm et l'obtention d'un signal positif à 195 nm sont observés, indiquant une légère structuration de ce domaine. Ces résultats indiquent donc une interaction avec l'uranyle, bien que l'amplitude de signal soit faiblement impactée lors de la liaison du métal. L'approche RMN est donc justifiée pour les deux domaines et, dans l'idéal, pourra permettre d'identifier les sites d'interaction FETUA-uranyle au sein des domaines isolés.

3.3 RMN

Les études par RMN ont été effectuées en collaboration avec B. Brutscher, de l'Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble). L'objectif est d'identifier les résidus impactés par la formation d'un complexe protéine-métal. De façon plus pratique, nous cherchons tout d'abord à visualiser les différences entre des spectres bidimensionnels ^1H - ^{15}N en absence puis en présence de métal. La méthodologie de cette approche est détaillée en section 2.1.3.

3.3.1 Spectres HSQC et HMQC en l'absence de métal

Il existe différentes séquences HSQC ou HMQC permettant d'enregistrer les spectres bidimensionnels ^1H - ^{15}N d'une protéine. Les séquences impulsionnelles les plus répandues sont les séquences dites SOFAST (*band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient heteronuclear multiple quantum coherence*) et la TROSY (*Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*).^{119,142} Les deux méthodes ont été développées à l'IBS par l'équipe de B. Brutscher, avec qui nous avons collaboré pour ce projet. La SOFAST-HMQC a été développée afin d'obtenir le meilleur rapport S/N en un temps limité de façon à pouvoir acquérir un signal exploitable pour des échantillons faiblement concentrés. Cette expérience correspond à l'expérience hétéronucléaire ^1H - ^{15}N la plus sensible car c'est celle qui génère le moins de perte du signal. En revanche, elle est moins résolutive que la BEST-TROSY-HSQC. Apportant une meilleure résolution que la SOFAST, la BEST-TROSY a notamment été employée pour étudier des protéines intrinsèquement non structurées. Elle ne permet cependant pas d'analyser les échantillons de faibles concentrations. La production d'échantillons (volumes, concentrations) est donc déterminante dans le choix de la séquence.

Domaine D1

L'échantillon RMN de D1 a été préparé avec une concentration de 21 μM . Le domaine n'a pu être concentré à cause de phénomènes d'agrégation. La séquence SOFAST-HMQC a donc été employée.

Le spectre HMQC de D1 apo est présenté en figure 66. Une faible dispersion des signaux est observée. Quelques zones caractéristiques sont néanmoins repérables : les chaînes latérales des tryptophanes, les amines NH_2 ainsi que la corrélation ^1H - ^{15}N correspondant au résidu C-terminal sont bien identifiées. Ce type de spectre ne correspond pas à celui d'un domaine bien structuré dans lequel se trouvent des structures secondaires de type feuillet β , ce qui appuie les résultats obtenus en dichroïsme circulaire. Il correspond à celui d'un *molten globule* (littéralement globule fondu), un état structural situé entre l'état natif de la protéine et la déstructuration totale.

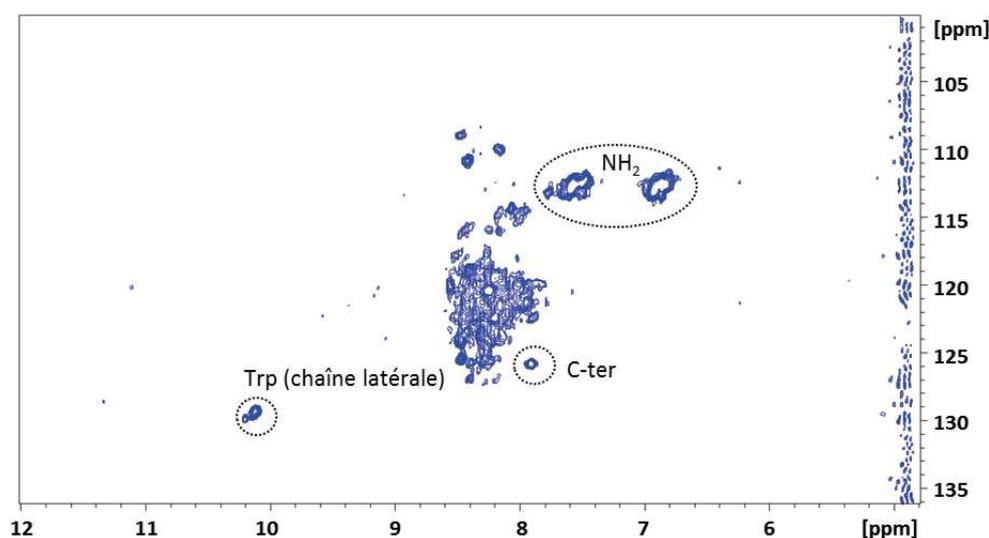


Figure 66 - Spectre HMQC ^1H - ^{15}N (séquence SOFAST-HMQC, 950 MHz, 25°C) de D1 (21 μM) en tampon Tris 50 mM, NaCl 25 mM, en présence de 5% de D_2O , à pH 7,4.

Domaine D2

L'échantillon de D2 a pu être concentré de façon suffisante (200 μM environ) pour pouvoir utiliser une séquence impulsionnelle résolutive de type BEST-TROSY-HSQC. Le spectre HSQC de D2 apo est présenté en figure 67.

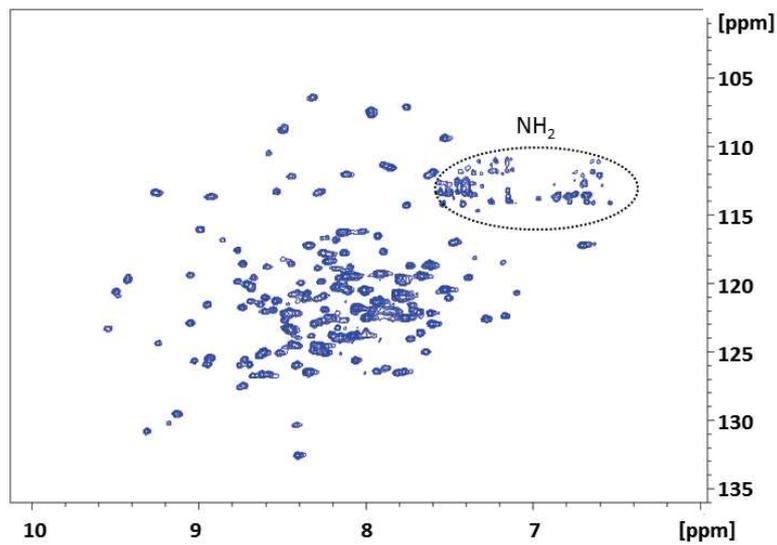


Figure 67 - Spectre HSQC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ (séquence BEST-TROSY-HSQC, 950 MHz, 25°C) de D2 (197 μM) en tampon Tris 5 mM, NaCl 50 mM, en présence de 5% de D_2O , à pH 7,4

Le spectre HSQC de D2 montre une forte dispersion des signaux. Cette dispersion est caractéristique de la présence de feuillets β dans le domaine D2 ce qui est en accord avec le spectre dichroïque de la protéine. La différence entre les deux spectres de corrélation $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ de D1 et D2 est notable comme en témoigne la figure 68 sur laquelle les deux spectres obtenus sont superposés.

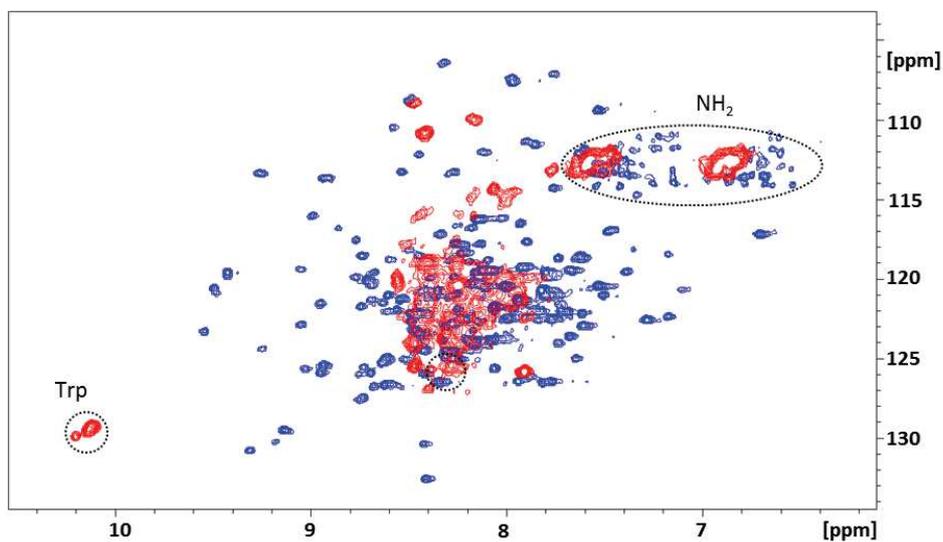


Figure 68 - Superposition des spectres bidimensionnels HSQC et HMQC de D1 (en rouge) et D2 (en bleu) (950 MHz, 25°C).

3.3.2 Spectres HSQC et HMQC en présence de métal

Domaine D1

Les spectres de D1 réalisés en l'absence de métal (empreinte, en bleu) puis en présence d'un équivalent de métal (en rouge) sont superposés en figure 69a. Quelques modifications de déplacements chimiques

sont observées (figure 69b). L'ajout d'un deuxième équivalent d'uranyle n'a pas modifié le spectre de l'échantillon. Globalement, peu de changements sont observés mais ils sont significatifs : « disparitions » et « apparitions » de signaux témoignent d'une variation de déplacement chimique. Ces changements n'ont été observés que dans la zone 6,5-8,5 ppm (^1H) / 105-110 ppm (^{15}N) car il s'agit d'une zone plutôt résolue avec un nombre de signaux restreint et mieux dispersés. Toutefois, si d'autres résidus de la protéine voient leur environnement chimique impacté par la chélation du métal, cette modification n'est pas visible sur le spectre en raison de la faible résolution. D1 interagit donc avec l'uranyle d'après ces résultats. Malheureusement, en raison du manque de résolution, il est extrêmement difficile d'attribuer les signaux pour identifier les résidus dont l'environnement chimique change lors de la formation du complexe (interaction de la chaîne latérale avec le cation métallique ou changement de structure lié à la formation du complexe).

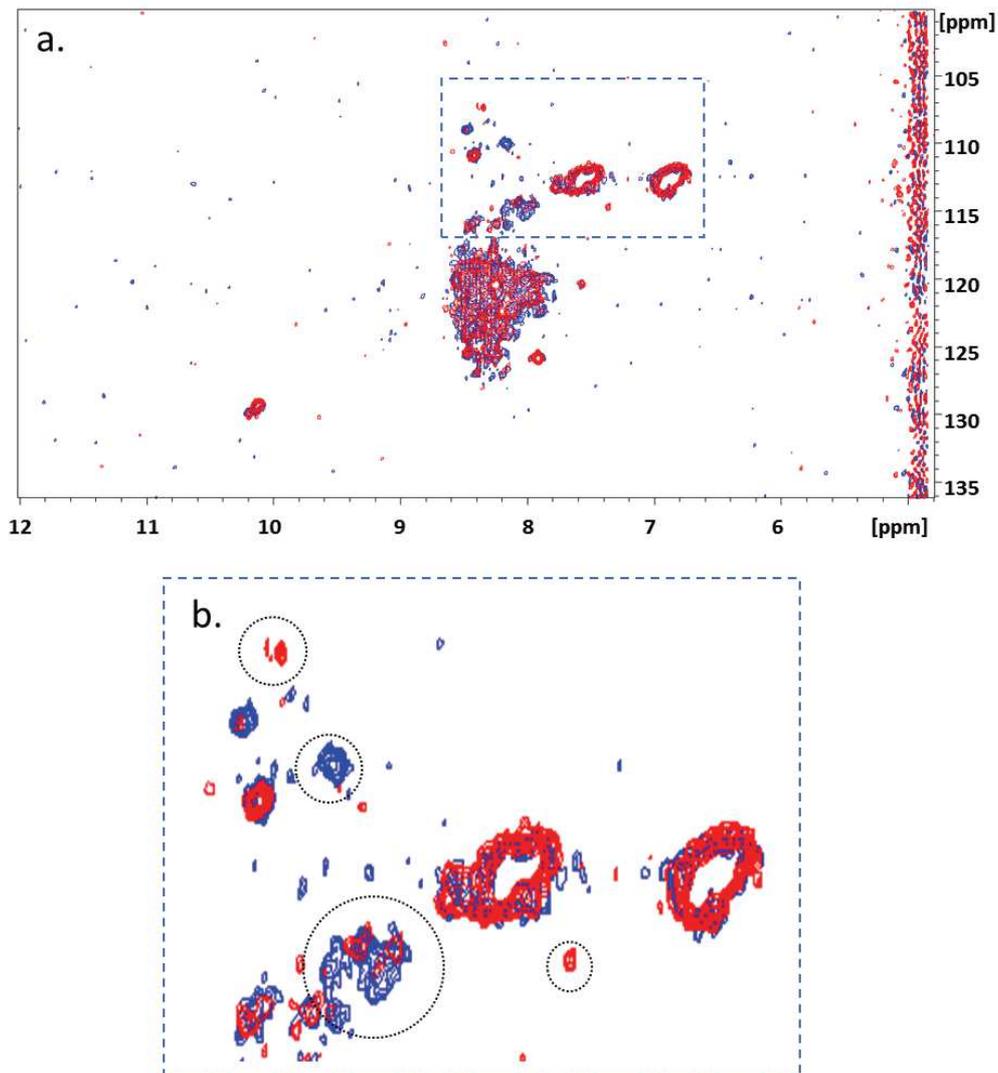


Figure 69 - Spectres HSQC ^1H - ^{15}N (séquence SOFAST-HMQC, 950 MHz, 25°C) de D1 apo (en bleu) et D1 métallé (en rouge) (20 μM) en tampon Tris 5 mM, NaCl 25 mM, en présence de 5% de D_2O , à pH 7,4.

Domaine D2

Les spectres de D2 réalisés en l'absence de métal (empreinte, en bleu) puis en présence d'un équivalent de métal (en rouge) sont superposés en figure 70 : aucun changement n'est observé. Soit le domaine D2 n'interagit pas avec l'uranyle, soit l'interaction n'induit aucun changement même minime détectable par RMN (changement d'environnement chimique des protons amides). Un spectre C-HSQC a donc été enregistré pour étudier l'impact du métal sur les chaînes latérales de la protéine, plus proches du site de coordination, en l'absence et en présence de métal. Aucune variation de déplacement chimique n'a été observée dans ce cas non plus. L'attribution des signaux n'a donc pas été effectuée ni pour le spectre ^1H - ^{15}N , ni pour le spectre ^1H - ^{13}C . Aucune interaction D2-uranyle n'est visualisée par RMN.

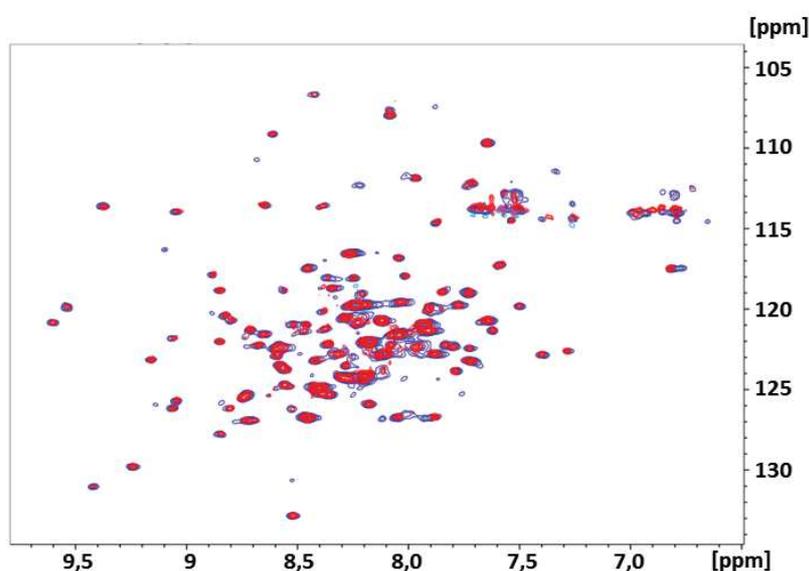


Figure 70 - Spectres HSQC ^1H - ^{15}N (séquence BEST-TROSY-HSQC, 950 MHz, 25°C) de D2 apo (en bleu) et D2 métallé (en rouge) (197 μM) en tampon Tris 5 mM, NaCl 15 mM, en présence de 5% de D_2O , à pH 7,4.

Les études des domaines D1 et D2 par RMN bidimensionnelles ne permettent pas de localiser les sites d'interaction domaines-uranyle. Pour le domaine D2, malgré une résolution suffisante et une structure idéale du domaine, la présence du métal n'induit aucune variation de déplacement chimique, ni au niveau du squelette de la protéine (^1H - ^{15}N), ni au niveau des chaînes latérales des résidus (^1H - ^{13}C). Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus en CD. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour valider ou contester la présence d'une interaction D2-uranyle.

Les résultats obtenus avec D1 confortent l'hypothèse selon laquelle ce domaine est favorable à la liaison de l'uranyle (présence de 50% des phénolates et carboxylates de la FETUA). Cependant, la perte de la structure de type cystatine de D1 implique la perte totale ou partielle du cluster hydrophile présent à la surface du domaine d'après les études bioinformatiques présentées en section 3.1. La chélation du

métal observée est donc probablement due (i) à l'existence d'un site local non dépendant de la structure du domaine ou (ii) à l'existence d'un site non représentatif des sites d'interaction FETUA-uranyle due au mauvais repliement de la chaîne polypeptidique. Pour D1 également, des analyses complémentaires sont nécessaires afin notamment d'évaluer l'affinité apparente de D1 pour l'uranyle. Une première possibilité est d'étudier ces domaines par électrophorèse capillaire, technique qui a été employée par Huynh *et al.* pour déterminer la constante apparente de stabilité du complexe monométallique FETUA-uranyle en présence de carbonates.⁶⁸

3.4 Electrophorèse capillaire

Comme explicité au chapitre I, le fonctionnement de l'électrophorèse capillaire repose sur la séparation d'espèces (molécule, complexe, ion) en fonction du ratio charge/masse (z/m). Elle est très adaptée à l'étude de protéines car peu consommatrice en échantillon, relativement rapide à réaliser après optimisation des conditions d'analyse et effectuée dans des conditions non dénaturantes. Elle a permis de mesurer les constantes apparentes de stabilité des complexes FETUA-uranyle et OPN-uranyle.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec A. Hagège de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon qui est à l'initiative des travaux en EC-ICP-MS publiés sur la FETUA et l'uranyle. Nous avons tout d'abord étudié les interactions D1-uranyle et D2-uranyle dans le but de voir si D1 seul et D2 seul étaient capables de retenir l'uranium. Des conditions d'analyse similaires ont été appliquées à l'étude de la FETUA en parallèle de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus avec les domaines à ceux obtenus avec la protéine.

La méthode mise au point lors des travaux de thèse de S. Huynh¹⁴³ effectue la séparation en présence d'un excès de protéine (environ 10 équivalents de protéine pour 1 équivalent de métal) de façon à défavoriser le phénomène de sorption de l'uranyle sur le capillaire greffé HPC (hydroxypropylcellulose). L'analyse se compose de deux phases. Une phase de séparation permet aux complexes de migrer en fonction des ratios z/m . Puis l'uranyle non complexé se fixant à la surface du capillaire est éliminé par rinçage à l'acide nitrique 1 mM. La détection s'effectue grâce à un spectromètre de masse muni d'une source à impact électronique. L'isotope détecté est le ²³⁸U, ce qui permet d'observer le partage de l'uranium dans l'échantillon.

Les profils obtenus pour la FETUA, D1 et D2 sont comparés en figure 71. Tout d'abord, la présence des trois signaux correspondant à l'uranyle complexé par chacune des protéines sont visibles, bien que le

pic de D2 soit de très faible intensité et large comparé à ceux de la FETUA et de D1. Le pic correspondant à l'uranyle libre évacué lors de la phase de rinçage est inversement proportionnel à la quantité d'uranyle fixée par la protéine ou le domaine.

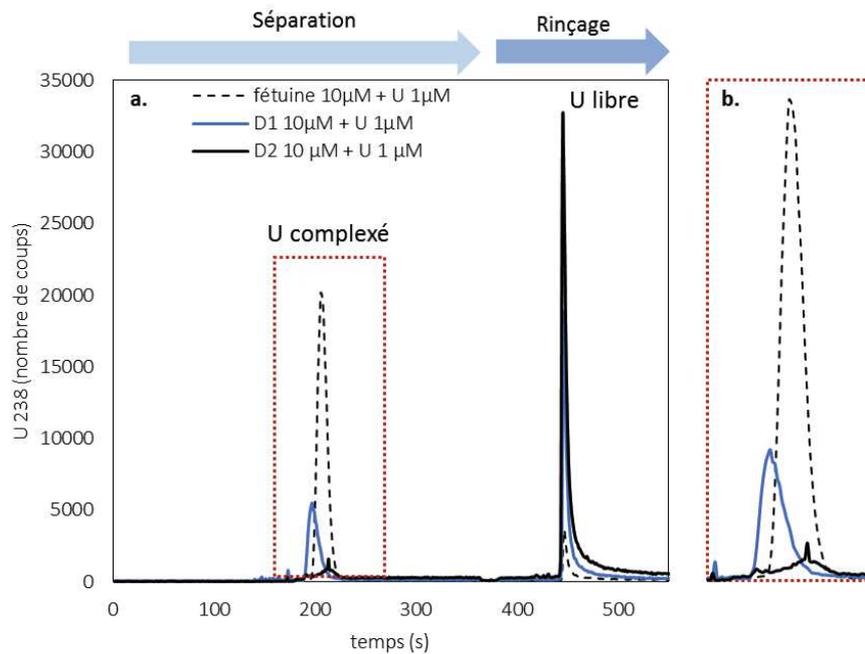


Figure 71- Profils EC-ICP-MS individuels obtenus pour la FETUA, D1 et D2 en présence de carbonates. Les échantillons contiennent 10 μM en protéine ou domaine et 1 μM en U. Injection 5 s à 0,5 psi ; séparation 0,8 psi -30 kV pendant 6 min ; rinçage 5 psi avec acide nitrique pendant 3 min ; rééquilibrage capillaire avec électrolyte.

Cette analyse confirme donc l'existence d'interactions D1-uranyle et D2-uranyle. La comparaison des aires des pics d'uranyle complexé par rapport à la quantité d'U libre évacuée lors du rinçage permet d'avoir une information qualitative sur ces interactions. La FETUA « retient » 90% d'uranyle contre 40% pour D1 pour des conditions d'analyse similaires. Ces résultats confortent donc les résultats obtenus en CD et en RMN pour le domaine D1. Pour D2, la très faible intensité du pic correspondant à l'uranyle complexé est dû (i) soit à une moindre affinité de D2 pour l'uranyle (ii) soit à la labilité du complexe (interaction strictement en surface par exemple). En effet, en cas de complexes labiles, si ligand et complexe n'ont pas les mêmes temps de migration, alors il y a dissociation et migration des espèces à des vitesses différentes et dans des directions opposées. Le complexe formé en solution, à l'équilibre, n'est donc tout simplement pas détecté. Néanmoins ce résultat indique qu'il y a une interaction entre D2 et l'uranyle.

Les faibles concentrations des échantillons de D1 (max 28 μM) limitent énormément les possibilités techniques pour évaluer la constante apparente K_1 du complexe D1-uranyle à pH 7,4 en EC-ICP-MS, en

présence de carbonates. En ce qui concerne D2, l'utilisation d'une méthode non séparative pourrait s'avérer plus appropriée. Nous nous sommes donc tournés vers la spectrométrie de fluorescence, technique employée par Basset *et al.* pour déterminer la stœchiométrie des complexes FETUA-uranyle en solution, à l'équilibre.

3.5 Fluorescence

Dans un premier temps, la fluorescence a été expérimentée sur la FETUA afin de valider la détermination de constantes apparentes de stabilité à partir de données obtenues lors du dosage de la protéine. L'étude menée sur la FETUA permet également d'avoir un point de comparaison pour évaluer les futurs résultats des domaines D1 et D2 isolés.

3.5.1 Complexes FETUA-uranyle : évaluation de constantes de stabilité apparentes

La b-FETUA, dont l'homologie de séquence avec la h-FETUA est établie, a été dosée par ajouts de quantités croissantes d'uranyle à pH 7,4 en présence d'acide iminodiacétique (IDA). L'IDA a été présenté dans le chapitre 1 comme protecteur des phénomènes d'hydrolyse de l'uranyle et comme compétiteur de référence. Ses constantes apparentes à pH physiologique sont connues et permettent de remonter à la constante apparente de la protéine.

Le dosage a été suivi par fluorescence en soumettant l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm (figure 72a). Les signaux émis à 340 et 305 nm correspondent respectivement aux 2 tryptophanes et aux 8 tyrosines présentes dans la b-FETUA. Les courbes d'extinction de fluorescence à 340 et 305 nm sont reportées en figure 72b, elles prennent en compte les phénomènes de dilution induits par l'ajout d'uranyle.

La courbe d'extinction de fluorescence à 340 nm (tryptophanes) montre une rupture de pente pour un ratio $[UO_2]/[protéine]$ d'environ 3, conformément à ce qu'ont obtenu Basset *et al.* par dosage de la b-FETUA. L'extinction de fluorescence à 305 nm est beaucoup moins marquée que celle à 340 nm indiquant que les tryptophanes sont plus affectés par la formation des complexes uranyle-FETUA que les tyrosines. La faible intensité de fluorescence initiale des tyrosines est directement liée au rendement quantique de ce résidu. A pH neutre, sous forme d'acide aminés isolés, tyrosines et tryptophanes ont des rendements quantiques proches (0,14 et 0,2). Dans une protéine, divers paramètres influencent le rendement quantique de chacun des deux résidus. Il a notamment été reporté que la tyrosine perdait

ses propriétés d'émission de fluorescence au profit d'un transfert d'énergie vers le tryptophane ou en raison du squelette de la protéine agissant comme inhibiteur de fluorescence interne. La fluorescence du tryptophane est également impactée par la présence de résidus voisins ou de molécules. Néanmoins le rendement quantique reste suffisamment élevé pour suivre le dosage de la protéine.

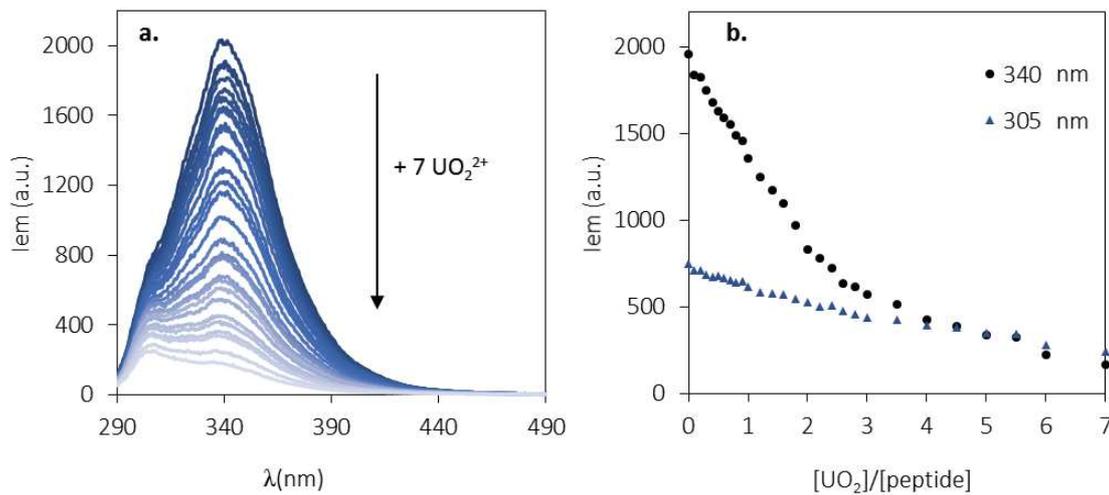


Figure 72 - a. Spectres d'émission de fluorescence de la b-FETUA (10 μ M) après excitation à 280 nm lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle, à pH 7,4 en milieu Tris 50 mM, NaCl 150 mM, et en présence d'IDA (100 μ M). b. Courbe d'extinction de fluorescence à 340 et 305 nm en fonction du ratio [uranyle]/[FETUA].

Les constantes apparentes de formation des complexes ML, M₂L et M₃L dont les équilibres successifs sont présentés en figure 73a ont été évaluées à l'aide du logiciel Specfit par modélisation des données obtenues par fluorescence (figure 73b). En raison du faible signal obtenu avec les tyrosines, l'analyse des données a été effectuée à partir des spectres obtenus sur la gamme de longueur d'ondes 305-550 nm. Le modèle choisi prend en considération les trois complexes identifiés par Basset *et al.* (ML, M₂L et M₃L). L'extinction de fluorescence n'étant pas particulièrement marquée pour les premiers ajouts, il a été considéré que les complexes ML et M₂L n'éteignaient pas complètement la fluorescence de la FETUA et seul le complexe M₃L est désigné non fluorescent lors de la modélisation.

Une adéquation entre le modèle choisi et les valeurs expérimentales obtenues est observée (figure 73b). Les valeurs de constantes présentées en figure 73c ont été évaluées en moyennant les résultats obtenus pour trois modélisations individuelles effectuées à partir de trois dosages opérés dans des conditions identiques. La constante apparente obtenue pour la formation du premier complexe ($10^{11 \pm 1}$) est proche de celle obtenue par Huynh *et al.* avec la b-FETUA par analyse EC-ICP-MS ($10^{11,4 \pm 0,5}$), malgré une précision moindre. L'analyse des données à l'aide de ce modèle est donc satisfaisante.

Par ailleurs, cette analyse nous a également permis d'évaluer pour la première fois les constantes apparentes de formation des complexes M_2L et M_3L ($\log K_2 = 9,5 \pm 0,5$ et $\log K_3 = 8,8 \pm 0,5$ à pH physiologique). Ces valeurs sont environ 1 à 2 ordres de grandeurs plus faibles que la première constante K_1 , témoignant d'une moindre stabilité des complexes M_2L et M_3L par rapport au complexe ML .

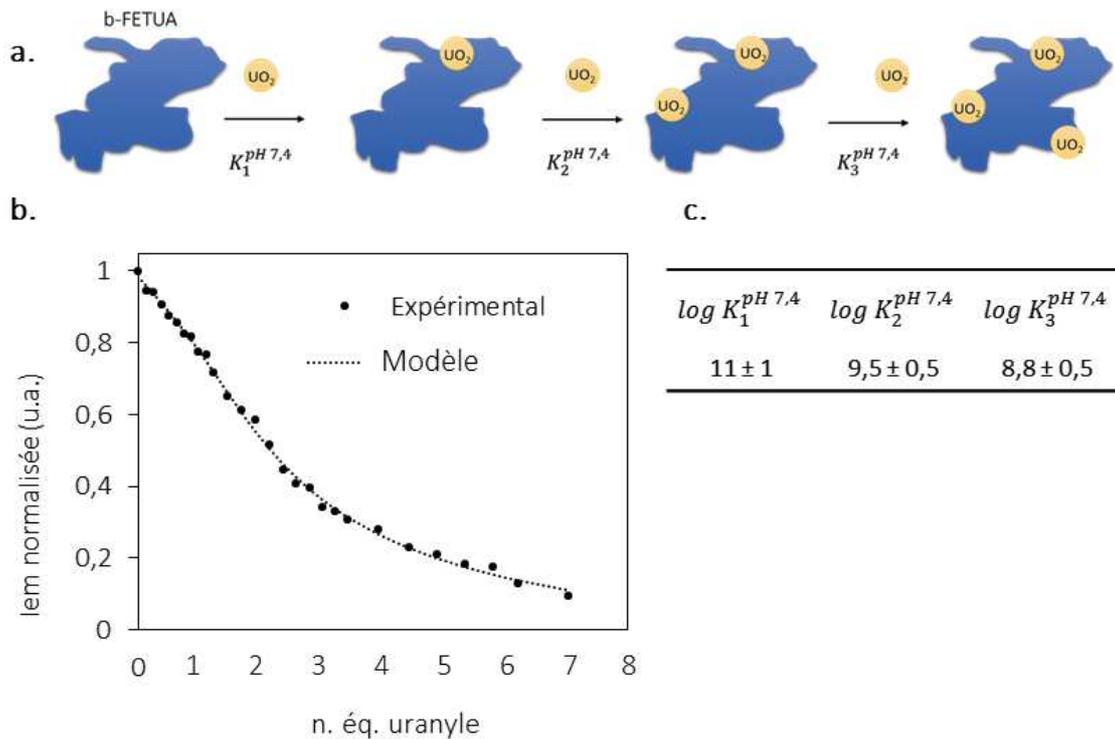


Figure 73 – a. Formations successives des complexes ML , M_2L et M_3L entre la FETUA et l'uranyle. Les constantes K sont les constantes apparentes successives à pH 7,4. ; b. Courbe d'extinction de fluorescence normalisée à 340 nm et modélisation des données ; c. Valeurs de constantes apparentes successives de complexation obtenues à pH 7,4 par modélisation Specfit.

3.5.2 Interactions entre domaines de la FETUA et uranyle

Nous avons ainsi validé l'évaluation de la constante apparente de la FETUA pour l'uranyle par modélisation des données obtenues par fluorescence à pH 7,4. Cela permettra un point de comparaison avec les résultats obtenus avec les domaines.

Le signal le plus intense dans l'analyse de la FETUA est celui des tryptophanes, les tyrosines ayant un faible rendement quantique. Les domaines D1 et D2 présentent des spectres de fluorescence différents.

Signature des domaines D1 et D2 en spectrométries UV-Vis et de fluorescence

Le domaine D1 contient 6 résidus aromatiques naturellement fluorescents : 2 tryptophanes et 4 tyrosines. En revanche, le domaine D2 ne présente pas de tryptophane et seules deux tyrosines sont présentes dans la séquence. Afin de pouvoir réaliser un dosage de D2 par fluorescence il est nécessaire de doubler la concentration de l'échantillon, de façon à visualiser un signal d'intensité correcte

permettant d'exploiter l'extinction de fluorescence potentielle survenant au cours du dosage. Le signal de fluorescence de D2 est beaucoup plus faible que celui de la FETUA ou de D1 malgré une augmentation significative de concentration initiale en domaine D2 (figure 74).

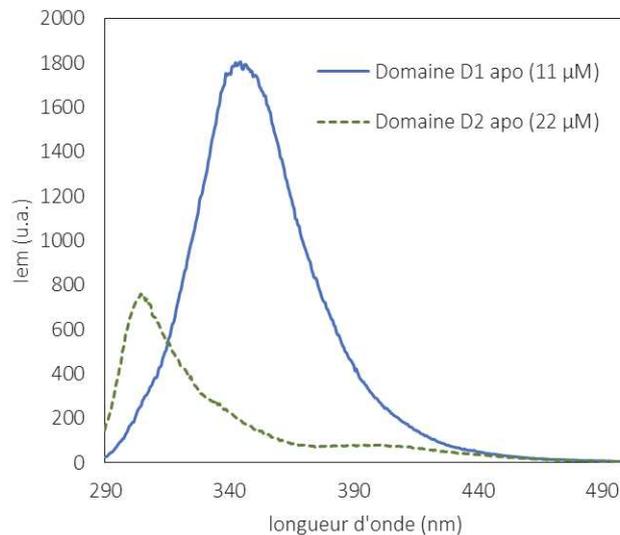


Figure 74 – Spectres des domaines D1 (11 μM) et D2 (22 μM) en fluorescence après excitation à la longueur d'onde d'absorption maximale en UV-Vis (275 nm pour D2 et 280 nm pour D1).

Dosages à pH physiologique en présence d'IDA

Les dosages ont été effectués par ajouts de quantités croissantes d'uranyle à pH 7,4 en présence d'acide iminodiacétique (IDA, 10 équivalents par domaine). Les dosages ont été suivis par fluorescence en excitant l'échantillon à une longueur d'onde caractéristique (280 nm pour D1 et 276 nm pour D2) (figure 75).

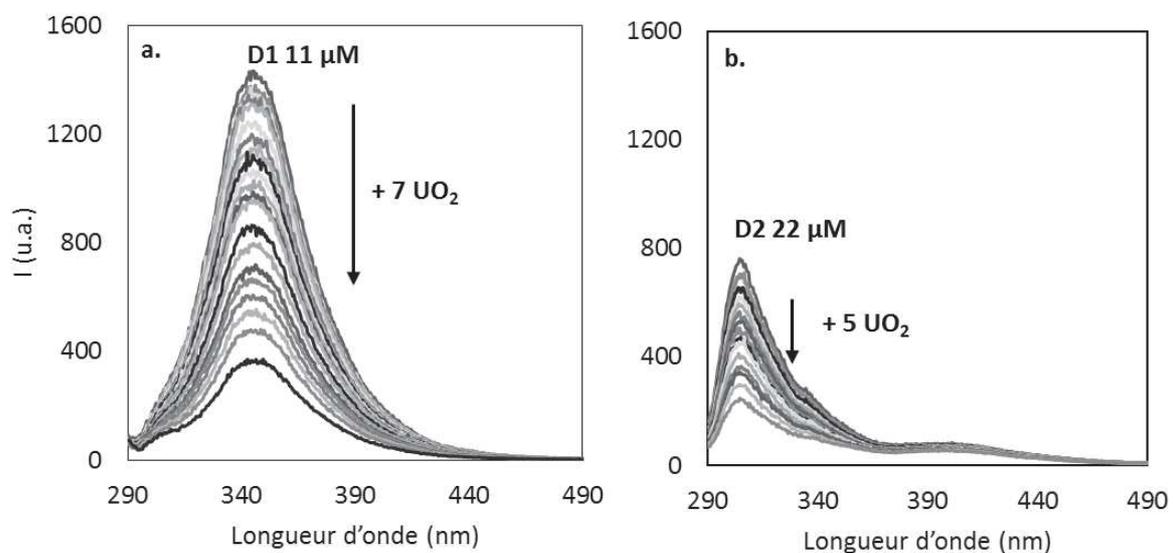
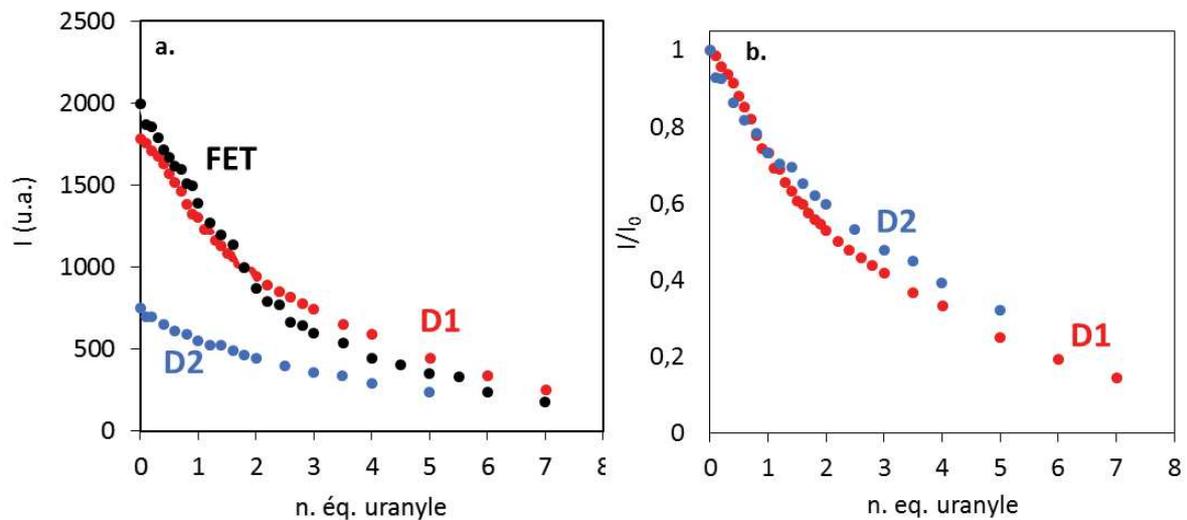


Figure 75 - Spectres de fluorescence des domaines de la FETUA en milieu Tris 50 mM / NaCl 150 mM à pH 7,4 par ajout d'uranyle. a. D1 (11 μM) et b. D2 (22 μM).

Les courbes d'extinction de fluorescence sont reportées en figure 76 en fonction des ajouts d'uranyle. La rupture de pente de la courbe d'extinction de fluorescence de D1 est moins marquée que celle de la FETUA, indiquant une affinité plus faible pour l'uranyle que la protéine entière. L'extinction de fluorescence de D2 est plus difficile à évaluer. L'extinction de fluorescence normalisée de D2 est similaire à celle de D1, sans tendance marquée toutefois (évolution quasi-linéaire). Elle indique néanmoins une interaction avec l'uranyle.



Evaluation de constantes apparentes de complexation par Specfit

Les constantes apparentes de formation des complexes ML domaine-uranyle ont été évaluées par modélisation des données obtenues par fluorescence à pH 7,4, à l'aide du logiciel Specfit, grâce à la présence du compétiteur IDA dont les constantes apparentes sont connues (figure 77). La stœchiométrie du ou des complexe(s) formé(s) avec les domaines D1 ou D2 étant inconnue, les ruptures de pentes étant peu marquées et aucune des études précédentes ne permettant d'obtenir l'information, nous avons donc choisi des modèles ne faisant intervenir qu'un seul complexe, le complexe ML. L'émission résiduelle des échantillons en présence de plusieurs équivalents d'uranyle implique que le complexe formé, s'il existe, ne permet pas, *a priori*, une extinction complète de la fluorescence des domaines.

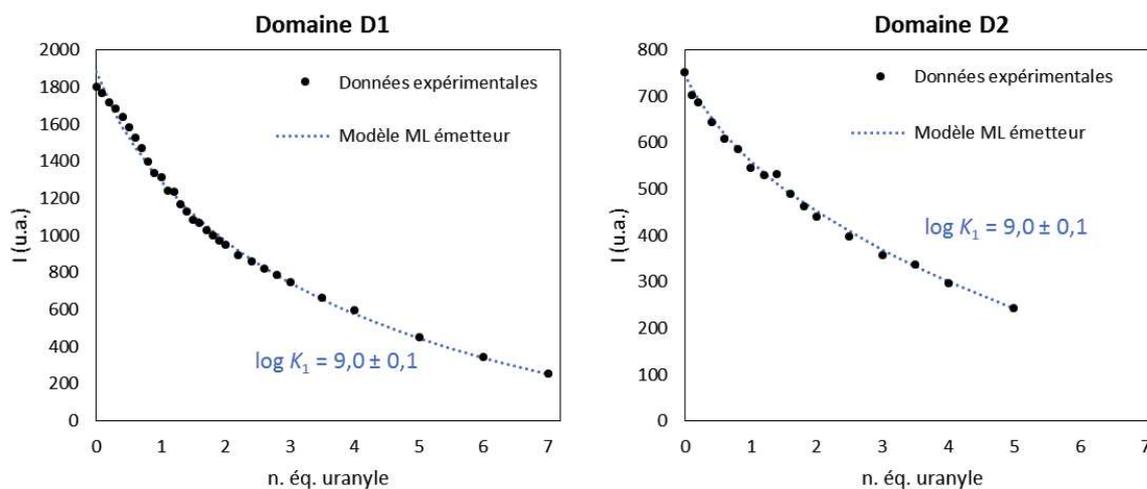


Figure 77- Courbe d'extinction de fluorescence de D1 et D2 à 340 nm et 305 nm et modélisation Specfit des données.

Pour D1, la modélisation des données obtenue est satisfaisante. La constante évaluée à partir de ce modèle est de $K_1 = 10^{9,0 \pm 0,1}$ à pH 7,4. Ces données sont directement comparables à celles de la FETUA car le même système de détection de l'interaction (extinction du tryptophane) a été exploité. Le complexe D1-uranyle est nettement moins stable que le complexe FETUA-uranyle, d'environ deux ordres de grandeur. La constante apparente de formation du complexe D1-uranyle est en revanche comparable aux constantes de formation successives des deuxième et troisième complexes FETUA-uranyle également déterminées par fluorescence ($\log K_{ml} = 8,8 - 9,5$). Pour le domaine D2, la constante apparente évaluée à pH 7,4 est de 8,5-9,0 selon le modèle sélectionné (ML émetteur ou non, ML émetteur montré en figure 77). Etant donné la faible intensité du signal et son évolution peu marquée, il apparaît nécessaire de confirmer la valeur à l'aide d'autres méthodes.

Les domaines D1 et D2 ont été étudiés à pH physiologique par RMN ainsi que par diverses techniques physico-chimiques (fluorescence, CD, EC-ICP-MS) dont les approches ont été validées sur la protéine entière en amont ou pendant le projet. L'évaluation des constantes apparentes de stabilité des complexes ML, M₂L et M₃L FETUA-uranyle a été réalisée par fluorescence pour la première fois : $\log K_1 = 11 \pm 1$, $\log K_2 = 9,5 \pm 0,5$ et $\log K_3 = 8,8 \pm 0,5$.

Pour D2, aucune interaction avec l'uranyle n'a été observée par RMN. En revanche les résultats obtenus par fluorescence, CD et EC-ICP-MS tendent à confirmer qu'il y a bien interaction du domaine avec le métal. Malgré son repliement correct, les résultats obtenus indiquent que D2 ne présente pas le site de haute affinité de la FETUA. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le domaine D1, dont la surface présente un cluster acide identifié par bioinformatique, serait le domaine le plus affiné pour l'uranyle et qu'un ou plusieurs sites de fixation du métal seraient localisés sur D1. Cette hypothèse n'a toutefois pas pu être validée, D1 ayant été obtenu sous forme de « *molten globule* » partiellement déstructuré. L'ensemble des résultats obtenus avec D1 convergent cependant vers l'existence d'un site de liaison du métal dont l'affinité ($\log K_1 = 9,0$) est plus faible que celle de la FETUA. Le site de fixation de l'uranyle sur D1 partiellement déstructuré pourrait être (i) un site non représentatif de ceux existant sur la protéine en raison de la modification de structure tridimensionnelle, (ii) un site local dont l'existence n'est pas impactée par la structure du domaine, ni celle de la protéine et dont l'affinité pour l'uranyle est proche de celle des deux sites de complexation de moindre affinité sur la FETUA.

4 Conclusion

Le premier axe du projet portait sur l'identification des sites d'interactions entre l'uranyle et la FETUA à l'aide d'une méthode structurale, la RMN multidimensionnelle à haut champ, technique pertinente pour étudier des macromolécules difficiles à cristalliser. Pour les besoins du projet, la FETUA a été découpée en trois sous-unités qui correspondent aux trois domaines de la protéine. Les domaines de type cystatine D1 et D2 ont des caractéristiques structurales et une capacité de coordination de l'uranyle intéressantes. Le domaine D1 est en partie constitué d'un patch hydrophile de surface négativement chargé propice à la liaison de l'uranyle.

La production des domaines sous forme recombinante marquée $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ s'est avérée longue, et complexe en ce qui concerne le domaine D1. Si le domaine D2 a pu être produit et purifié sans difficulté majeure, le domaine D1 a conduit à la formation de corps d'inclusion. D1 n'a pu être obtenu avec le repliement adéquat une fois purifié malgré les nombreuses conditions de production, de dénaturation et de renaturation qui ont été testées et optimisées pour favoriser sa solubilisation et son repliement.

Les difficultés à obtenir D1 sous sa forme structurée de type cystatine se sont répercutées sur l'ensemble des résultats obtenus. Néanmoins, l'interaction D1-uranyle a été confirmée à l'aide des quatre techniques d'analyse que nous avons utilisées avec les domaines marqués. Les constantes apparentes de la FETUA ont été évaluées par fluorescence. La constante obtenue pour le site de haute affinité ($K_1^{\text{pH}7,4} = 10^{11}$) est cohérente avec les études menées précédemment en SPR ($K_1^{\text{pH}7,4} = 10^{11,4}$), ce qui a permis de valider la méthode pour l'évaluation de la constante apparente du domaine D1, porteur de tryptophanes. L'affinité apparente de D1 pour l'uranyle est relativement élevée ($K_1^{\text{pH}7,4} = 10^9$) bien qu'inférieure à celle de la protéine entière sous sa forme native pour des conditions d'analyse identiques. Le site d'interaction de D1 pourrait soit être représentatif d'un site local de complexation de l'uranyle dans la FETUA, soit être un site non représentatif des sites d'interaction FETUA-uranyle en raison du repliement partiel de la protéine. Les résultats obtenus pour D2 sont plus difficile à évaluer : si l'étude RMN indique l'absence de toute interaction, les études par dichroïsme circulaire, électrophorèse capillaire et fluorescence semblent converger vers l'existence d'une interaction D2-uranyle dont l'affinité est faible et difficile à quantifier par fluorescence en raison de la faible émission du domaine qui ne contient pas de tryptophane.

La stratégie visant à étudier indépendamment les domaines de la FETUA a ses limites. En effet, il est possible que les interactions de la protéine avec l'uranyle impliquent plusieurs domaines *via* des liaisons

hydrogènes ou un agencement tridimensionnel favorable à la formation d'un site de liaison du métal plus ou moins enfoui. Le domaine D3 qui n'a pas été étudié pourrait également contribuer à la stabilité des complexes.

L'analyse des dosages par fluorescence s'est avérée complexe. Les paramètres nécessaires à la modélisation des données expérimentales (nombre et stœchiométrie des complexes considérés, extinction complète ou non de fluorescence) sont difficiles à maîtriser. Il est donc indispensable de mettre au point une méthode permettant d'évaluer rapidement la constante de complexation protéine uranyle, en s'affranchissant de ces différents paramètres. Pour ce faire, une stratégie consiste à s'affranchir de la fluorescence des protéines en utilisant la fluorescence d'une sonde dont les propriétés d'absorption et d'émission sont sélectives. Le chapitre IV de ce manuscrit présente une méthode rapide et simple d'évaluation de l'affinité d'une molécule grâce à une sonde peptidique fonctionnalisée par un fluorophore non naturel. La méthode proposée permet de classer et comparer différentes cibles de l'uranyle dans des conditions identiques.

CHAPITRE III – PEPTIDES MIMES DES INTERACTIONS URANYLE-OPN

Introduction au chapitre III

Cet axe d'étude du projet concerne les interactions entre l'uranyle et les phosphoprotéines, parmi lesquelles l'ostéopontine (OPN) est, comme nous l'avons au chapitre I, une cible pertinente dont l'affinité pour le cation uranyle est élevée à pH physiologique ($K_1 = 10^{11,5}$).^{68,111} Cette protéine ne présente aucune structure secondaire ou tertiaire définie, contrairement à la FETUA qui a une affinité similaire pour l'uranyle. Nous savons cependant que l'OPN se réorganise autour de l'uranyle, au gré des complexations, et est d'autant plus affine lorsqu'elle est phosphorylée. Les sites d'interaction uranyle-OPN sont multiples et difficiles à caractériser à l'aide des techniques structurales. Une à plusieurs fonctions phosphates semble(nt) impliquée(s) dans la sphère de coordination de l'uranyle.

Nous proposons donc d'étudier l'environnement de coordination de l'uranyle au sein de l'OPN, à l'aide d'une structure peptidique conçue *de novo* qui a pour objectif de rationaliser l'interaction entre la protéine et le métal. La synthèse versatile des peptides, leur taille relativement petite et leurs caractéristiques fonctionnelles et/ou structurales en font des molécules pertinentes pour mener des études ciblées et simplifiées. Un hexapeptide linéaire de séquence H₂N-pSDEpSDE-OH a par ailleurs été étudié par Safi *et al.* comme potentiel site d'interaction entre l'uranyle et l'OPN.¹¹¹ Cependant, les peptides linéaires n'ont pas de structures particulières et de nombreux exemples de peptides structurés dans la littérature démontrent leurs avantages pour contrôler la coordination des ions métalliques et augmenter l'affinité. Ghosh et Pecoraro ont conçus des peptides qui reproduisent trois hélices α afin d'étudier les phénomènes de structuration de métalloprotéines lors d'interactions avec des métaux divalents. Sénèque *et al.* ont synthétisé un cyclodécapeptide modèle contenant la boucle de liaison du cuivre au sein de la métallochaperonne Atx1 associé à un coude β . La simplification du site d'interaction a permis une étude ciblée du site.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Des structures cycliques à 10 résidus contenant deux coudes β ont été développées par Dumy et Mutter dans les années 1990.^{147,148} Elles ont été reprises au laboratoire pour la complexation de terres rares¹⁴⁹ ou du cuivre¹⁵⁰. Plus récemment notre équipe a mis en évidence l'adéquation entre cette structure et la géométrie de coordination de l'uranyle.

L'origine de la structure cyclodécapeptidique, l'apport de chaque méthode de caractérisation des interactions uranyle-cyclodécapeptides et le candidat polyglutamate finalement choisi comme référence pour notre projet sont présentés en section 1. Les stratégies de synthèse développées pour la conception de peptides à une ou plusieurs fonctions phosphorylées sont présentées respectivement en sections 2 et 3. L'impact du nombre, de la nature, et du positionnement des résidus phosphorylés sur la complexation de l'uranyle sont évalués et discutés pour chaque famille de peptides.

1 Peptide de référence polyglutamate A1

L'ensemble des travaux présentés dans cette section ont été menés par notre équipe et sont antérieurs à mes travaux de thèse.

1.1 Des cyclodécapeptides structurés en feuillets β

La première structure cyclodécapeptidique conçue présente deux motifs proline-glycine (coudes β de type II) et quatre lysines. Elle a été développée par Mutter et Dumy dans les années 1990 pour la conception de TASP (*Template Assembled Synthetic Proteins*), des mimes de sites fonctionnels de protéines naturelles.^{147,148} Les travaux menés au laboratoire ont montré que la synthèse versatile de ces structures permettait de moduler la structure et/ou l'affinité du peptide pour divers ions métalliques afin d'adapter son design à la complexation du cuivre, des lanthanides et de l'uranyle (figure 78).¹⁴⁹⁻¹⁵¹

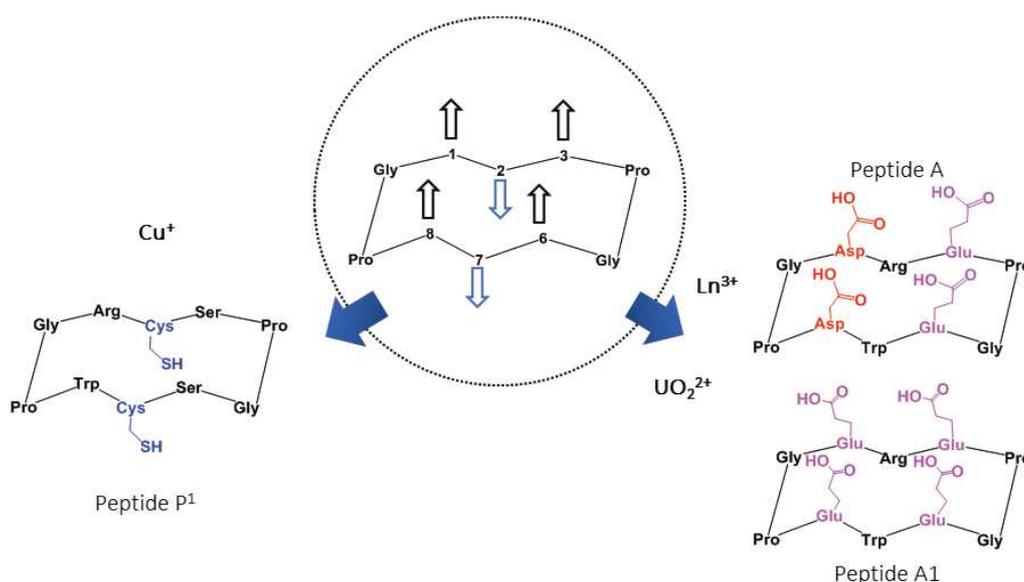


Figure 78 – Cyclodécapeptides développés au laboratoire pour la complexation de cations métalliques. Les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la liaison du cation sont développées.

Les deux coudes Pro-Gly organisent la structure en feuillet β et permettent de distinguer deux faces : l'une présentant les chaînes latérales des quatre acides aminés aux positions 1, 3, 6 et 8 et l'autre présentant les chaînes latérales des deux acides aminés aux positions 2 et 7 (figure 78). La structure de plus basse énergie du cyclodécapeptide polyacide A c(DREPGEWDPG) en solution montre que l'agencement des fonctions carboxylates est approprié à la géométrie de coordination de l'uranyle (figure 79).¹⁴⁹

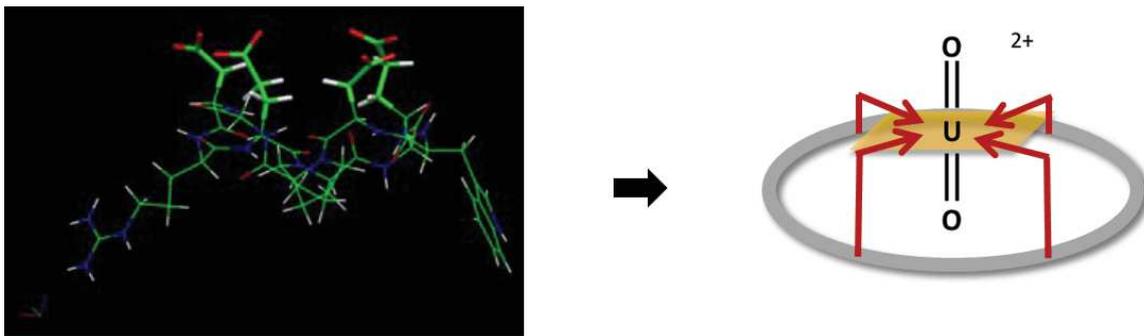


Figure 79 - Structure de plus basse énergie calculée pour le peptide A à partir de contraintes RMN en solution. Les chaînes latérales des acides aminés positionnés en 1, 3, 6 et 8 sont toutes orientées dans la même direction. Leur prédisposition est idéale pour la complexation du dioxocation linéaire UO_2^{2+} .

Les décapeptides conçus par notre équipe comportent des aspartates ou glutamates en positions 1, 3, 6 et 8. Ces résidus sont, comme nous l'avons vu au chapitre I, porteurs de fonctions carboxylates. Ce sont de bons chélateurs pour l'uranyle. Une arginine est introduite en position 2. Ce résidu favorise la solubilisation du peptide en milieu aqueux grâce à sa fonction guanidinium. Enfin, un tryptophane est introduit en position 7. Le noyau indole du tryptophane absorbe à une longueur d'onde de 280 nm et émet une fluorescence à 350 nm. Ce résidu permet de sonder l'interaction uranyle-peptide lors de dosages suivis par fluorescence.

L'interaction peptide-uranyle a été étudiée avec les cyclodécapeptides A, A1, A4 et B1 ainsi qu'avec le décapeptide linéaire B2. Leurs séquences sont renseignées dans le tableau 10 ci-après. Les peptides A, A1 et A4 ont permis d'étudier l'effet de l'acide aminé coordonnant sur la stabilité du complexe formé avec l'uranyle, tandis que les peptides B1 et B2 ont permis d'étudier l'effet de structure lors de la complexation.

Tableau 10- Séquences de peptides polyacides étudiés par Lebrun et al.¹⁵¹

Peptide	Séquence	Objectif
A – peptide polyacide mixte	c(DREPGEWDPG)	Influence des acides aminés coordonnants
A1 – peptide polyglutamate	c(EREPGEWEPG)	
A4 – peptide polyaspartate	c(DRDPGDWDPG)	
B1– peptide polyacide mixte à boucle	c(DREPGEWDSG)	Evaluation de l'impact de la structure
B2 - peptide polyglutamate linéaire	Ac-EREPGEWEPG-NH ₂	

1.2 Interaction entre les cyclodécapeptides et l'uranyle

L'interaction peptide-uranyle est observée à l'aide de diverses techniques : spectrométrie de masse, dichroïsme circulaire (CD), spectroscopie de fluorescence. Chaque technique apporte, comme nous

l'avons vu dans le chapitre I pour le CD et la fluorescence, des informations complémentaires sur la structure, la stabilité et la stœchiométrie des complexes formés.

1.2.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse couplée à une source électrospray (ESI-MS) permet une ionisation douce des échantillons et donc la conservation de complexes non covalents. Elle permet d'analyser les espèces en fonction du ratio masse/charge et peut apporter une information qualitative concernant la stœchiométrie des complexes. Grâce à la fragmentation par MS/MS on peut également obtenir des données structurales sur le complexe. L'ESI-MS n'est généralement pas adaptée à l'étude des complexes protéines-uranyle car la faible différence de masse observée entre une protéine seule et le complexe protéine-uranyle est faible pour des protéines de poids moléculaires élevés. Par ailleurs, certaines protéines peuvent avoir subi des modifications post-traductionnelles et donc des variations de poids moléculaire. Les spectres obtenus sont alors plus difficiles à interpréter. Si cette technique n'a pas été employée sur les cibles protéiques de l'uranyle à ce jour, elle est en revanche très adaptée à l'étude de complexes peptides-uranyle, les peptides ayant un poids moléculaire plus faible. Par exemple, le cyclodécapeptide polyglutamate A1 a une masse moléculaire de 1167,2 g/mol alors que l'OPN a un poids moléculaire de 60 000 g/mol.

Les peptides polyglutamates cyclique et linéaire (A1 et B2) et le peptide polyaspartate (A4) ont été analysés par ESI-MS dans des conditions identiques. Les spectres obtenus en présence d'un équivalent de métal montrent qu'il y a formation de complexes de stœchiométrie 1:1 M:L pour ces trois peptides (figure 80).

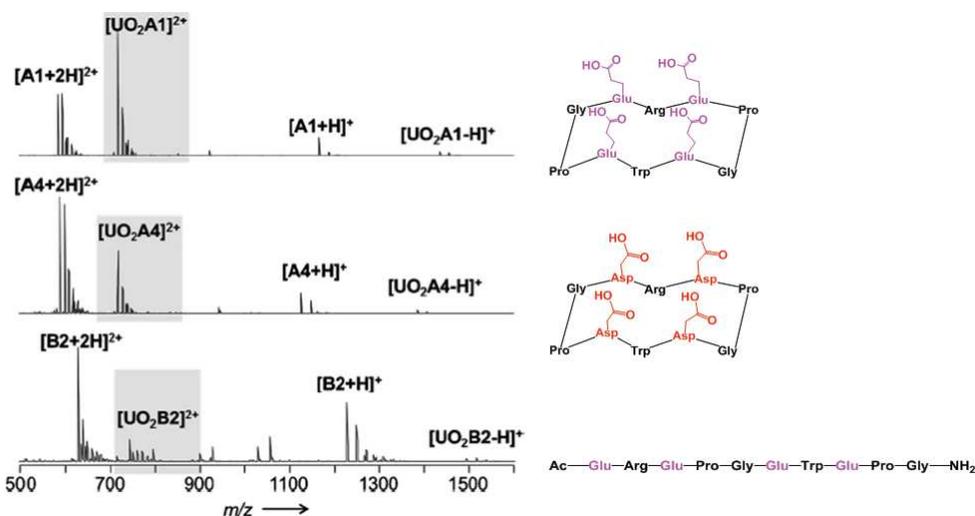


Figure 80- Spectres de masse (+)-ESI-MS des peptides A1, A4 et B2 en présence d'uranyle en proportions stœchiométriques (tampon acétate d'ammonium, pH 7). Surligné en gris : signal correspondant à l'espèce dichargée du complexe monométallique. Source : Lebrun et al.¹⁵¹

Les peptides sont ici de structures et de de tailles similaires, notamment A1 et A4 qui présentent le même état de charge et la même structure cyclique. Cela permet de comparer les résultats obtenus par spectrométrie de masse. Une différence d'intensité est observée pour les signaux correspondant aux espèces dichargées des complexes ML formés avec A1 et A4, indiquant que la complexation de l'uranyle est plus favorable en présence de glutamates que d'aspartates. Par ailleurs, le signal correspondant à l'espèce dichargée du complexe ML $[\text{UO}_2\text{B}_2]^{2+}$ est de très faible intensité en comparaison au signal correspondant à l'espèce dichargée du peptide libre $[\text{B}_2+2\text{H}]^{2+}$. La complexation de l'uranyle semble donc favorisée avec un peptide de structure cyclique. Ces résultats ont été confirmés par fluorescence par la suite (voir section 1.2.3).

1.2.2 Dichroïsme circulaire

Le CD apporte des informations sur la structure secondaire d'une molécule ou d'un complexe et éventuellement sur la stœchiométrie des complexes. La présence de deux coudes β de type II induit la formation d'un feuillet β antiparallèle, dont la signature en CD est caractéristique (bande positive aux alentours de 195 nm et bande négative vers 224 nm).

Le spectre dichroïque de A1 à pH 6,0 (figure 81a) montre que le peptide présente en réalité une conformation aléatoire lorsqu'il est libre en solution car les chaînes latérales fonctionnalisées par des acides carboxyliques sont déprotonnées et entrent en répulsion, ce qui altère la structure en feuillet β . Sous l'effet de la complexation, l'amplitude du signal augmente jusqu'à atteindre un ratio 1:1 métal:ligand, puis atteint un plateau à 1 équivalent témoignant de l'absence d'espèces polymétalliques.

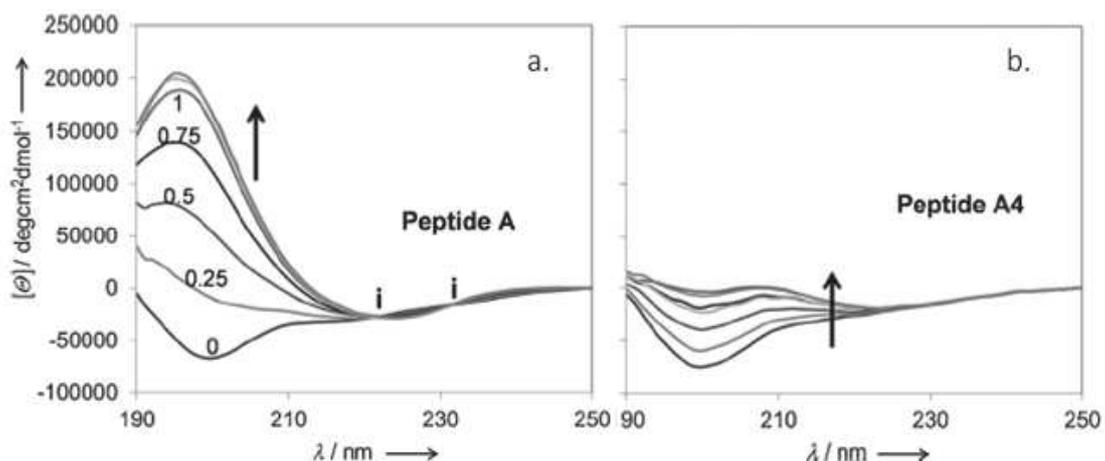


Figure 81- Spectres dichroïques des peptides A1 (polyglutamate) et A4 (polyaspartate) en présence de quantités croissantes d'uranyle ; i indique un point isodichroïque. Expérience réalisée à pH 7,0 en milieu aqueux non tamponné. Source : Lebrun et al.

L'augmentation du signal aux alentours de 200 nm indique la formation d'un complexe ML structuré en feuillet β . Des différences entre les spectres des peptides polyglutamate A1 et polyaspartate A4 sont observées et traduisent des différences de comportement en termes de structuration. Dans le cas du peptide A4, l'évolution du signal est moins importante que pour le peptide A1 après formation du complexe ML (figure 81b), indiquant une moindre structuration du complexe. Les courtes chaînes des aspartates induisent des contraintes stériques qui peuvent empêcher la structuration du complexe en feuillet β .

1.2.3 Spectrométrie de fluorescence

Comme nous l'avons vu au chapitre II pour l'interaction uranyle-FETUA, une décroissance de la fluorescence du tryptophane due à un effet d'atome lourd externe est observable lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle. L'uranyle favorise le croisement inter-système ($S_1 \rightarrow T_1$) puis le retour à l'état fondamental s'opère *via* des processus non radiatifs (figure 82b).¹⁵² Le complexe peptide-uranyle n'est pas émetteur de fluorescence (figure 82a).

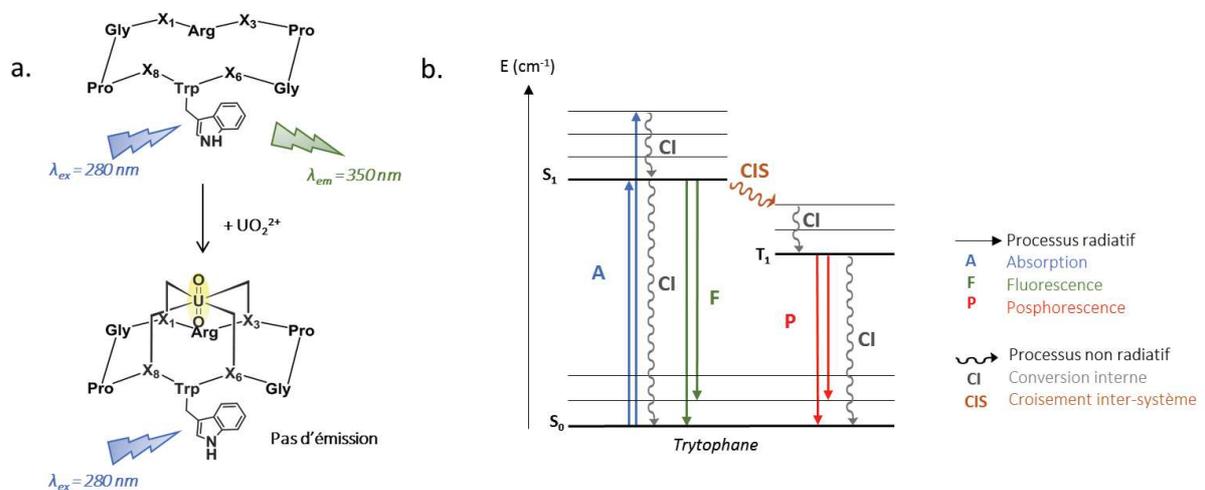


Figure 82 – a. schéma illustrant l'extinction de fluorescence du tryptophane par effet d'atome lourd lors de la formation du complexe uranyle-peptide – b. Diagramme Perrin-Jablonski du tryptophane

La présence d'IDA (10 équivalents) permet de contrôler les phénomènes d'hydrolyse du cation uranyle et d'évaluer la constante apparente de complexation peptide-uranyle à pH donné (voir chapitre I, section 2.2). La fluorescence du peptide A1 en présence de 10 équivalents d'IDA a été suivie lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle (figure 83).

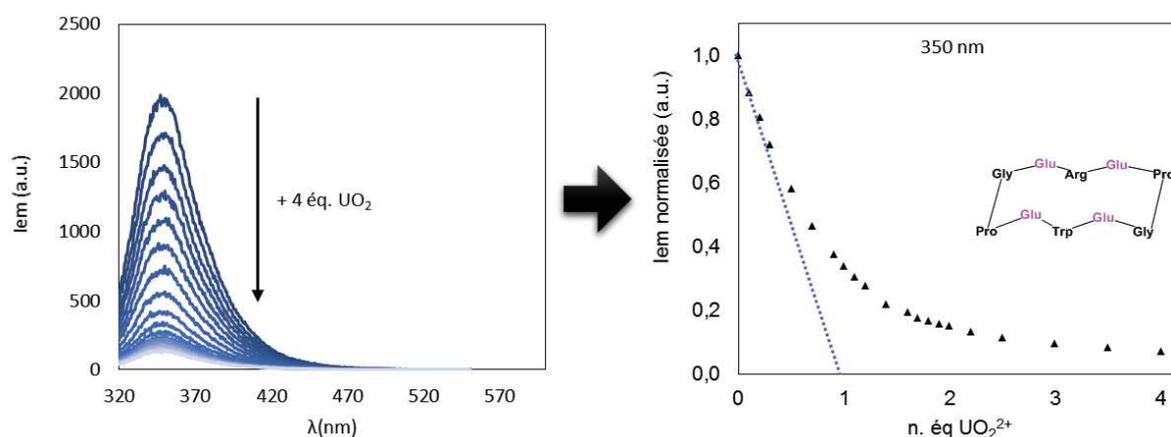
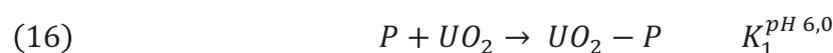


Figure 83 – Spectres de fluorescence et courbe d'extinction de fluorescence obtenus par dosage du peptide A1 (10 μ M en milieu MES 20 mM, NaCl 100 mM à pH 6,0) en présence d'IDA (10 équivalents) par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Source : Lebrun et al.¹⁵¹

Une extinction de fluorescence significative est observée et la courbe d'extinction de fluorescence présente une rupture de pente à 1 équivalent d'uranyle, ce qui est cohérent avec la formation d'un complexe monométallique ML. L'analyse de ces résultats à l'aide du logiciel SPECFIT permet de calculer la constante apparente de formation du complexe ML dont l'équilibre est défini par l'équation 16.



Les valeurs de constantes obtenues pour les peptides A, A1, A4, B1 et B4 en prenant en compte l'interaction avec l'IDA sont renseignées dans le tableau 11 ci-après.

Tableau 11- Constantes apparentes de stabilité des complexes monométalliques évaluées à partir des données de fluorescence obtenues à pH 6,0 en tampon MES 20 mM, NaCl 100 mM, à 25 °C.

Peptide	log K_1 à pH 6,0
A	8,1 \pm 0,1
A1	8,2 \pm 0,1
A4	7,2 \pm 0,1
B1	7,5 \pm 0,1
B2	< 7

Impact de la nature des acides aminés chélateurs sur la stabilité des complexes ML : A, A1 et A4

Les peptides A et A1 ont des affinités comparables pour l'uranyle ($10^{8,1}$). La constante apparente de formation du complexe ML est en revanche divisée par 10 lorsque les quatre glutamates (A1) sont remplacés par quatre aspartates (A4, $K_1 = 10^{7,2}$). Le peptide polyglutamate A1 forme donc un complexe

plus stable avec l'uranyle que le peptide polyaspartate A4. Les glutamates ont une chaîne latérale plus longue que les aspartates (figure 84). Deux effets en résultent. D'une part, l'effet électroattracteur du squelette peptidique est plus important avec l'aspartate dont la chaîne est plus courte. Les glutamates sont ainsi plus basiques que les aspartates ($pK_a(\text{Glu}) \approx 4,2$ et $pK_a(\text{Asp}) \approx 3,7$) ce qui explique que l'interaction glutamate-uranyle soit plus favorable. D'autre part, la flexibilité des chaînes latérales des glutamates est plus importante et permet un meilleur agencement des carboxylates dans le plan équatorial de l'uranyle. Ces résultats corroborent les résultats obtenus en CD (voir section 1.2.2).

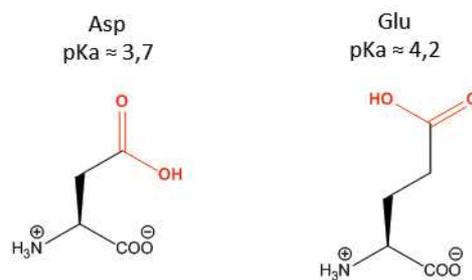


Figure 84 - pK_a des chaînes latérales des acides aminés Glu et Asp Source : Henchoz et al.¹⁵³

Impact de la structure du ligand sur la stabilité des complexes ML : A1, B1 et B2

Un effet de structure important est observé. L'introduction d'un degré de flexibilité trop important nuit à la stabilité des complexes décapeptide-uranyle comme en témoignent les courbes de complexation des peptides A1, B1 et B2 (figure 85) et les constantes apparentes de complexation évaluées à partir de ces données (tableau 11). L'introduction d'une boucle Ser-Gly, moins rigide qu'un coude Pro-Gly, ou la linéarisation de la séquence peptidique impliquent une perte de stabilité pour le complexe ML, d'au moins un ordre de grandeur.

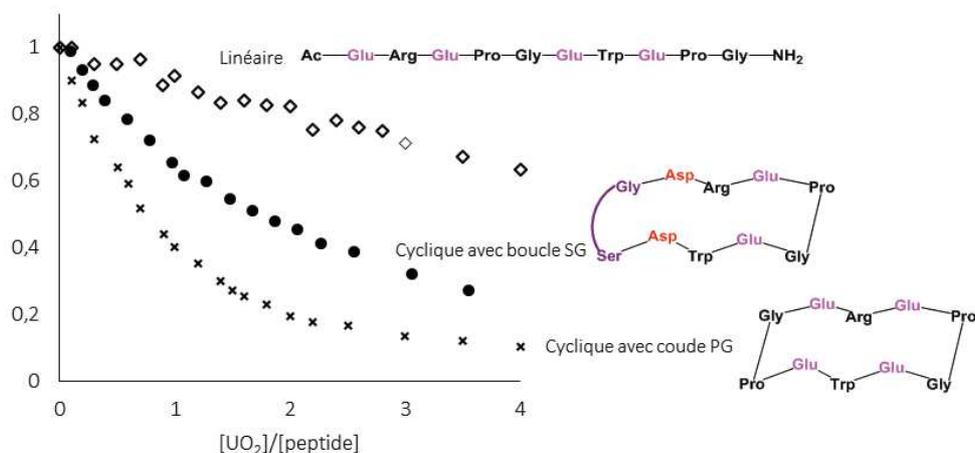


Figure 85 - Extinction de fluorescence des peptides A1, B1 et B2 ($10 \mu\text{M}$ en milieu MES 20 mM, NaCl 100 mM à pH 6,0, en présence d'IDA (10 équivalents) par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Source : Lebrun et al.¹⁵¹

Pour conclure, la structure cyclodécapeptidique est adaptée à la géométrie de coordination de l'uranyle. La préorganisation du peptide est induite par la présence de deux coudes β Pro-Gly et est favorable au positionnement des chaînes latérales des acides aminés situés en positions 1, 3, 6 et 8 dans une même direction. Les peptides B1 et B2 aux structures plus flexibles ont des affinités plus faibles pour l'uranyle. Par ailleurs, la présence de quatre acides aminés coordonnant aux chaînes latérales plus courtes (aspartates, sur A4) introduit des contraintes supplémentaires défavorables à la formation du complexe ML et à sa structuration en feuillet β .

Les résultats obtenus par notre équipe indiquent que les cyclodécapeptides A (polyacide mixte) et A1 (polyglutamate) sont les candidats les plus appropriés pour étudier la complexation de l'uranyle. Leurs affinités similaires sont les plus élevées parmi les peptides étudiés ($\log K_1 = 8,1-8,2$) et les complexes ML formés sont mieux structurés. Nous avons donc sélectionné le peptide polyglutamate A1 comme peptide de référence, ses 4 chaînes latérales étant identiques, et plus basiques.

2 Peptides monophosphorylés : quel est le rôle de la fonction phosphate lors de la complexation de l'uranyle?

2.1 Synthèse des peptides

2.1.1 Synthèse peptidique sur support solide

Les peptides sont synthétisés en présence d'activateur et de base par couplages successifs d'acides aminés protégés en fonction N-terminale et au niveau de la chaîne latérale. La fonction acide carboxylique d'un acide aminé réagit avec la fonction amine d'un autre acide aminé. Cette réaction de couplage permet la formation de la liaison peptidique (figure 86).

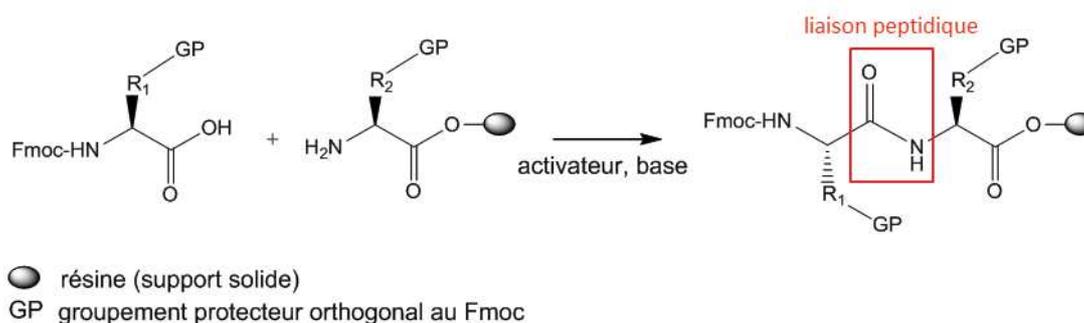


Figure 86- formation d'une liaison peptidique par SPPS stratégie Fmoc/tBu

La synthèse peptidique peut se faire en phase liquide homogène ou bien sur support solide (SPPS – *solid phase peptide synthesis*). La SPPS a été développée par R. Merrifield au cours des années 1960.¹⁵⁴ Cette stratégie a rendu possible la synthèse de peptides jusqu'alors impossible en raison de difficultés liées à la longueur de chaîne ou au manque de solubilité des intermédiaires. Deux stratégies de synthèse sur support solide existent. Elles reposent sur l'utilisation d'un groupe protecteur en position N-terminale : le 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) ou le *tert*-butoxycarboxyle (Boc). Les conditions d'élimination du groupement protecteur sont différentes pour ces deux groupes : en conditions acides (acide trifluoroacétique) pour le Boc et en conditions basiques (pipéridine) pour le Fmoc.¹⁵⁵ Dans le cas d'une stratégie Fmoc, des groupements protecteurs orthogonaux tels des benzyles ou des *tert*-butyles sont utilisés pour protéger les éventuelles fonctions réactives portées par les chaînes latérales : alcool, amine, acide carboxylique, etc. Cela permet de prévenir les réactions parasites menant à une chute drastique de rendement et à la présence de nombreux peptides de délétion.

2.1.2 Introduction d'acides aminés phosphorylés : nature et position

La synthèse de peptides phosphorylés peut être réalisée par introduction lors de la SPPS de résidus phosphorylés dont la chaîne latérale est protégée.¹⁵⁵ Plusieurs résidus phosphorylés sont disponibles commercialement. *In vivo*, la réaction post-traductionnelle de phosphorylation peut se faire sur des acides aminés de natures différentes. La sérine est l'acide aminé le plus couramment phosphorylé *in vivo*. Chez les organismes eucaryotes, pour 1000 sérines phosphorylées, seules 100 thréonines et 1 tyrosine sont phosphorylées. La phosphothréonine a cependant une incidence biologique importante puisqu'elle permet, par exemple, de contrôler l'activité d'un grand nombre de facteur de croissance. Par ailleurs, 42 sérines, 14 thréonines et 8 tyrosines sont comptabilisées dans la séquence de l'OPN humaine (figure 87).

MRI	AVICFCL	LGITCAIPVK	QADSGSSEEK	QLYNKYPDAV	ATWLNPDPSQ
60	70	80	90	100	
KQNLLAPQNA	VSSEETNDFK	QETLPSKSNENE	SHDHMDMDD	EDDDDHVDSQ	
110	120	130	140	150	
DSIDSNSDD	VDDTDDSHQS	DESHHSDES	ELVTDFPTDL	PATEVFTIPVV	
160	170	180	190	200	
PTVDITYDGRG	DSVVYGLRSK	SKKFRRPDIQ	YPDATDEDIT	SHMSEELNG	
210	220	230	240	250	
AYKAIPVAQD	LNAPSDWDSR	GKDSYETSQ	DDQSAETHSH	KQSRLYKRKA	
260	270	280	290	300	
NDESNEHSDV	IDSQELSKVS	REFHSHFHS	HEDMLVVDPK	SKEEDKHLKF	
310					
RISHELD	SAS	SEVN			

Figure 87 - Séquence de l'OPN humaine. Peptide signal [1-16] ; Protéine [17-314]. Source : UniProt. Les sérines (S, en vert), thréonines (T, en rose) et tyrosines (Y, en bleu) sont des acides aminés phosphorylables.

Deux types de résidus phosphorylés, le Fmoc-Ser(OPO(OH)(OBzl))-OH et le Fmoc-Thr(OPO(OH)(OBzl))-OH, ont donc été introduits dans les peptides au cours de la SPPS. Seule la présence d'un méthyle en position β de la chaîne latérale différencie la phosphothréonine (pThr) de la phosphosérine (pSer) (figure 88).

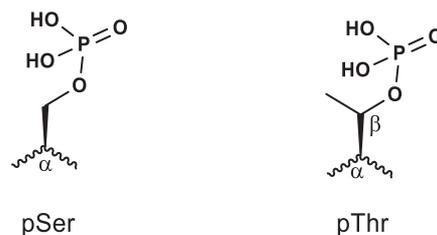


Figure 88 – Phosphosérine (pSer) et phosphothréonine (pThr)

La SPPS permet de réaliser des synthèses versatiles. La phosphosérine peut être introduite dans quatre positions différentes au sein du cyclodécapeptide : 1, 3, 6 ou 8. Quatre peptides monophosphorylés pS(X) ont donc été conçus avec une pSer en position X (figure 89). Pour l'un de ces peptides la pSer a été remplacée par une pThr.

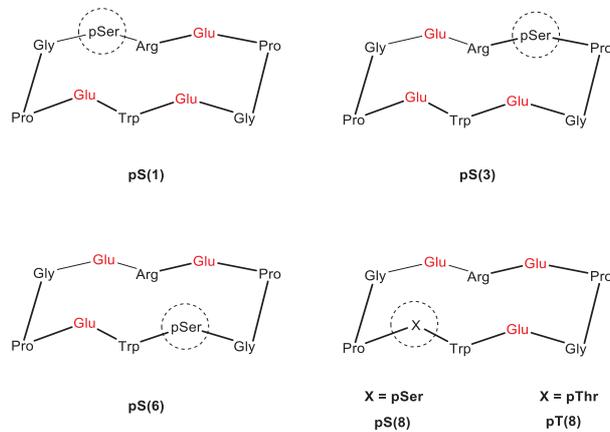


Figure 89 - Candidats monophosphorylés pS(1), pS(3), pS(6), pS(8) et pT(8)

2.1.3 Stratégie de synthèse des peptides monophosphorylés

La figure 90 schématise la stratégie de synthèse employée pour la conception des cyclodécapeptides. Le protocole de synthèse est détaillé en partie expérimentale.

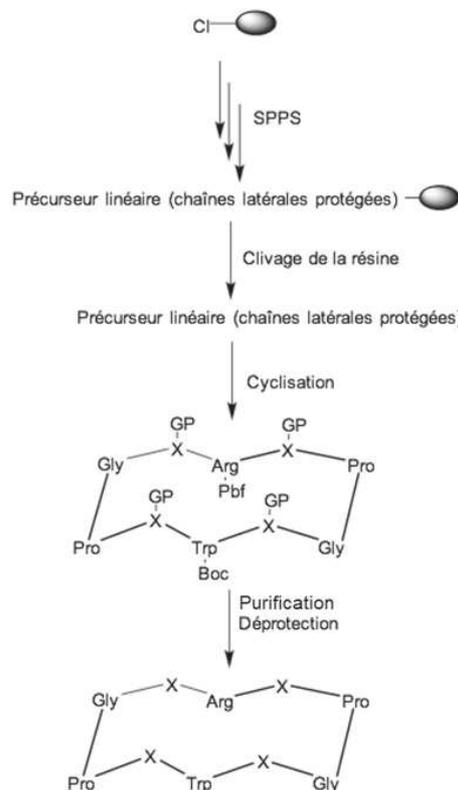


Figure 90 - Stratégie de synthèse des peptides monophosphorylés. X = Glu ou pSer ; GP = ^tBu ou Bzl

Support SPPS

Le support de synthèse choisi est la résine commerciale chlorure de 2-chlorotrytyle (100-200 mesh, 1% DVB) (figure 91). Il s'agit d'un support acido-labile se clivant en milieu acide dilué (1% de TFA dans le dichlorométhane) et donc particulièrement adapté à la synthèse de peptides linéaires avec des chaînes latérales protégées par des groupes partant en milieu acide concentré (typiquement TFA 95%).

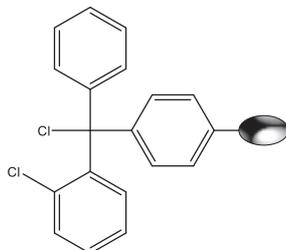


Figure 91 - Résine utilisée pour la SPPS : chlorure de 2-chlorotrytyle

Précurseur linéaire

Les précurseurs linéaires protégés sont synthétisés par SPPS, par stratégie Fmoc/^tBu. Ils sont synthétisés soit manuellement, soit de façon automatisée avec assistance d'un réacteur à micro-ondes, en présence de PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium) (activateur) et de DIEA (N,N-diisopropyléthylamine) (base). La résine employée est adaptée à l'utilisation d'un réacteur à micro-ondes pour des températures ne dépassant pas 40 °C. L'activation permet de chauffer le milieu réactionnel de façon contrôlée et reproductible d'un couplage à l'autre, et améliore la cinétique de réaction, notamment pour des acides aminés difficiles à coupler comme l'arginine.¹⁵⁶

L'adaptation d'un protocole de synthèse SPPS manuel à un synthétiseur automatique assisté par réacteur à micro-ondes s'avère parfois longue et difficile. Dans le cas des peptides phosphorylés, des optimisations ont été effectuées en amont de mon arrivée au laboratoire. La synthèse automatisée n'assure pas nécessairement un meilleur rendement ou une plus haute pureté de produit. Elle garantit néanmoins un réel gain de temps une fois le protocole adapté. Le précurseur linéaire protégé est clivé de la résine manuellement, par traitement acide (1% TFA).

Précurseur cyclisé protégé

La cyclisation consiste en une réaction de couplage en présence de PyBOP et de DIEA entre la fonction acide C-terminale et la fonction amine N-terminale au sein du même peptide. La réaction intramoléculaire est favorisée en milieu dilué.

Peptide cyclique final

Le peptide cyclique obtenu est purifié par HPLC préparative puis traité avec une solution à 95% TFA, ce qui déprotège les chaînes latérales et génère le cyclodécapeptide brut qui est également purifié par HPLC préparative. Les peptides monophosphorylés ont été obtenus avec environ 20% de rendement à partir du greffage du premier acide aminé (glycine en position 10).

2.1.4 Sous-produit fluorophosphate

L'une des étapes clés de la synthèse est la purification du produit final, qui s'est avérée délicate à cause de la présence de peptides fluorophosphates non désirés (figure 92).

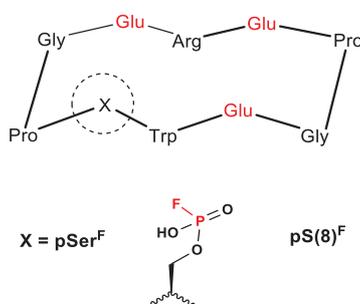


Figure 92 - Sous-produit fluorophosphate isolé lors de la synthèse de pS(8)

La formation de tels composés a été observée lors de la synthèse de peptides par stratégie voie A, c'est-à-dire sans purification du composé intermédiaire cyclique (figure 93). Les sous-produits fluorés pS(X)^F sont difficiles à éliminer par HPLC préparative car leur temps de rétention est très proche voire identique à celui du produit pS(X) correspondant.

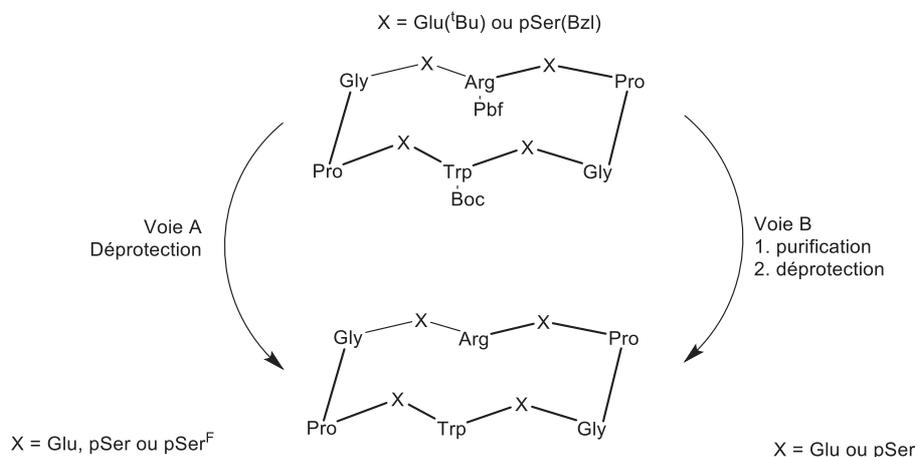


Figure 93 - Voies A et B proposées pour la synthèse de produits phosphorylés

Le mécanisme de formation d'un tel sous-produit n'est pas connu. Néanmoins, nous pensons que la présence d'activateur (PyBOP) provenant de l'étape de cyclisation, et de fluorures résiduels provenant du réactif utilisé pour la déprotection (TFA) sont responsables d'une telle modification (figure 94).

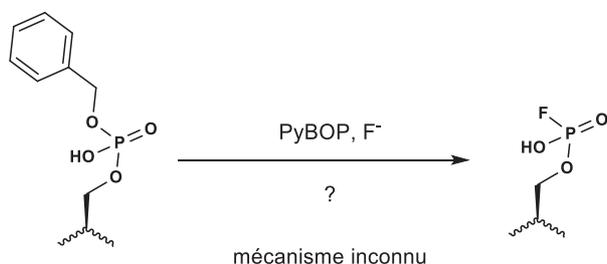


Figure 94- Hypothèse de formation du fluorophosphate

Au cours de la synthèse de pS(8) (voie A), le produit désiré pS(8) et le sous-produit fluorophosphate pS(8)^F ont été isolés puis caractérisés par RMN du fluor et du phosphore (figure 95).

Pour pS(8)^F la présence d'une liaison P—F, caractérisée par un couplage ¹J de 939 Hz, a été confirmée. Cette valeur de couplage est comparable aux données référencées dans la littérature pour des liaisons P—F de fonctions fluorophosphates.¹⁵⁷

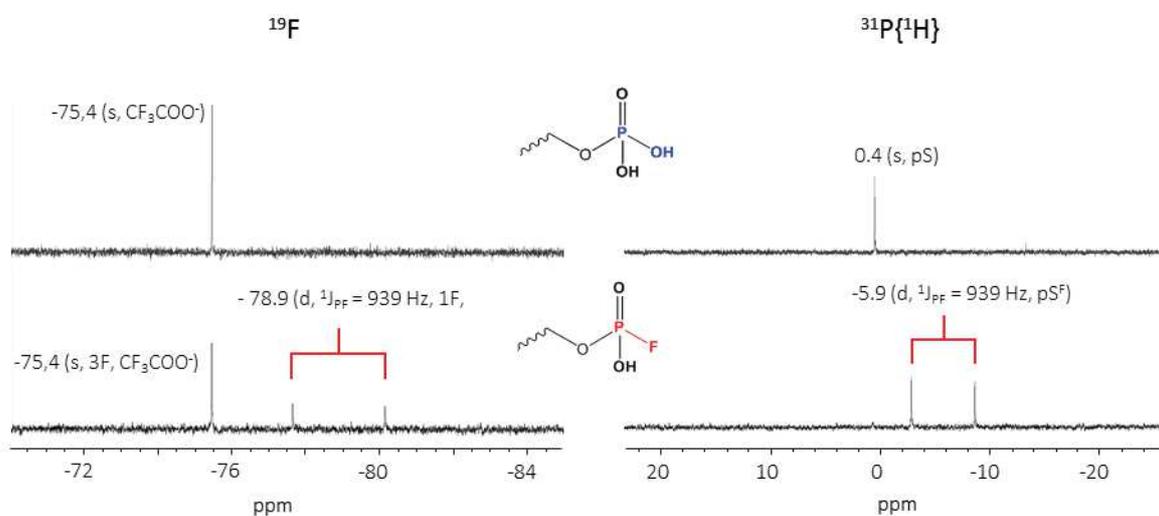


Figure 95 - Spectres RMN ³¹P{¹H} (162 MHz) et ¹⁹F (376 MHz) de pS(8) et pS(8)^F. Solvant : H₂O/D₂O 90/10 v/v ; 298 K.

Le peptide pS(8)^F a pu être isolé du peptide pS(8), mais les produits fluorophosphates pS(X)^F ont des temps de rétention très proches voire identiques aux temps de rétention des produits pS(X). Nous avons donc introduit une purification intermédiaire (figure 93, voie B) afin d'éliminer les résidus de PyBOP provenant de l'étape de cyclisation. Bien que coûteuse en temps et en solvants, cette voie de synthèse permet l'obtention de cyclodécapeptides monophosphorylés purs comme en témoigne la

caractérisation par ESI-MS des produits bruts obtenus par les voies A et B : la purification de l'intermédiaire cyclisé protégé permet de s'affranchir de la formation du sous-produit fluorophosphate (figure 96).

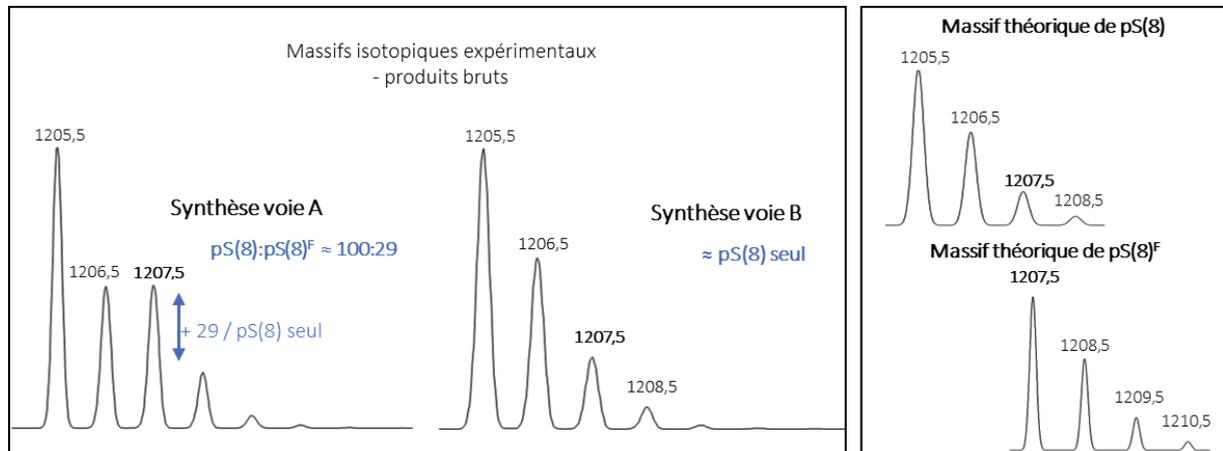


Figure 96- Massifs isotopiques expérimentaux des produits bruts obtenus lors de la synthèse de pS(8) par voies A et B et massifs isotopiques théoriques des pics moléculaires de pS(8)^F et de pS(8).

2.2 Interaction avec l'uranyle

Une partie des résultats présentés ici sont antérieurs à mes travaux de thèse. Une publication concernant l'ensemble des résultats obtenus est disponible.¹⁵⁸

2.2.1 Variation de position et structuration des complexes

Stœchiométrie des complexes

Les peptides pS(1), pS(3), pS(6) et pS(8) ont été analysés à pH 7,0 par ESI-MS, en présence d'un équivalent d'uranyle. Un exemple de spectre est donné en figure 97 pour pS(8). Seuls les signaux correspondant aux espèces mono- et dichargées du peptide libre et du complexe monométallique ML apparaissent. Des résultats similaires ont été obtenus pour les trois autres peptides pS(1), pS(3) et pS(6). Les peptides monophosphorylés ne forment donc pas de complexes polymétalliques.

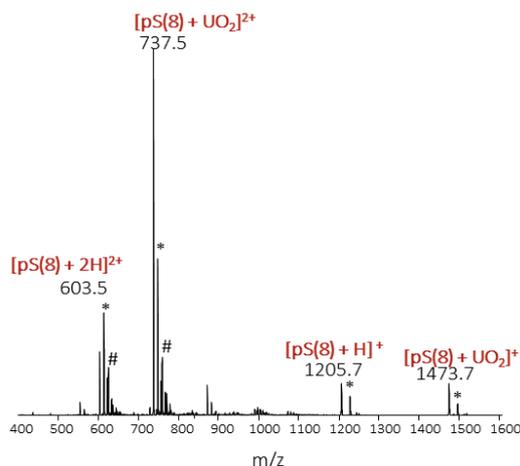


Figure 97 - Spectre (+)-ESI-MS de pS(8) (MW = 1204 g/mol) en présence d'un équivalent d'uranyle (pH 7,0; milieu acétate d'ammonium). (*) et (#) indiquent les adduits sodium et potassium respectivement.

Evaluation de constantes apparentes de stabilité

Les constantes apparentes de formation des complexes ML ont été évaluées par modélisation des données obtenues par fluorescence à différents pH (tableau 12). Elles ont été calculées à partir des constantes apparentes des complexes d'uranyle avec le compétiteur IDA (voir chapitre I). Dans le cadre du développement des peptides phosphorylés mimés des interactions OPN-uranyle, il est plus intéressant de se placer à pH physiologique. La constante apparente du peptide A1 a été évaluée à pH 6,0. Cette constante est néanmoins stable à pH plus basique car les pKa des 4 glutamates sont inférieurs à 6. Cette valeur peut donc servir de référence pour évaluer l'impact de la phosphosérine. Par ailleurs, seule la formation du complexe monométallique peptide-uranyle est considérée lors des modélisations puisqu'il s'agit de la seule espèce observée en spectrométrie de masse pour les peptides monophosphorylés.

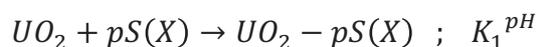


Tableau 12 - Constantes apparentes de stabilité des complexes uranyle-peptides monophosphorylés évaluées à partir des données de fluorescence obtenues à 25°C à pH 6,0 (milieu MES 20 mM NaCl 100 mM), 7 et 7,4 (milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM).

Peptide	log K ₁ pH 6	log K ₁ pH 7	log K ₁ pH 7,4
A1	8,2 ± 0,1	n.d.	n.d.
pS(1)	9,5 ± 0,2	9,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1
pS(3)	9,5 ± 0,2	9,8 ± 0,1	9,8 ± 0,2
pS(6)	9,6 ± 0,2	10,0 ± 0,2	9,7 ± 0,1
pS(8)	9,5 ± 0,2	9,5 ± 0,1	9,6 ± 0,1

L'introduction d'une phosphosérine induit l'augmentation de la stabilité du complexe ML, d'un à deux ordres de grandeur, par rapport au complexe UO₂-A1. A pH 6,0, 7,0 ou 7,4, les peptides pS(1), pS(3),

pS(6) et pS(8) présentent des affinités comparables pour l'uranyle, même si le peptide pS(1) semble être légèrement moins affin. Pour un peptide monophosphorylé pS(X), les valeurs obtenues varient très peu avec le pH. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la pSer soit déprotonnée dès pH 6, son pKa étant de 5,7. L'introduction d'une phosphosérine induit donc une augmentation de la stabilité du complexe monométallique qui est très peu influencée par la position occupée.

Dichroïsme circulaire

Si les comportements des peptides pS(1), pS(3), pS(6) et pS(8) sont similaires d'après les résultats obtenus par ESI-MS et par fluorescence, une différence de comportement est observée en dichroïsme circulaire. L'évolution de l'ellipticité molaire des peptides lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle est présentée sur la figure 98.

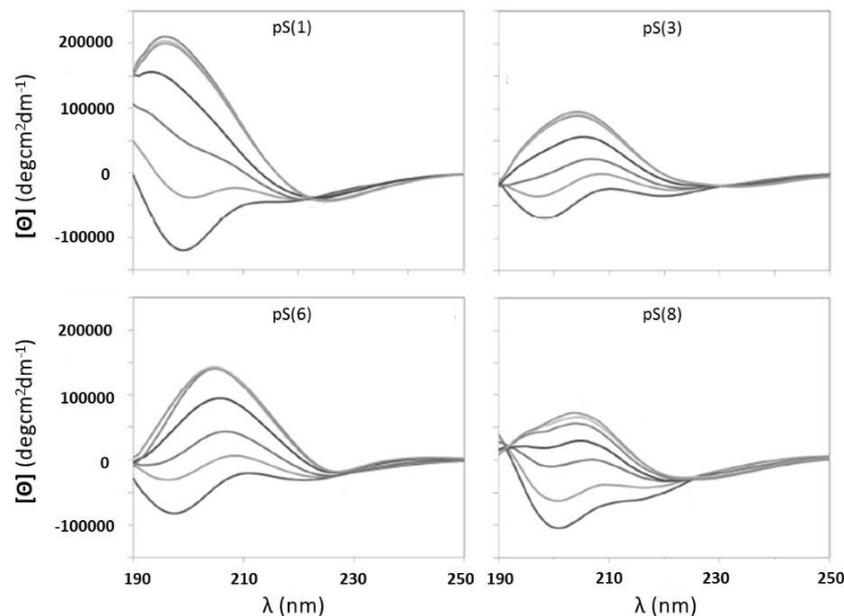


Figure 98 – Spectres dichroïques des peptides monophosphorylés à pH 7,0 en milieu aqueux, lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle, à 25°C.

Pour les 4 peptides, une augmentation du signal aux alentours de 200 nm et une bande légèrement négative aux alentours de 224 nm sont observées. Comme vu précédemment pour les peptides polycarboxyliques, ces bandes sont caractéristiques de la formation d'un feuillet β antiparallèle lors de la complexation. Les peptides monophosphorylés permettent donc la structuration du complexe en feuillet β . L'amplitude du signal varie cependant d'un peptide à l'autre. Les complexes formés avec pS(1) ($210000 \text{ degcm}^2\text{dm}^{-1}$) et pS(6) ($140000 \text{ degcm}^2\text{dm}^{-1}$) se structurent mieux que ceux formés avec pS(3) ($60000 \text{ degcm}^2\text{dm}^{-1}$) et pS(8) ($90000 \text{ degcm}^2\text{dm}^{-1}$).

Dans les peptides pS(1) et pS(6), les pSer sont positionnées juste après les glycines, tandis que dans les peptides pS(3) et pS(8), les pSer sont placées juste avant les prolines. Les prolines aux positions 4 et 9 sont des résidus cycliques. Les chaînes latérales des pSer subissent donc des contraintes stériques plus fortes en positions 3 et 8 ce qui peut expliquer que le feuillet β soit moins bien formé.

La variation de position de la pSer n'influence pas la spéciation de l'uranyle et n'implique pas de différence de stabilité du complexe ML. Elle a cependant un impact sur la structuration du complexe en feuillet β .

2.2.2 Choix du résidu phosphorylé

Nous avons introduit deux résidus phosphorylés différents, la pThr et la pSer, en position 8. Seul le modèle pT(8) a été étudié car les peptides pS(1), pS(3), pS(6) et pS(8) ont des comportements relativement proches.

pT(8) : une spéciation complexe

Le peptide pT(8) a été analysé par ESI-MS en présence d'uranyle, à pH 7,0 (figure 99).

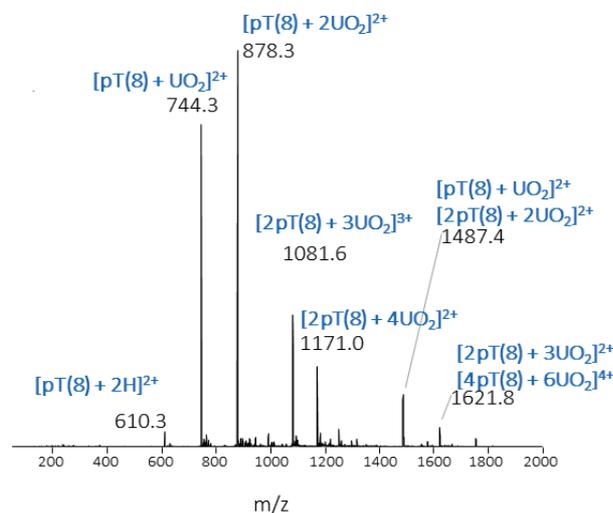


Figure 99- Spectres (+)-ESI-MS de pT(8) en présence de deux équivalents d'uranyle, à pH 7,0 en milieu acétate d'ammonium.

Des signaux sont observés pour des complexes M:L de stœchiométries variées (1:1, 2:1, 2:2, 3:2, etc). Nous avons précédemment montré que seul le complexe monométallique se formait pour pS(8) (figure 20). La nature de l'acide aminé phosphorylé a donc une influence sur la spéciation de l'uranyle.

Dichroïsme circulaire et structuration des complexes

Les signaux dichroïques des deux complexes d'uranyle sont comparés à pH 7,0 (figure 100). Nous avons vu que, pour le peptide pS(8), le complexe ML était relativement bien structuré en feuillet β , même en présence d'excès d'uranyle. Dans le cas du peptide pT(8), le comportement observé est plus erratique. Le peptide se structure difficilement en feuillet β lors des ajouts d'uranyle comme en témoigne la faible amplitude de signal par rapport à son homologue pS(8) ($4500 \text{ deg cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$). Le signal observé ne retranscrit pas la structure du complexe ML, mais une structure moyenne qui correspond à un mélange d'espèces plus ou moins structurées qui se forment dès l'ajout d'un équivalent d'uranyle en solution. La pSer favorise donc la formation d'un complexe mieux structuré que la pThr.

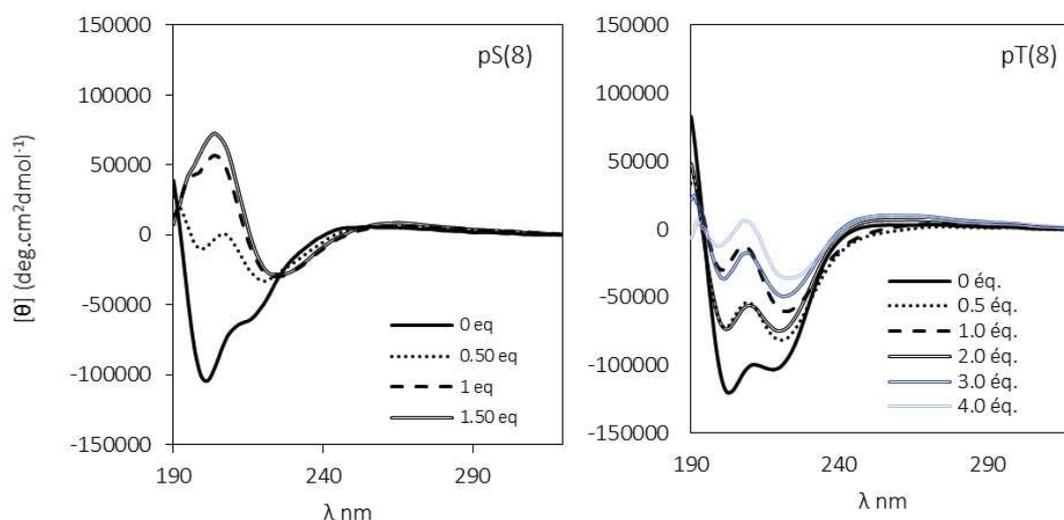


Figure 100 – Spectres dichroïques de pS(8) et pT(8) lors d'ajouts d'uranyle, en milieu aqueux à pH 7,0, à 25°C.

Evaluation des constantes apparentes de stabilité

Les constantes apparentes de formation des complexes monométalliques $\text{UO}_2\text{-pS(8)}$ et $\text{UO}_2\text{-pT(8)}$ sont comparés à pH 6 et 7 en présence d'IDA dans le tableau 13. Par soucis de simplification, seule la formation du complexe monométallique est considérée lors des modélisations, bien que d'autres espèces aient été identifiées par ESI-MS pour pT(8).



Tableau 13 - Constantes apparentes de stabilité des complexes uranyle-pS(8) et uranyle-pT(8) obtenues à pH 6,0 (milieu MES 20 mM NaCl 100 mM) 7 et 7,4 (milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM,) à 25°

Peptide	$\log K_1$; pH 6,0	$\log K_1$; pH 7,0
A1	$8,2 \pm 0,1$	n.d
pS(8)	$9,6 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,2$
pT(8)	$7,9 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$

Pour pT(8), la constante apparente d'affinité est plus élevée à pH 7 qu'à pH 6 bien que le pKa de la pThr soit de 5,8. Ces résultats sont dus à la non prise en compte des espèces aux stœchiométries variées formées dès les premiers ajouts d'uranyle en solution. La constante apparente de pT(8) est néanmoins plus faible que celle de pS(8), quel que soit le pH considéré.

Phosphosérine ou phosphothréonine ?

Le remplacement d'une pSer par une pThr en position 8 induit une diminution de la stabilité du complexe monométallique, à pH 6,0 et 7,0, et la formation de nombreuses espèces aux stœchiométries variées. Les pKa des deux fonctions pSer et pThr sont respectivement de 5,7 et 5,8, ce qui indique que la pThr est légèrement plus basique. Ces deux valeurs sont cependant proches et toutes deux inférieures à pH 6. La différence de pKa des deux fonctions ne permet donc pas d'expliquer à elle seule la différence de comportement observée entre les peptides pS(8) et pT(8). Le groupe méthyle de la phosphothréonine impose vraisemblablement à lui seul davantage de contraintes stériques conduisant à la formation de nombreux complexes, moins bien structurés et moins stables. La phosphosérine, qui correspond par ailleurs au résidu phosphorylé le plus présent *in vivo*, est donc sélectionnée pour la suite des études.

2.2.3 Implication du phosphate dans la coordination du métal

Etude de pS(8)^F

Nous avons vu en section 2.1.4 de ce chapitre qu'un sous-produit dans lequel le phosphate est remplacé par un fluorophosphate a pu être isolé au cours de la synthèse de pS(8) (voie A, sans purification de l'intermédiaire cyclique protégé). Le comportement de pS(8)^F en présence d'uranyle a été étudié puis comparé au comportement de pS(8). Le spectre (+)-ESI-MS obtenu en présence d'un équivalent d'uranyle à pH 7,0 est présenté en figure 101.

Un signal majoritaire, correspondant au peptide libre pS(8)^F (espèce dichargée) est observé. Un signal de très faible intensité témoigne toutefois de la formation d'une faible quantité de complexe monométallique.

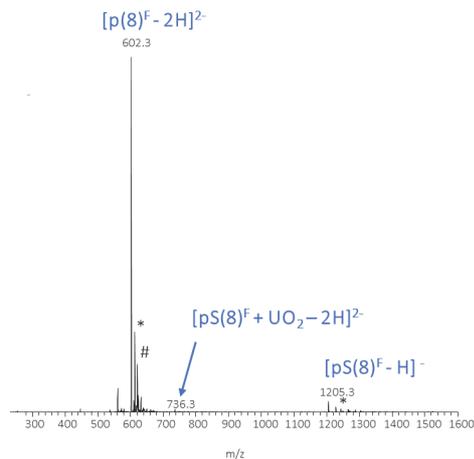


Figure 101- Spectre (-)-ESI-MS de $pS(8)^F$ en présence d'un équivalent d'uranyle (pH 7 milieu acétate d'ammonium). Les éventuels adduits sodium (*) et potassium (#) sont indiqués.

Les résultats obtenus en fluorescence montrent une extinction du tryptophane bien moins marquée pour le peptide $pS(8)^F$ que pour le peptide $pS(8)$ lors de l'ajout d'uranyle en solution (figure 102).

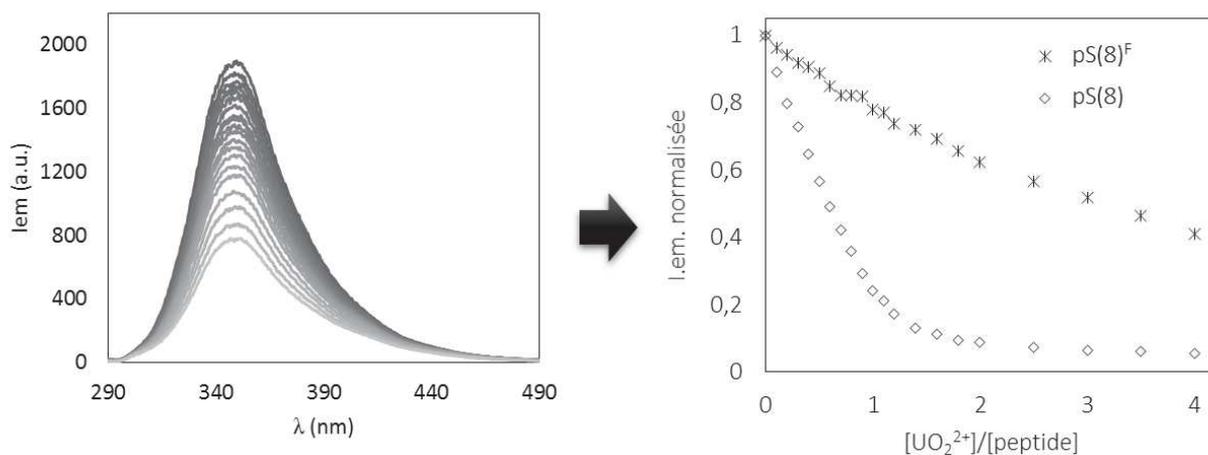


Figure 102 – Spectres de fluorescence et courbe d'extinction de fluorescence obtenus par dosage du peptide $pS(8)^F$ ($10 \mu M$ en milieu MES 20 mM, NaCl 100 mM à pH 6,0) en présence d'IDA (10 équivalents) par ajout de quantités croissantes d'uranyle.

La constante apparente d'affinité du sous-produit fluorophosphate est inférieure à 10^7 à pH 6,0 et son affinité est comparable à un peptide dont un des quatre glutamates serait remplacé par une sérine non phosphorylée. L'atome de fluor a un effet électroattracteur qui désactive le fluorophosphate, menant à un complexe UO_2 -peptide peu stable. La fonction fluorophosphate n'est pas ou peu coordonnée à l'uranyle. Ces résultats confirment que le phosphate est bel et bien impliqué dans la sphère de coordination de l'uranyle au sein des peptides monophosphorylés.

Environnement de coordination de l'uranyle

Comme nous l'avons vu au chapitre I, l'EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) permet de caractériser l'environnement de l'uranyle lors de la formation d'un complexe. Les expériences menées en collaboration avec C. Den Auwer et G. Creff sur le peptide pS(3) ont montré que 5 oxygènes issus de trois fonctions carboxylates monodentes (2.37 Å), une fonction phosphate monodente (2.19 Å) et une molécule d'eau (2.38 Å), permettaient de reproduire la première sphère de coordination de l'uranyle (figure 103). Une contribution de l'interaction U---P en seconde sphère de coordination permet de confirmer la coordination de la fonction phosphate lors de la formation du complexe métallique UO_2 -pS(3). Les distances U—O(P) et U---P obtenues sont par ailleurs similaires à celles obtenues par Safi *et al.* lors de l'étude de l'hexapeptide pSDEpSDE, site d'interaction OPN-uranyle supposé.¹¹¹ Ces données ont été confirmées grâce à des calculs DFT pour un peptide analogue dans lequel l'arginine et le tryptophane, ne participant pas à la chélation du métal, ont été remplacés par des glycines.¹⁵⁸

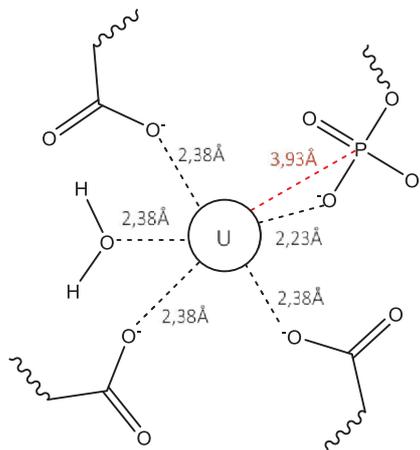


Figure 103 - Environnement de coordination de l'uranyle dans le complexe UO_2 -pS(3) d'après les données EXAFS (CN fixé à 5). Vue du plan équatorial de l'uranyle depuis l'axe O—U—O. Pour plus de lisibilité, les oxo ne sont pas représentés et seule la fonction finale de chaque acide aminé est indiquée. Source : Starck *et al.*¹⁵⁸

Les peptides monophosphorylés ont permis de valider l'approche « cyclodécapeptide » pour la conception de mimes bioinspirés des sites d'interaction OPN-uranyle, à condition (i) d'utiliser un acide aminé phosphorylé minimisant les contraintes stériques et (ii) de maîtriser les processus de synthèse des peptides pour éviter la formation de sous-produits fluorophosphates difficiles à éliminer et dont les propriétés complexantes sont inhibées. D'après les résultats obtenus avec pT(8) et pS(8), la pThr est moins adaptée à notre étude que la pSer puisque nous n'avons pas de contrôle sur la spéciation. En conséquence, seule la pSer est considérée pour la suite. A pH 6,0, la constante de stabilité du complexe ML, seul complexe observé par ESI-MS, est en moyenne 20 fois supérieure pour un complexe formé avec un peptide monophosphorylé que pour le peptide A1. La constante K_1 varie peu d'un peptide à l'autre sur la gamme de pH [6,0-7,4].

Si les peptides pS(1) pS(3) pS(6) et pS(8) ont des affinités similaires, une différence de structuration est observée lors de la formation du complexe monométallique. La flexibilité de la chaîne latérale de la pSer est dépendante de l'environnement de l'acide aminé et donc des résidus qui sont situés avant dans la chaîne peptidique. A proximité de prolines, les pSer ont davantage de contraintes ce qui implique une structuration moindre des complexes ML. Les résultats obtenus par spectroscopie EXAFS démontrent que le phosphate participe bel et bien à la coordination de l'uranyle. Les constantes K_1 obtenues à pH physiologiques sont toutefois un à deux ordres de grandeur inférieures à la constante apparente de formation du complexe UO_2 -OPN évaluée à $10^{11,5}$.⁶⁸ Ces résultats suggèrent que le site de haute affinité de l'OPN est *a priori* constitué de plusieurs résidus phosphorylés.

3 Des sites de liaison de l'uranyle polyphosphorylés dans l'OPN ?

3.1 Synthèse des composés

3.1.1 Stratégie de synthèse des peptides diphosphorylés

Comme pour les peptides monophosphorylés, il est possible de faire varier les positions des pSer. Les quatre peptides obtenus sont présentés en figure 104. Ils s'organisent en deux catégories :

- ceux pour lesquels les phosphates sont en relation *trans* par rapport à la structure du peptide : pS(16) dont les pSer sont à proximité des glycines et pS(38) dont les pSer sont à proximité des prolines ;
- ceux dont les phosphates sont en relation *cis* par rapport à la structure : pS(18) avec les pSer de part et d'autre du coude β et pS(68) avec les pSer entre deux coudes β .

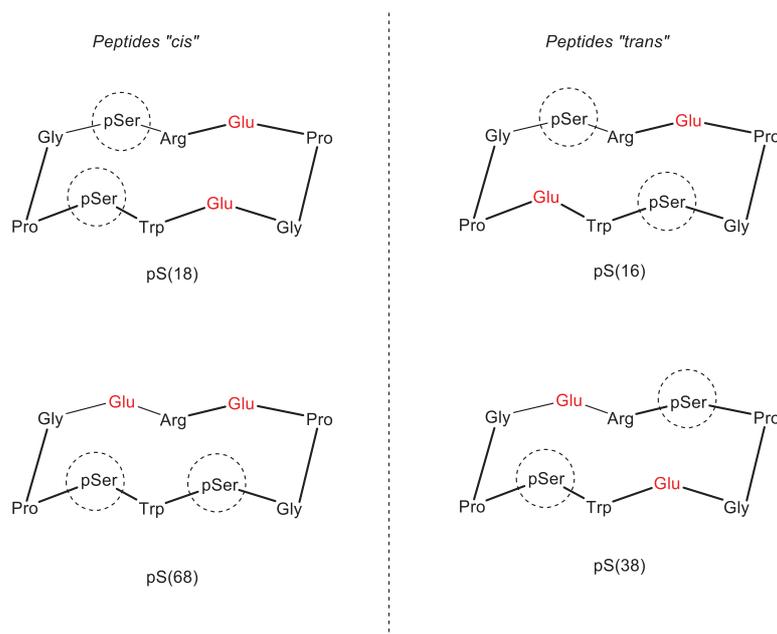


Figure 104 - Peptides dipolyphosphorylés

Peu de synthèses de peptides polyphosphorylés sont décrites dans la littérature. La synthèse de composés à plusieurs fonctions phosphates n'est pas évidente, et les difficultés rencontrées se multiplient à mesure que le nombre de phosphates augmente. De nombreuses complications ont rendu difficile la transposition de la stratégie de synthèse des peptides monophosphorylés aux

peptides polyphosphorylés. Cette voie a néanmoins été optimisée pour les peptides porteurs de deux résidus phosphorylés.

En revanche, cette stratégie n'a pas permis d'isoler les peptides à 3 et 4 phosphosérines purs (0 à 4% de rendement, pureté insuffisante inférieure à 95%). Nous avons notamment observé la formation de nombreux sous-produits parmi lesquels des produits pyrophosphates dus à la formation d'une liaison P—O—P par activation de la chaîne latérale déprotégée de l'acide aminé phosphorylé par un agent de couplage.¹⁵⁹ Cette réaction parasite a notamment été recensée dans la littérature lors de la synthèse de produits phosphorylés à l'aide de résidus Fmoc-Thr(OPO(OH)₂)-OH.¹⁶⁰

3.1.2 Phosphorylation globale

En raison des difficultés observées avec la première stratégie de synthèse pour les peptides tri- et tétraphosphorylés, nous avons développé une seconde stratégie de synthèse basée sur la méthode de phosphorylation globale.

La phosphorylation globale est employée pour la synthèse de peptides phosphorylés car elle permet de fonctionnaliser l'ensemble des fonctions alcools en fonctions phosphates protégées. L'obtention d'une pSer à partir d'une Ser se fait en deux étapes (phosphitylation des alcools suivie de l'oxydation des fonctions phosphitylées) puis les chaînes latérales sont déprotégées (figure 105).¹⁵⁹

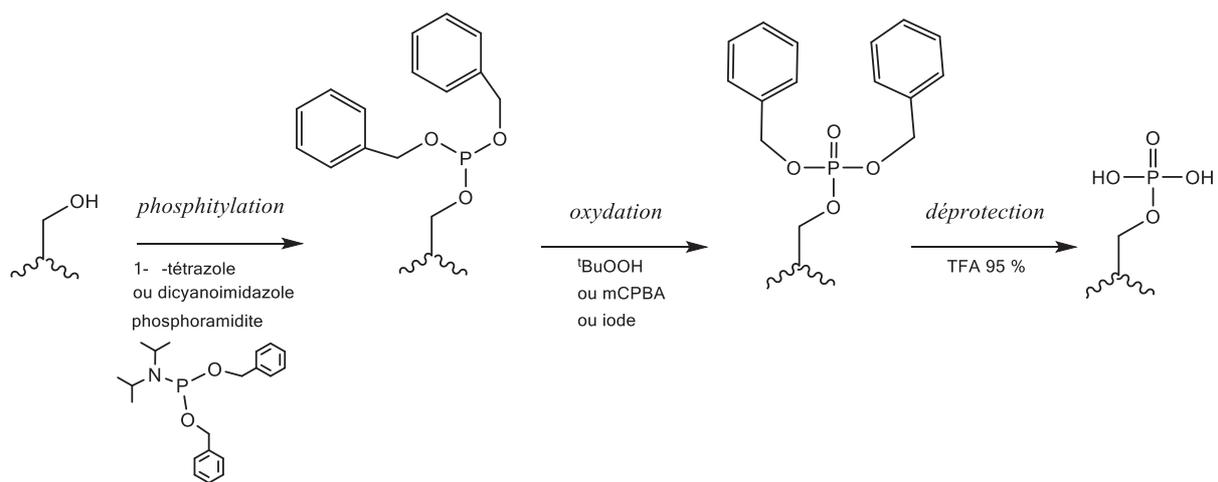


Figure 105 - Phosphorylation globale d'une sérine en deux étapes (phosphitylation-oxydation) puis déprotection pour l'obtention d'une pSer

La phosphorylation globale se fait en milieu anhydre sous atmosphère inerte du fait de l'utilisation de réactifs sensibles à l'eau et à l'air (phosphoramidite, *tert*-butyle hydroperoxyde). Les protocoles décrits

dans la littérature sont généralement utilisés pour la phosphorylation de peptides linéaires encore immobilisés sur support pour lesquels peu de fonctions sont à phosphoryler (1 à 2).¹⁶¹⁻¹⁶³ La synthèse d'un peptide cyclique contenant trois à quatre fonctions à phosphoryler constitue donc un véritable challenge synthétique.

Un essai de phosphorylation en milieu homogène sur un peptide cyclique portant 4 sérines c(SRSPGSWSPG) n'a pas permis l'obtention du peptide final pur. En effet, le phosphoramidite est introduit en large excès (40 équivalents par fonction alcool à phosphoryler) ce qui conduit à la formation de grandes quantités de phosphates en fin de synthèse, et la purification par HPLC préparative s'est avérée impossible.

Nous avons donc développé un protocole adapté à la synthèse de peptides à 3 et 4 phosphosérines, afin de permettre l'élimination progressive des réactifs utilisés tout en conservant le peptide immobilisé sur support.

3.1.3 Stratégie de synthèse des cyclodécapeptides tri- et tétraphosphorylés sur support

Les peptides pS(168) et pS(1368) sont présentés en figure 106.

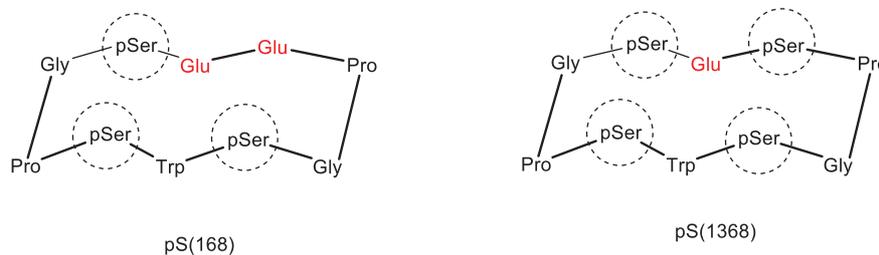


Figure 106 - Peptides polyphosphorylés synthétisés à l'aide du protocole de synthèse adapté sur support

La synthèse de ces peptides a nécessité le développement d'un protocole adapté à la réalisation de l'ensemble des étapes sur support. Cela comprend les réactions (i) de déprotection sélective des Ser (ii) de cyclisation sur support et (iii) de phosphorylation globale des sérines. Le protocole général de synthèse sur support est présenté en figure 107. Les protocoles de synthèse de pS(168) et pS(1368) sont détaillés en partie expérimentale.

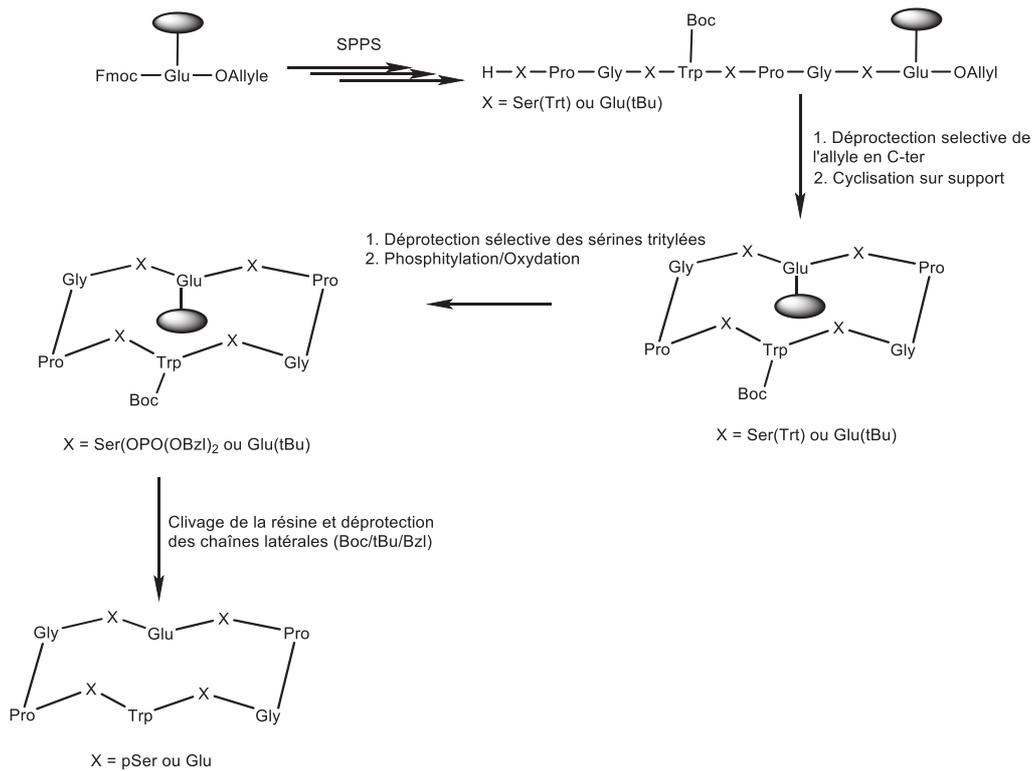


Figure 107 – Stratégie de synthèse sur support de produits phosphorylés à 3 ou 4 pSer

Support SPPS

La cyclisation sur support contraint à utiliser une résine greffée sur la chaîne latérale d'un acide aminé. Un glutamate dont la chaîne latérale est greffée à une résine NovaSyn®TGA remplace l'arginine, en position 2. La méthode a donc été développée à partir d'une résine commerciale pré-chargée, la résine Fmoc-Glu(NovaSyn®TGA)-OAllyl (figure 108).

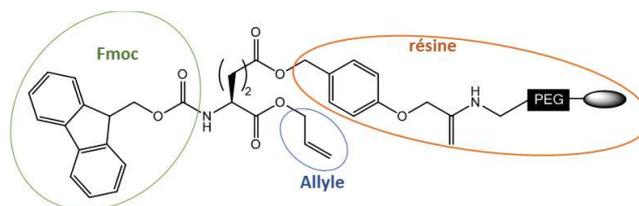


Figure 108 - Résine commerciale pré-chargée Fmoc-Glu(NovaSyn®TGA)-OAllyl

L'espaceur polymérique greffé sur la résine (chaîne PEG – polyéthylène glycol) éloigne la chaîne peptidique du cœur de la résine de façon à bien l'exposer au solvant. L'espacement des chaînes peptidiques et la faible charge initiale de la résine (0,10 à 0,30 mmol/g) favorisent la réaction de couplage intra-moléculaire, c'est-à-dire la réaction de cyclisation. Cette résine se clive en milieu TFA 95%, et permet donc d'effectuer des déprotections sélectives en milieux basique, acide dilué, etc. Le

groupe allyle protégeant la fonction C-terminale peut être sélectivement déprotégé par catalyse au Pd⁽⁰⁾. Ce groupe est stable en conditions de déprotection du Fmoc (pipéridine) et en conditions acides (TFA).

Précurseur linéaire

Les résidus introduits lors de la SPPS ont des chaînes latérales protégées lorsque nécessaire. Les sérines sont introduites avec un groupe protecteur se clivant en conditions douces (Fmoc-Ser(Trt)-OH) (1% de TFA). Le glutamate et le tryptophane sont introduits avec des groupes protecteurs se clivant en milieu acide concentré (Fmoc-Glu(^tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH). De très bons rendements sont obtenus en SPPS : 74% pour le peptide pS(168) synthétisé de façon automatisée assistée par un réacteur à micro-ondes et 77% pour le peptide pS(1368) synthétisé manuellement.

Précurseur cyclique non phosphorylé

Suite à la synthèse du précurseur linéaire, le groupe allyle C-terminal est déprotégé par réaction catalysée au Pd⁽⁰⁾. La réaction de cyclisation est ensuite effectuée par réaction de couplage entre l'amine N-terminale et l'acide C-terminal d'une chaîne peptidique immobilisée sur support. Le protocole de cette réaction a été adapté du protocole proposé par Renaudet *et al.*¹⁶⁴

Précurseur cyclique phosphorylé protégé

Après élimination des groupements trityles en conditions douces, les fonctions alcools déprotégées des sérines sont phosphitylées en présence de *N,N*-diisopropylphosphoramidite dibenzylé et d'une base, le 1*H*-tétrazole, avant que les fonctions ne soient oxydées *in situ* à l'aide d'une solution d'hydroperoxyde de *ter*-butyle. Pour le peptide pS(168), le tétrazole qui n'est plus disponible commercialement a été remplacé par du 4,5-dicyanoimidazole, base utilisée pour la synthèse d'oligonucléotides par Vargeese *et al.*¹⁶⁵ Dans les deux cas, le protocole de phosphorylation a été adapté à partir de celui recommandé par Novabiochem.

Produit final

La réaction de clivage en milieu TFA 95% est réalisée pendant plusieurs heures à température ambiante de façon à déprotéger les chaînes latérales des phosphosérines (Bzl), du tryptophane (Boc) et, dans le cas du peptide pS(168), de l'acide glutamique (^tBu). Le produit brut obtenu contient des polymères qu'il est difficile d'éliminer par purification sur HPLC préparative, ce qui diminue le rendement en produit final pur. La phosphorylation sur support fragilise probablement la chaîne PEG de la résine qui se dégrade ensuite en milieu acide lors de l'étape de clivage.

Le rendement ne peut pas être déterminé étape par étape au cours de la synthèse car le peptide n'est clivé qu'en fin de synthèse. Néanmoins, le bon déroulement des étapes de cyclisation et de phosphorylation a été vérifié en prélevant quelques grains de résines et en enregistrant le spectre de masse après déprotection à l'aide d'une solution de TFA à 95%. Malgré les difficultés rencontrées lors de la mise en place de ce protocole, nous avons isolé les peptides pS(168) et pS(1368) respectivement avec 8,5 et 8 % de rendements respectifs et 96% de pureté. Le rendement est plus faible que pour des peptides à 1 et 2 pSer synthétisés *via* la stratégie présentée en section 1, mais plus important que ceux obtenus par SPPS directe avec introduction de résidus phosphorylés protégés (0 à 4 % de rendement).

L'utilisation d'une résine sans espaceur PEG comme la résine préchargée Fmoc-Glu(Wang)-OAllyl permettrait d'éviter la présence de polymère après clivage et de simplifier la purification du produit final.¹⁵⁵ La résine Wang se clive également en milieu acide concentré et est stable dans les conditions de déprotection de l'allyle et des trityles. La charge initiale de cette résine préchargée est cependant assez élevée (0,40-1,00 mmol/g de résine). L'utilisation d'une résine préchargée Fmoc-Glu(Wang LL)-ODmab à faible substitution (0,20-0,40 mmol/g de résine) semble donc préférable (figure 109). Le groupe Dmab est également sélectivement déprotégé en présence d'hydrazine. A noter toutefois que l'absence d'espaceur polymérique limite l'accessibilité des réactifs encombrés aux chaînes latérales du peptide cyclique (ex : phosphoramidites), et donc que des pertes de rendement sont possibles, nécessitant de trouver le meilleur compromis.

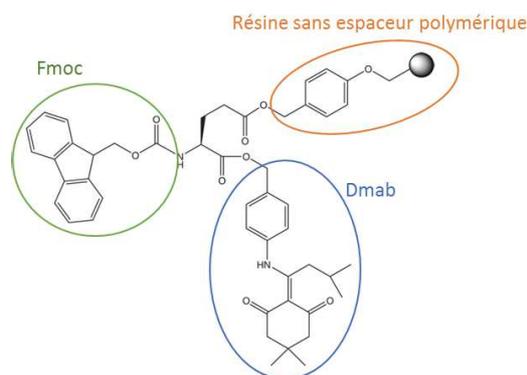


Figure 109 - Fmoc-Glu(Wang LL)-ODmab

3.1.4 Peptide linéaire tétraphosphorylé

Un précurseur linéaire synthétisé précédemment au laboratoire à l'aide de la stratégie de synthèse des peptides mono- et di-phosphorylés (introduction de Fmoc-Ser(OPO(OH)(OBzl))-OH lors de la SPPS) a simplement été déprotégé à l'aide d'une solution de TFA à 95 % de façon à libérer les chaînes latérales

des groupes protecteurs (figure 110). Le produit final a été isolé après purification (6,5 % de rendement, 83 % de pureté).

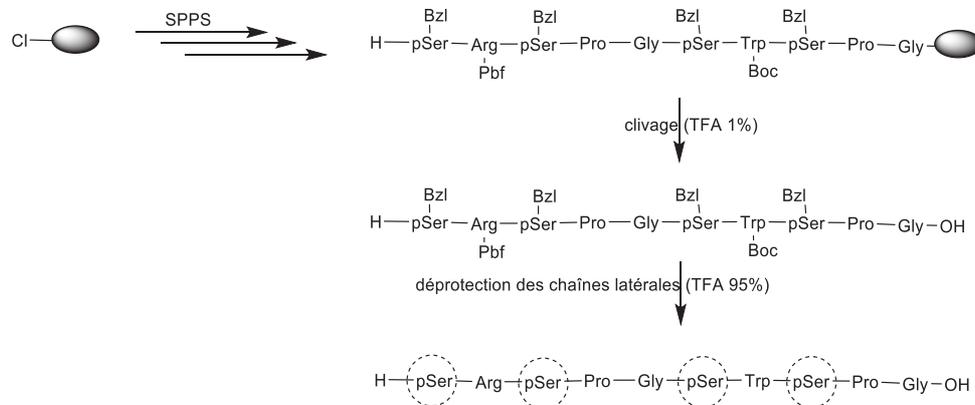


Figure 110 - Stratégie de synthèse du décapeptide linéaire à 4 pSer pS(1368)-Lin

3.2 Interaction entre peptides diphosphorylés et uranyle

Une publication sur les peptides diphosphorylés est disponible.¹⁶⁶

3.2.1 Stœchiométries et structures des complexes

Spectrométrie de Masse

Les résultats obtenus par ESI-MS mettent en évidence la présence des complexes mono- et dimétalliques pour les quatre peptides diphosphorylés. Les spectres obtenus pour pS(18) et pS(16) en présence d'1 à 2 équivalents d'uranyle sont donnés en exemple (figure 111).

Le peptide pS(18) a la possibilité de former des espèces dimétalliques en présence d'excès d'uranyle mais ces espèces restent très minoritaires, contrairement au peptide pS(16) pour lequel l'espèce dimétallique apparaît dès l'ajout d'un équivalent d'uranyle. Les peptides pS(38) et pS(68) ont un comportement similaire au peptide pS(18).

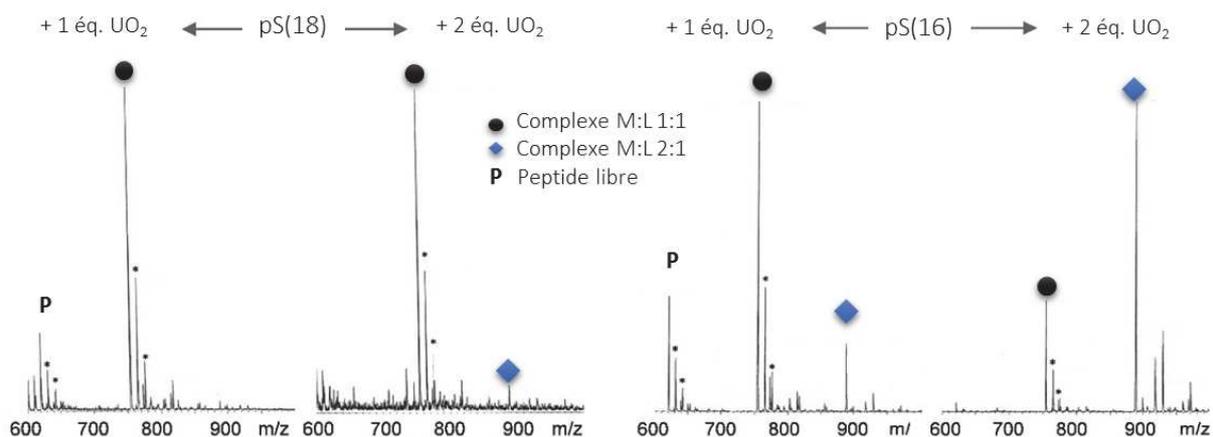


Figure 111- Spectres (+)-ESI-MS de pS(18) et pS(16) en présence d'uranyle, en tampon acétate d'ammonium à pH 7.

Dichroïsme circulaire

Les variations d'ellipticités molaires observées indiquent des disparités dans la structuration des complexes uranyle-peptide diphosphorylé. Les spectres obtenus pour pS(18) et pS(16) sont donnés en exemple (figure 112).

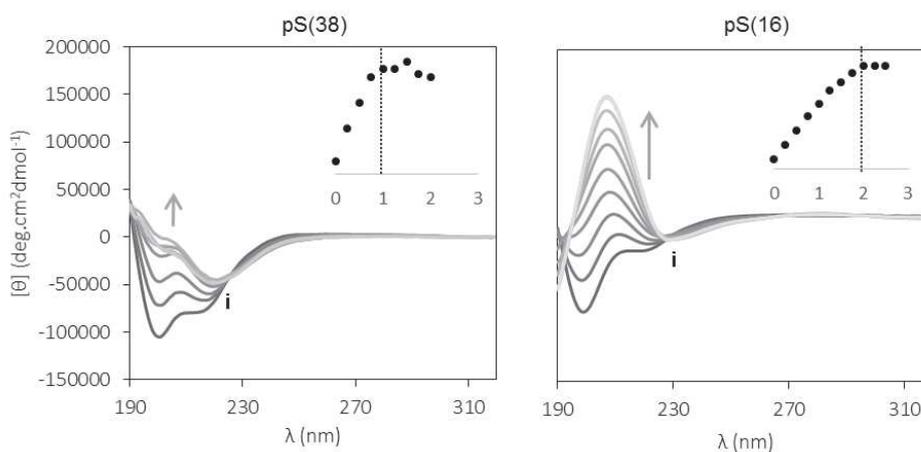


Figure 112- Spectres CD de pS(38) et de pS(16)

Le signal du peptide libre indique, dans les deux cas, une structure initiale aléatoire. L'ajout de quantités croissantes d'uranyle implique une augmentation du signal aux alentours de 200 nm, et la présence d'une bande négative vers 224 nm, bandes caractéristiques de la formation d'un feuillet β antiparallèle. L'amplitude de signal varie d'un peptide à l'autre en fonction du positionnement des phosphosérines. La structuration du complexe est plus importante pour le peptide pS(16) ($142000 \text{ degcm}^2.\text{d}^{-1}$) que pour le peptide pS(38) ($-11000 \text{ degcm}^2.\text{dm}^{-1}$). Par ailleurs dans le cas de pS(16), on observe une augmentation du signal jusqu'à atteindre un ratio 2:1 métal:ligand, alors qu'un plateau est atteint à 1

équivalent seulement pour les trois autres peptides. Ce résultat confirme les résultats observés en MS : le peptide pS(16) forme un complexe M_2L structuré.

Conformément à ce qui a été observé avec les peptides monophosphorylés, la présence de glycines à proximité des phosphosérines en positions 1 et 6 permet un meilleur réarrangement des chaînes latérales des Ser dans le plan équatorial de l'uranyle. A proximité des prolines, en positions 3 et 8, les chaînes ont un degré de flexibilité moindre. Le positionnement des phosphosérines impacte donc la propension de la structure à s'établir en feuillet β et également la spéciation dans le cas du peptide pS(16). La présence de deux phosphates pontants permettrait d'expliquer la formation d'un complexe dimétallique structuré pour pS(16)(figure 113).

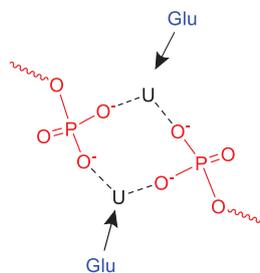


Figure 113 – Proposition de coordination des deux cations uranyle dans le complexe $(UO_2)_2$ -pS(16) grâce aux phosphates pontants

3.2.2 Evaluation des constantes apparentes de complexation

L'affinité des décapeptides diphosphorylés a été étudiée à pH 6,0, 7,0 et 7,4 en présence d'IDA (tableau 14).

Tableau 14 - Constantes de stabilité des complexes monométalliques évaluées à 25°C, à pH 6 (milieu MES 20 mM, NaCl 100 mM) 7 et 7,4 (milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM). (*) Constante K_2 calculée pour un modèle faisant également intervenir le complexe dimétallique M_2L .

Peptide	$\log K_1$; pH6	$\log K_1$; pH7	$\log K_1$; pH7,4
A1 (référence)	$8,2 \pm 0,1$	n.d.	n.d.
pS(1)	$9,5 \pm 0,2$	$9,1 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,1$
pS(16)	$8,7 \pm 0,1$	$10,1 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,1$ $9,3 \pm 0,2$ (*)
pS(18)	$8,6 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,2$
pS(38)	$8,8 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,2$
pS(68)	$8,2 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,1$

Complexes monométalliques

Comme pour la série de peptides monophosphorylés, les quatre peptides disphosphorylés pS(16), pS(18), pS(38) et pS(68) ont des affinités similaires à pH donné.

A pH 6,0, les constantes obtenues sont plus faibles que pour les peptides monophosphorylés et du même ordre de grandeur que celle du peptide de référence A1. En effet ces peptides contenant deux phosphates sont plus basiques que les précédents ($pK_{a1} = 5,7$ et $pK_{a2} > 5,7$) et une fonction phosphate est protonnée à pH 6,0 ce qui explique les faibles affinités observées à ce pH.

A pH 7,0 et 7,4 on observe une augmentation de l'affinité des peptides pour l'uranyle. La constante est alors évaluée à $K_1 \approx 10^{10}$, soit deux ordres de grandeur plus importante qu'avec le peptide polyglutamate A1. La stabilité des complexes peptide-uranyle est cependant inférieure à celle du complexe OPN-uranyle à pH physiologique ($K_1 = 10^{11,5}$).

Cas particulier de pS(16)

Pour le peptide pS(16), les données obtenues à pH 7,4 ont été modélisées à l'aide de deux modèles (figure 114).

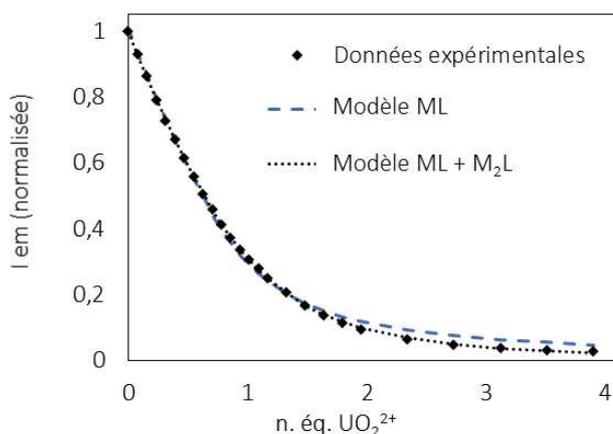


Figure 114- Modélisation des données obtenues en fluorescence à pH 7,4 pour le peptide pS(16).

Le premier modèle ne fait intervenir que le complexe monométallique alors que le second implique la formation des complexes mono et dimétalliques observés en ESI-MS et en CD. Le second modèle permet d'obtenir une meilleure modélisation des données, et d'évaluer K_2 à pH 7,4 ($10^{9,3}$). Ces résultats indiquent que l'insertion d'un deuxième cation métallique est thermodynamiquement favorisée.

3.2.3 Sélectivité uranyle/calcium

Nous avons vu au chapitre I que l'OPN est une protéine dont le rôle *in vivo* est de complexer le calcium. La complexation du calcium ne dépend pas de l'état de phosphorylation de la protéine puisqu'il s'agit d'une interaction impliquant des apatates et glutamates. Les peptides diphosphorylés présentent 2 résidus phosphorylés et 2 résidus acides, dont les chaînes latérales sont orientées dans la même direction. Nous avons donc réalisé des expériences de compétitions entre uranyle et calcium à pH 6,0 et 7,4, en l'absence d'IDA. Les compétitions ont été suivies par fluorescence à 350 nm, en excitant l'échantillon à la longueur d'onde d'absorption maximale du tryptophane (280 nm). Les résultats sont présentés en figure 115.

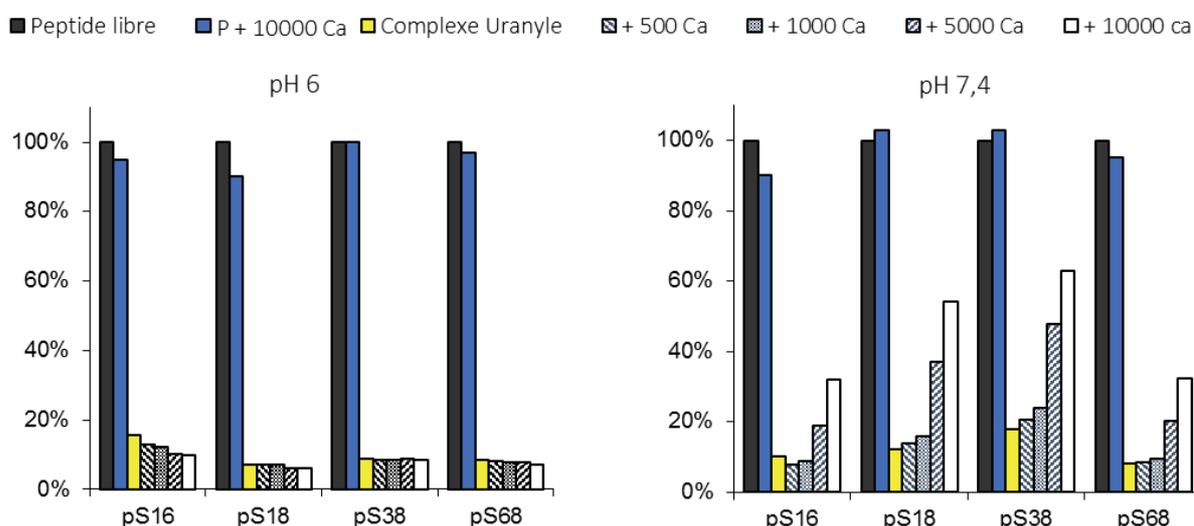


Figure 115 - Compétition uranyle/calcium pour les peptides diphosphorylés (10 μ M) à pH 6,0 (MES 20 mM, NaCl 100 mM) et 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM) avec suivi de la fluorescence à 350 nm, à 25°C. A une solution de peptide (en noir) sont ajoutés 2 équivalents d' UO_2^{2+} (jaune) puis 500 à 10 000 équivalents de calcium. La barre bleue représente une solution de référence de peptide dans laquelle seuls 10 000 équivalents de Ca^{2+} sont ajoutés.

Aux deux pH, la présence de 10 000 équivalents de calcium en solution (en bleu sur l'histogramme) n'éteint pas la fluorescence du tryptophane. L'ajout de 2 équivalents d'uranyle à une solution de peptide libre implique la formation de complexes non fluorescents, d'où l'extinction de fluorescence conséquente constatée (en jaune sur l'histogramme). A la solution contenant les complexes peptide-uranyle sont ajoutées des quantités croissantes de calcium afin de déterminer si l'uranyle est déplacé.

Les résultats indiquent qu'à un pH donné, les 4 peptides diphosphorylés ont le même comportement. A pH 6, l'ajout de 500 à 1000 équivalents de calcium à une solution de complexes uranyle-peptide n'influence pas la fluorescence de l'échantillon. L'uranyle n'est que peu, voire pas du tout, déplacé du

complexe à ce pH. A pH 7,4, l'uranyle commence à être déplacé du complexe à partir de 5000 équivalents de calcium. Les complexes les plus sensibles à la présence de calcium sont ceux formés avec les peptides pS(18) et pS(38). Le déplacement de l'uranyle par le calcium est plus important à pH 7,4 qu'à p 6,0 et peut s'expliquer par l'hydrolyse plus forte de l'uranyle à pH physiologique. Malgré cela, 35% à 70% de l'uranyle reste complexé par les peptides en présence de 10000 équivalents de calcium. Les peptides diphosphorylés ont une forte sélectivité pour l'uranyle pour des concentrations en calcium proches de celles que l'on trouve *in vivo* (de l'ordre du mM).

Les peptides diphosphorylés ont des affinités très similaires pour l'uranyle à pH supérieur ou égal à 7 ($K_1 \approx 10^{10}$), légèrement supérieures à celles des peptides monophosphorylés ($K_1 \approx 10^{9,5}$). A l'instar des peptides monophosphorylés, la position des pSer n'a que très peu d'impact sur la stabilité du complexe monométallique mais influence la structuration des complexes. La disposition des pSer impacte également la spéciation dans le cas du peptide pS(16) dont les chaînes latérales sont plus flexibles et complexent deux cations au sein d'une structure en feuillet β . Les peptides mono- et diphosphorylés ont donc des comportements relativement proches, sauf dans le cas de pS(16). L'introduction de la deuxième pSer a donc permis d'augmenter légèrement la stabilité des complexes monométalliques qui restent toutefois inférieure à celle du complexe OPN-uranyle ($K_1 = 10^{11,5}$). Ces résultats suggèrent que le nombre de phosphates environnant l'uranyle au sein de l'OPN est supérieur à 2. L'étude de peptides tri- et tétraphosphorylés permettra de valider cette hypothèse.

3.3 Interaction entre peptides tri- ou tétraphosphorylés et uranyle

3.3.1 Une spéciation plus complexe

Spectrométrie de masse

Les peptides pS(168) et pS(1368) ont été analysés par spectrométrie de masse en présence d'un à deux équivalents d'uranyle. Les résultats obtenus sont similaires pour les deux peptides aussi seuls les spectres obtenus pour pS(1368) sont donnés en exemple (figure 116).

Les espèces dichargées des complexes mono et dimétalliques sont observées dès l'ajout d'un équivalent d'uranyle. En présence d'excès d'uranyle, les deux mêmes complexes apparaissent, le signal correspondant au complexe dimétallique étant plus intense. Aucun autre complexe polymétallique ne se forme.

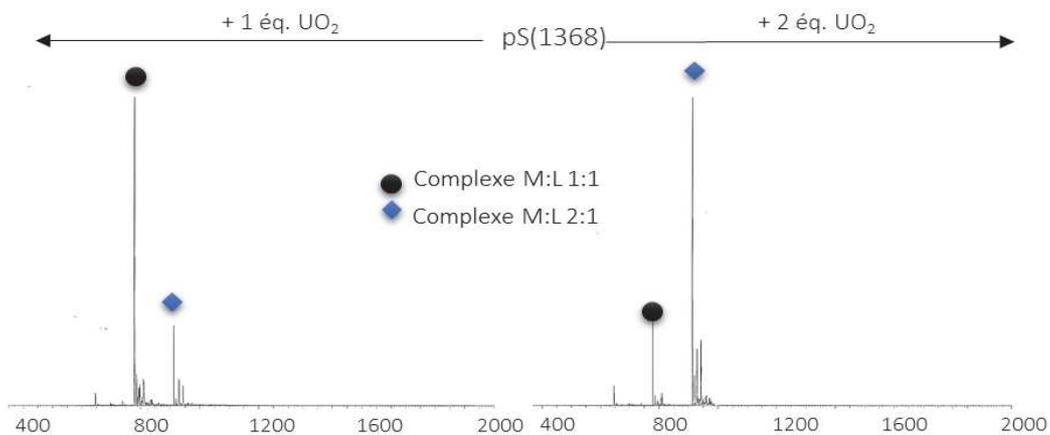


Figure 116- Spectres (-)-ESI-MS pour pS(1368) (100 μ M) en présence de 1 et de 2 équivalents d'uranyle en tampon acétate d'ammonium à pH 7,0.

Dichroïsme circulaire

Les spectres dichroïques des peptides pS(168) et pS(1368) enregistrés lors d'ajouts de quantités croissantes d'uranyle, en milieu aqueux, à pH 7,0 sont comparés à ceux obtenus pour pS(16) (figure 117).

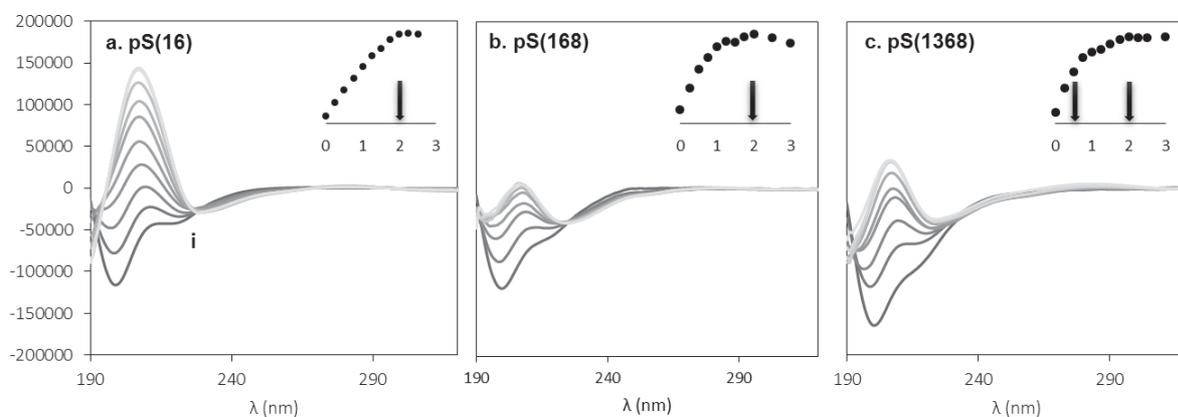


Figure 117 – Spectres dichroïques de pS(16), pS(168) et pS(1368) lors d'ajout de quantités croissantes d'uranyle, à pH 7,0 en milieu aqueux non tamponné, à 25°C. Encarts : évolution de l'ellipticité molaire à 205 nm en fonction des ajouts d'uranyle.

L'augmentation du signal aux alentours de 200 nm et la présence d'une bande légèrement négative à 224 nm confirme une structuration des complexes en feuillet β antiparallèle (figures 117b et 117c). De même que pour le peptide pS(16), 2 équivalents d'uranyle peuvent être insérés dans la structure en feuillet β . Ces résultats suggèrent à nouveau la présence de phosphates pontants, provenant des phosphosérines aux positions 1 et 6.

L'ellipticité molaire maximale enregistrée traduit la capacité du peptide à se structurer lors de la complexation. Le peptide pS(1368) ($32000 \text{ deg cm}^2 \cdot \text{dm}^{-1}$) permet de former un complexe M_2L mieux structuré que celui formé avec le peptide pS(168) ($13000 \text{ deg cm}^2 \cdot \text{dm}^{-1}$) mais moins bien structuré que celui formé avec le peptide pS(16) ($142000 \text{ deg cm}^2 \cdot \text{dm}^{-1}$). L'accumulation de charges négatives au niveau du site de liaison de l'uranyle augmente avec le nombre de phosphates (1 charge négative par carboxylate et 2 charges négatives par phosphate) ce qui induit une répulsion particulièrement forte entre les chaînes latérales sur les peptides à 3 ou 4 phosphosérines.

L'évolution de l'ellipticité molaire de pS(1368) à 205 nm indique une première rupture de pente pour 0,5 équivalent d'uranyle ajouté en solution (encart figure 117c). Cette rupture de pente indique la présence d'un troisième complexe de stœchiométrie 1:2 qui n'a pas été observé en spectrométrie de masse. Des variations comparables à celles observées pour le peptide pS(1368) sont observées pour le peptide pS(168) bien que moins marquées (encart figure 117b).

De même qu'en ESI-MS, les peptides à 3 et 4 phosphosérines semblent avoir des comportements très proches. La spéciation de l'uranyle en présence de ces peptides est plus complexe que pour des peptides à une ou deux fonctions phosphorylées et la présence des trois complexes ML, M_2L et ML_2 sont nécessaires à l'interprétation des dosages par CD.

Fluorescence

L'extinction de fluorescence du tryptophane à 350 nm a été suivie pour le composé pS(1368) (figure 118), à pH 7 et 7,4. La rupture de pente observée est inférieure à un équivalent d'uranyle, ce qui confirme la formation du complexe ML_2 . Des résultats similaires ont été obtenus pour pS(168).

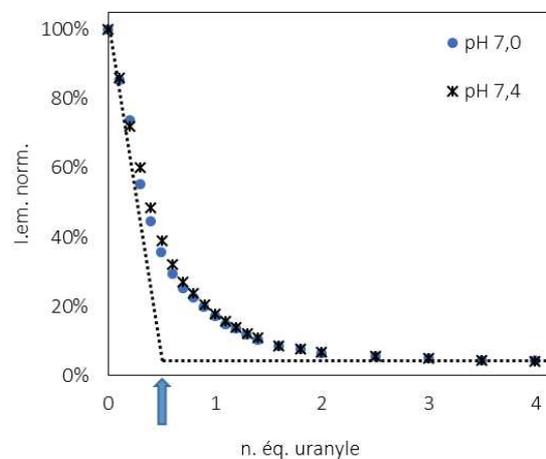


Figure 118 –Extinction de fluorescence de pS(1368) ($10 \mu\text{M}$ en tampon HEPES 20 mM NaCl 100 mM) par ajout de quantités croissantes d'uranyle, en présence d'IDA, à pH 7 ou 7,4, à 25°C. La flèche indique la rupture de pente à 0,5 éq. d'uranyle.

Validation de la spéciation par modélisation

Deux modélisations des résultats obtenus à pH 7,4 sont comparées sur la figure 119 pour le peptide pS(1368). Le premier modèle (en bleu) implique la formation du complexe ML seul, en considérant qu'il éteint complètement la fluorescence du tryptophane (ML non émetteur). Le second modèle (en noir) implique la formation de deux complexes, ML et ML₂, tous deux non émetteurs.

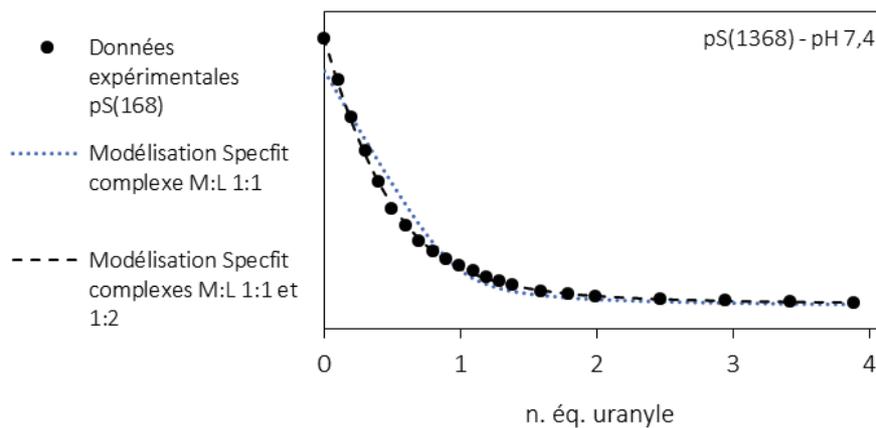


Figure 119 – Modélisation des données obtenues en fluorescence à pH physiologique pour pS(168) et pS(1368), à pH 7,4, à 25°C.

L'absence du complexe ML₂ ne permet pas de modéliser correctement les données obtenues, établissant à nouveau l'existence de cette espèce en solution. Des résultats similaires ont été obtenus pour le peptide pS(168).

Bien que le complexe ML₂ n'ait pas été identifié par ESI-MS, y compris pour des échantillons dont le ratio de concentrations [uranyle]/[peptide] était inférieur à 1, les résultats obtenus par CD et fluorescence prouvent son existence. Il est probable que les conditions d'analyses ESI-MS ne permettent pas de conserver le complexe intact et qu'il se dissocie dès l'entrée dans la source. Les peptides pS(168) et pS(1368) forment donc trois complexes ML₂, ML et M₂L (figure 120). La spéciation de l'uranyle en présence de ces peptides est plus complexe que celle observée pour les cyclodécapeptides étudiés jusqu'ici.

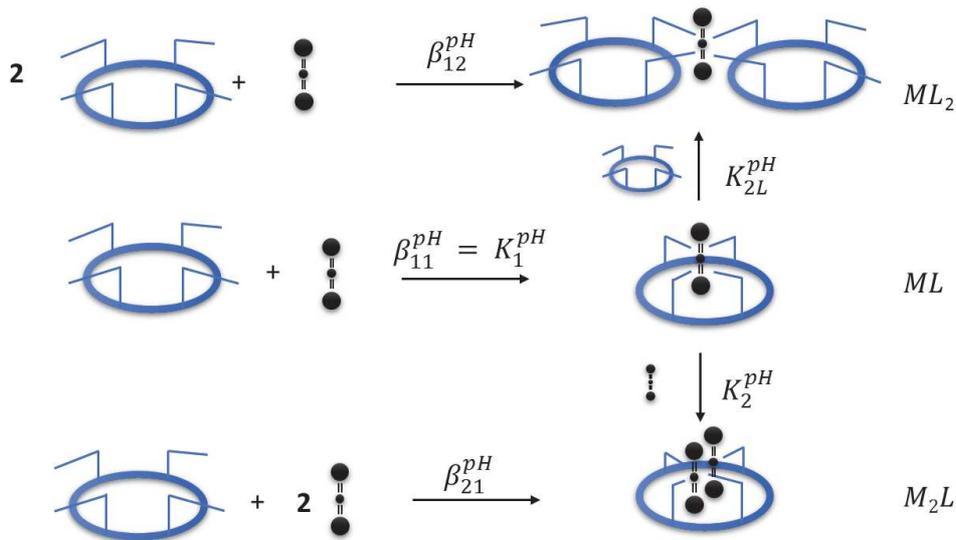


Figure 120 - Illustration schématique des équilibres de formation des complexes ML , ML_2 et M_2L

3.3.2 Evaluation des constantes apparentes de formation des complexes

Interprétation des données : quel modèle choisir ?

Les peptides pS(168) et pS(1368) forment trois complexes avec l'uranyle : ML , ML_2 et M_2L . La modélisation des données de fluorescence fait donc intervenir les trois espèces et leurs spectres de fluorescence. Faut-il considérer les complexes émetteurs ou non en fluorescence ? Trois modèles permettent d'interpréter les données. Les valeurs de constantes apparentes obtenues à pH 7,4 avec ces différents modèles varient (figure 121). La première constante de complexation est évaluée entre $10^{10,9}$ et $10^{11,3}$ selon le modèle. Il est très difficile de définir quel est le meilleur modèle et de dire si les complexes formés doivent être considérés émetteurs ou non en fluorescence.

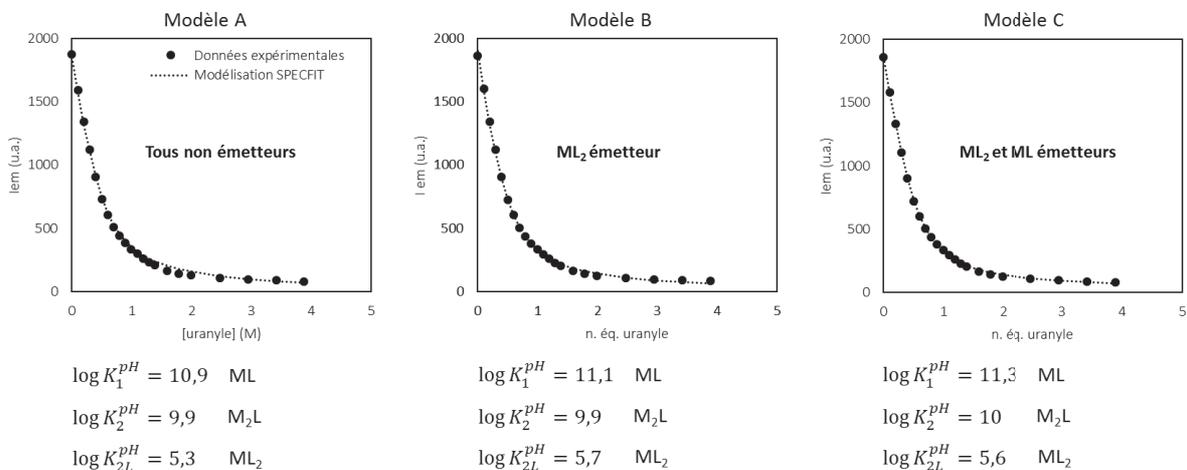


Figure 121 - Modélisation des données de fluorescence obtenues à pH 7,4 pour pS(1368)

Evolution des constantes de stabilités pour le peptide pS(1368) en fonction du pH

Le peptide pS(1368) présente quatre fonctions phosphates et est donc plus basique que les cyclodécapeptides à 1 ou 2 fonctions phosphates. Il a donc été étudié à pH plus élevé. Les constantes apparentes des trois complexes formés à pH 7, 7,4, 8 et 8,5, obtenues avec le modèle B (choisi de façon arbitraire) sont présentées dans le tableau 15. Bien que les valeurs numériques obtenues avec les trois modèles A, B et C soient différentes, des tendances similaires sont observées.

Tableau 15 - Constantes apparentes de stabilité des complexes uranyle-pS(1368) évaluées à 25 °C, à pH 7, 7,4 (milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM), 8 et 8,5 (milieu Tris 50 mM, NaCl 100 mM).

	pH 7	pH 7,4	pH 8,0	pH 8,5
log K ₁	10,5 ± 0,1	11,1 ± 0,1	11,5 ± 0,2	11,9 ± 0,2
log K ₂	9,6 ± 0,2	9,9 ± 0,1	9,8 ± 0,2	11,0 ± 0,3
log K _{2L}	6,0 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,2

La constante de stabilité apparente du complexe monométallique (K₁) augmente avec le pH, ce qui est en accord avec la basicité de ce peptide à 4 pSer. La valeur de la constante de complexation apparente (K₂) du complexe M₂L est relativement élevée et indique que le système à 4 phosphosérines est favorable à la complexation de deux cations uranyle. Enfin, le complexe ML₂ a une faible constante de stabilité apparente (K_{2L}) en comparaison des deux autres complexes. Cette espèce est plus instable que les deux autres, quel que soit le pH considéré, ce qui est probablement dû aux nombreuses charges négatives provenant des deux peptides.

Constantes apparentes pour pS(168) et pS(1368)

Nous avons eu des difficultés à modéliser les données obtenues en fluorescence avec les peptides à 3 et 4 phosphosérines. Les données obtenues à pH 7,4 avec le modèle B (choisi de façon arbitraire) sont présentées dans le tableau 16 ci-après.

Tableau 16 - Constantes apparentes de stabilité des complexes uranyle-pS(168) et uranyle-pS(1368) évaluées à 25 °C, à pH 7,4 en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM.

Peptide	log K₁	log K₂	log K_{2L}
pS(168)	10,7 ± 0,1	6 ± 2	5,8 ± 0,1
pS(1368)	11,1 ± 0,1	9,9 ± 0,1	5,7 ± 0,3

Les difficultés que nous avons rencontrées sont intrinsèquement liées à la spéciation complexe de l'uranyle en présence des peptides pS(168) et pS(1368) comme en témoigne la figure 122 présentant la répartition de l'uranyle pour des conditions similaires à celles des dosages en fluorescence.

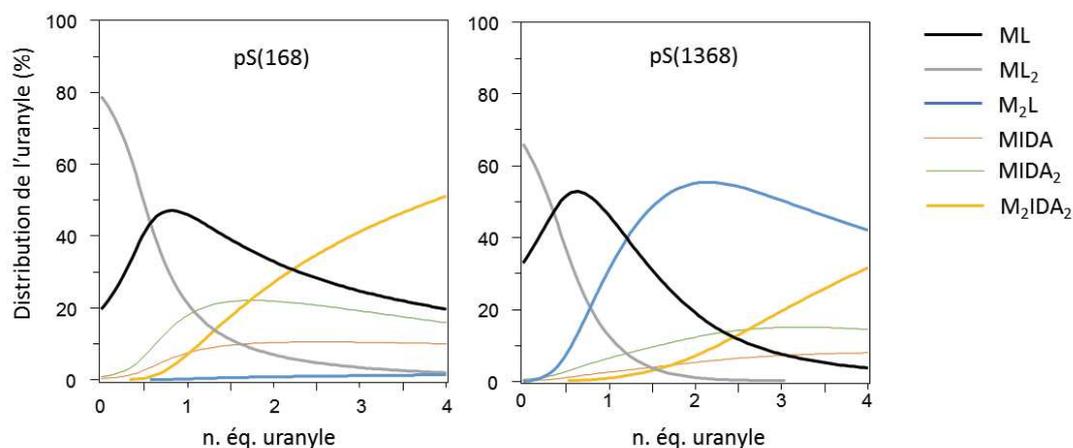


Figure 122- Spéciation de l'uranyle à pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM) en présence de peptide (10 μ M) et d'IDA (100 μ M)

Les espèces ML, ML₂ et M₂L formées avec les peptides pS(168) ou pS(1368) ont des spectres semblables. Il est donc délicat de choisir un modèle c'est-à-dire de définir si les trois complexes formés permettent ou non d'éteindre complètement la fluorescence du tryptophane. Une méthode d'évaluation de constantes apparentes s'affranchissant de la fluorescence de ces espèces permettrait d'évaluer de façon plus fiable la stabilité des complexes. Une telle méthode, basée non pas sur la fluorescence des espèces ML, M₂L et ML₂ mais sur le signal d'une sonde compétitrice non naturelle a été développée au laboratoire. Sa mise au point et les résultats préliminaires obtenus sont présentés au chapitre IV.

Malgré ces difficultés, des tendances ont pu être observées et les résultats obtenus suggèrent que l'augmentation du nombre de phosphosérines dans un cyclodécapeptide est favorable à la formation d'un complexe monométallique de constante apparente élevée ($K_1 = 10^{11}$ environ), suggérant que le site de haute affinité de l'OPN ($K_1 = 10^{11,5}$) implique 4 phosphosérines.

3.3.3 Comparaison avec un peptide linéaire

Le peptide pS(1368)-Lin a été étudié par ESI-MS en présence d'un équivalent d'uranyle. De nombreux signaux sont observés. Ils correspondent aux espèces dichargées du peptide pS(1368)-Lin libre et des complexes de stœchiométries 1:1, 2:1, 2:2, 3:2 et 4:2. Comme nous l'avons vu en section 3.3.1, seuls les complexes ML et M₂L sont visibles sur les spectres ESI-MS de pS(1368). La spéciation de l'uranyle en présence de peptide tétraphosphorylé linéaire est donc complexe.

Les courbes d'extinction de fluorescence obtenues à pH 7,4 pour les peptides tétraphosphorylés linéaire et cyclique sont comparées en figure 123.

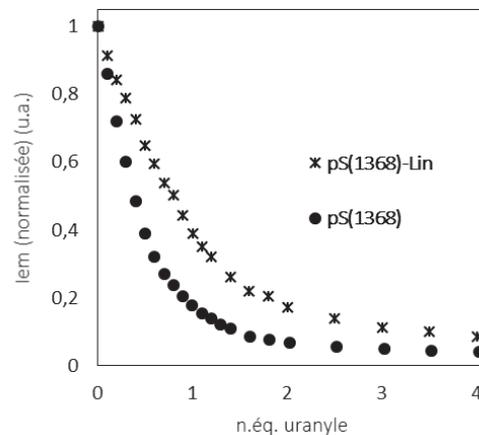


Figure 123 - Extinction de fluorescence à 350 nm pour les dosages de pS(1368) et pS(1368)-Lin (10 μ M) en présence d'IDA (10 équivalents) en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à pH 7,4, à 25°C.

Pour des conditions d'analyse identiques, l'extinction de fluorescence du peptide linéaire est moins marquée que celle du peptide cyclique. Ces résultats indiquent que l'absence de structure cyclique entraîne une perte de stabilité du complexe ML. La structure cyclique est donc plus affine que la structure linéaire grâce à la préorientation des quatre groupes phosphates.

3.3.4 Sélectivité uranyle/calcium

Compétition directe

Nous avons procédé à des expériences de compétition entre uranyle et calcium pour déterminer la sélectivité des peptides pS(168) et pS(1368) à pH 7,4 selon le même protocole que celui présenté en section 3.2.3 pour les peptides à 2 pSer (figure 124). Les deux peptides ont le même comportement. Après formation des complexes uranyle-peptide en solution (en jaune), l'ajout de 500 à 10 000 équivalents de calcium n'a qu'un très faible impact sur la fluorescence de l'échantillon. Toutefois, contrairement aux peptides diphosphorylés pour lesquels l'ajout de 10 000 équivalents de calcium à une solution de peptide libre n'impliquait pas de variation de fluorescence, une extinction d'environ 30% de la fluorescence est ici observée (en bleu). L'expérience de compétition ne permet donc pas de conclure quant à la sélectivité des peptides pour l'uranyle. La formation de complexes mixtes dans le cadre des compétitions uranyle/calcium n'est par ailleurs pas exclue.

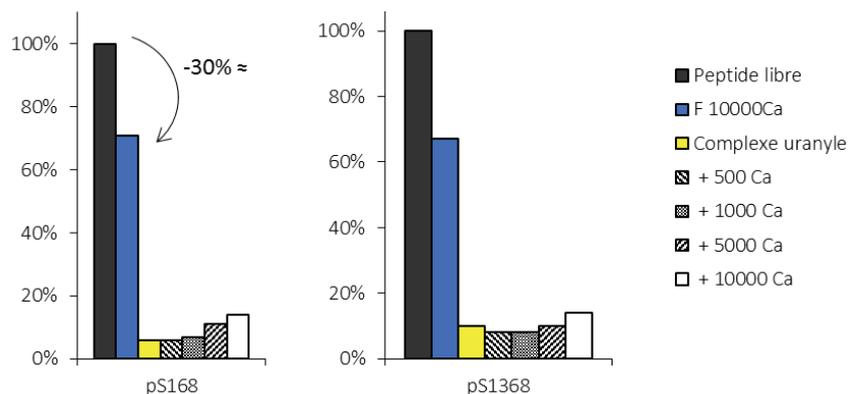


Figure 124 –Compétition uranyle/calcium suivie par fluorescence pour les peptides tri- et tétraphosphorylés, à pH 7,4. A une solution de peptide (ca. 10 μM en noir) sont ajoutés 2 équivalents d' UO_2^{2+} (jaune) puis 500 à 10 000 équivalents de calcium. La barre bleue représente une solution de peptide à laquelle seuls 10 000 équivalents de Ca^{2+} sont ajoutés.

Dosage des peptides par ajout de calcium

Suite aux résultats obtenus avec l'expérience précédente, nous avons choisi d'exploiter l'extinction de fluorescence qui a lieu en présence de calcium et de réaliser des dosages par ajout de calcium à pH 7,4, en l'absence de compétiteur.

Les courbes d'extinction de fluorescence obtenues ont été modélisées avec le logiciel Specfit, à l'aide d'un modèle ne faisant intervenir qu'un seul complexe calcium-peptide de stœchiométrie 1:1 (figure 125). Les constantes apparentes de complexation sont évaluées à $K_1 = 10^{3,0 \pm 0,1}$ pour le peptide pS(168) et à $K_1 = 10^{2,0 \pm 0,1}$ pour pS(1368). Ces constantes sont très faibles comparées à celles obtenues pour la formation du complexe UO_2 -peptide ($>10^{10}$). Les peptides porteurs de 3 ou 4 pSer sont donc très sélectifs vis-à-vis de l'uranyle en compétition avec le calcium, à pH physiologique.

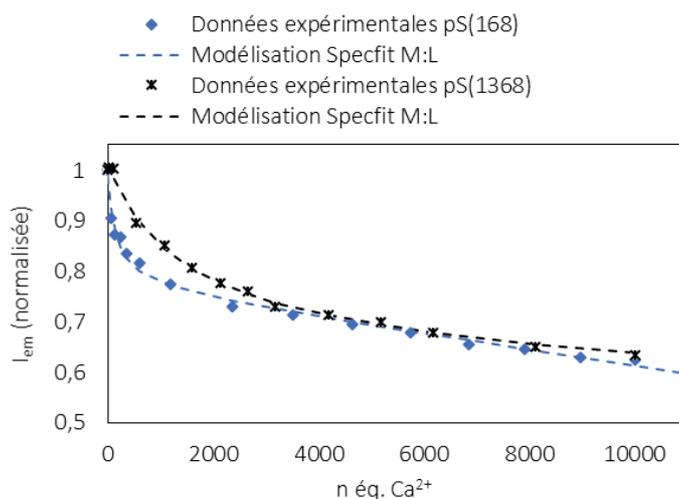


Figure 125 - Modélisation des données obtenues en fluorescence pour les dosages de pS(168) et pS(1368) par ajout de quantités croissantes de calcium, en milieu HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, à pH 7,4, à 25°C..

En résumé, l'ajout d'une troisième puis d'une quatrième pSer impacte la spéciation de l'uranyle en solution et la stabilité du complexe monométallique. La formation de trois complexes ML, ML₂ et M₂L est observée. La spéciation est plus compliquée qu'avec des peptides mono- ou diphosphorylés et rend l'évaluation des constantes de stabilité apparentes délicates. Une méthode s'affranchissant de la fluorescence des différentes espèces permettrait une évaluation plus fiable des constantes apparentes. Des tendances sont observées malgré les incertitudes sur les constantes. A pH physiologique, l'augmentation progressive du nombre de phosphosérines dans les cyclodécapeptides entraîne une augmentation de la stabilité du complexe ML jusqu'à atteindre une valeur d'environ 10¹¹. Cette valeur est relativement proche de celle obtenue pour l'OPN et indique que le site de haute affinité de l'OPN pourrait impliquer 4 pSer. Des analyses complémentaires par EXAFS permettraient notamment d'évaluer la contribution de chaque fonction phosphate en première sphère de coordination de l'uranyle. Dans l'ensemble, les résultats sont cohérents avec ce que l'on observe pour l'OPN phosphorylée et permettent de valider le modèle pS(1368) comme mime bioinspiré du site de haute affinité OPN-uranyle.

4 Conclusion

L'objectif de cet axe du projet était de proposer des peptides bioinspirés conçus *de novo* de façon à mimer l'environnement de coordination de l'uranyle dans les protéines phosphorylées dont l'ostéopontine (OPN). Une structure cyclique développée au laboratoire depuis plusieurs années a été choisie comme point de départ. Deux motifs Pro-Gly induisent l'orientation des chaînes latérales aux positions stratégiques 1, 3, 6 et 8 dans une même direction et la structuration en feuillet β antiparallèle lors de la complexation. Par ailleurs, les peptides linéaires, qu'ils soient composés de glutamates ou de phosphosérines, ne sont pas adaptés à notre étude car ils ne permettent pas de contrôler la spéciation, ni d'identifier les facteurs clés régissant les interactions protéine phosphorylée -uranyle.

Des cyclodécapeptides à 1, 2, 3 ou 4 phosphosérines ont donc été synthétisés pour identifier et rationaliser le rôle des fonctions phosphates dans la coordination de l'uranyle. La difficulté des synthèses et des purifications augmente significativement avec le nombre de fonctions phosphates introduites. Les peptides mono- et diphosphorylés ont été synthétisés par introduction de résidus phosphorylés sur support solide. Cette voie de synthèse s'est cependant avérée infructueuse pour les composés contenant 3 ou 4 phosphosérines. Par conséquent, un protocole original permettant d'accomplir les réactions de cyclisation et phosphorylation globale sur support a été proposé pour la synthèse des composés tri- et tétraphosphorylés (figure 126).

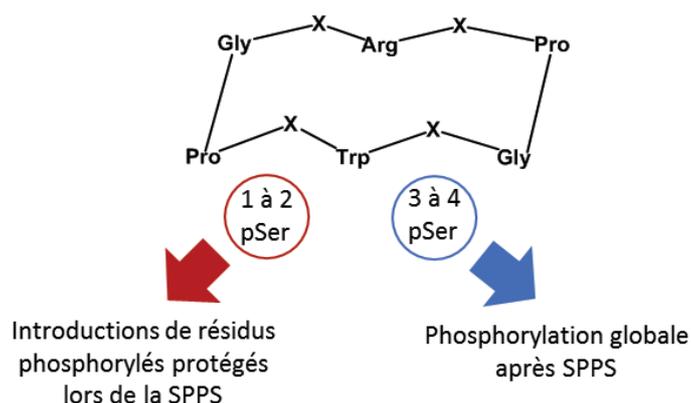


Figure 126 - Stratégies de synthèse pour peptides polyphosphorylés

L'étude de la sélectivité des peptides entre uranyle et calcium confirme que les peptides porteurs de deux à quatre phosphosérines sont sélectifs de l'uranyle, de même que l'OPN phosphorylée est sélective pour ce métal. La structuration des complexes formés avec les peptides phosphorylés est moins

importante qu'avec un composé polyglutamate de référence mais reste caractéristique de la formation d'un feuillet β antiparallèle lors de la complexation.

Pour les peptides contenant zéro à une pSer, la spéciation de l'uranyle est simple puisqu'un seul complexe se forme, le complexe monométallique ML. Ces peptides permettent ainsi de rationaliser le rôle de la première fonction phosphate dans la coordination de l'uranyle en simplifiant le site de complexation. A pH physiologique, dès l'introduction d'une pSer, on observe une augmentation de l'affinité des peptides d'un facteur d'environ 20 par rapport au peptide polyglutamate de référence A1. Les 4 peptides monophosphorylés synthétisés ont la même affinité pour l'uranyle, indépendamment de la position de la pSer dans l'architecture peptidique. La même tendance est observée avec les peptides diphosphorylés sauf pour pS(16) qui possède une affinité élevée pour l'uranyle et est capable de piéger deux cations dans un complexe structuré en feuillet β . Les pSer 1 et 6, dont les chaînes latérales sont plus flexibles car à proximité d'une glycine, favorisent la formation d'un complexe dimétallique structuré avec les peptides pS(16), pS(168) et pS(1368). Des phosphates pontants permettraient cet arrangement.

Les pSer 1 et 6 ont donc été conservées pour les peptides porteurs de 3 et 4 pSer. En augmentant le nombre de pSer à 3 ou 4, trois complexes ont été identifiés en présence des peptides pS(168) et pS(1368) : ML, ML₂ et M₂L. Cette spéciation plus complexe peut être due à la concentration de charges négatives au niveau du site de liaison du métal (7 sur pS(168) et 8 sur pS(1368)). La présence des trois complexes conduit à des difficultés d'interprétation des dosages par fluorescence pour l'évaluation des constantes apparentes. A pH physiologique, une augmentation progressive de la stabilité du complexe ML en lien avec le nombre de phosphosérines dans la structure est néanmoins observée :

$$A1 < pS(X) < pS(XX) \leq pS(168) < pS(1368)$$

La constante apparente de stabilité du complexe UO₂-pS(1368) à pH physiologique est d'environ 10¹¹. Le peptide pS(1368) peut donc être proposée comme mime du site de haute affinité de l'OPN pour l'uranyle, dont la constante apparente a été évaluée à 10^{11,5} par EC-ICP-MS par Huynh *et al.*⁶⁸ Par ailleurs, 9 sites OPN-uranyle ont été dénombrés et seule la constante du site de haute affinité a été évaluée. Les peptides porteurs d'une à trois phosphosérines pourraient donc être représentatifs de certains des 8 autres sites de liaison de l'uranyle dans l'OPN.

CHAPITRE IV – METHODE DE COMPETITION *IN SITU*
POUR LA DETERMINATION DE CONSTANTES APPARENTES

Introduction au chapitre IV

Le troisième et dernier axe de ce projet porte sur le développement d'une sonde fluorescente permettant de classer différents ligands de l'uranyle *via* la détermination d'une constante apparente d'affinité. La fluorescence est une technique particulièrement intéressante pour réaliser des compétitions *in situ*, en milieu homogène, à l'équilibre. Elle permet d'exciter un fluorophore à une longueur d'onde caractéristique et donc de visualiser une interaction spécifique. Cette technique présente cependant des limites : une protéine ne portant pas de fluorochrome ne peut pas être étudiée par fluorescence car il y a absence de réponse, et deux cibles en compétition portant des fluorochromes identiques ou bien dont les propriétés de fluorescence sont proches mènent à un signal complexe, difficile à interpréter. Que ce soit lors de l'étude de la FETUA et des domaines D1 et D2 (chapitre II), ou des cyclodécapeptides porteurs de trois à quatre phosphosérines (chapitre III), nous avons également été confrontés à plusieurs difficultés lors de la modélisation des données expérimentales obtenues en fluorescence. Les données dont nous disposons sont parfois insuffisantes pour choisir le modèle interprétant au mieux l'extinction de fluorescence observée : nombre et stœchiométrie des complexes considérés, extinction complète ou non de fluorescence. Il est indispensable de pouvoir s'affranchir de ces différents problèmes, et de tirer profit d'une technique permettant d'évaluer la constante d'affinité d'un peptide ou d'une protéine pour l'uranyle.

Nous nous sommes proposés de mettre en œuvre une méthode universelle basée sur un fluorophore non naturel dont la réponse en fluorescence permet de s'affranchir du signal de toute autre espèce biologique. Une série d'hexapeptides porteurs de résidus aminodiacétates et dont la structure a été conçue pour complexer les cations lanthanides (Ln^{3+}) a été développée au laboratoire.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Leur structure a été adaptée à la reconnaissance de l'ADN via l'introduction de molécules aromatiques fluorescentes jouant le rôle d'intercalants.^{171,172} Nous avons tiré profit de l'ensemble des connaissances acquises au laboratoire pour étudier la complexation de l'uranyle avec ces différentes sondes.

La séquence du peptide, sa structure, la nature des groupes chélateurs et de l'intercalant ainsi que l'interaction avec l'uranyle sont discutées en première section. Suite aux résultats obtenus, nous avons souhaité développer des cyclodécapeptides non naturels. La conception et les études préliminaires de ces composés sont présentées en deuxième section. La dernière section de ce chapitre illustre la mise en applications des compétitions au travers de deux exemples.

1 Hexapeptides non naturels

1.1 Peptide référence P²² : conception et propriétés complexantes

1.1.1 Conception rationnelle de peptides hexadentes pour la chélation de lanthanides

Depuis plusieurs années, le laboratoire développe des ligands permettant de complexer les lanthanides dans le but de concevoir de nouvelles sondes de reconnaissance de l'ADN. Le développement de telles sondes a nécessité la mise au point de ligands peptidiques affins pour les cations Ln³⁺. Selon la théorie HSAB (voir chapitre I), les lanthanides interagissent préférentiellement avec des ligands durs et notamment des atomes d'oxygènes donateurs. Le nombre de coordination peut aller de 6 à 12, bien que le plus souvent il soit de 8 ou 9.

De par leur biocompatibilité et la versatilité de leur synthèse, les peptides constituent une piste de réflexion intéressante. Kovacic *et al.* ont synthétisé des agents de clivage spécifiques de l'ADN, et Franz *et al.* ont conçu des LBTs (lanthanide binding tags), agents multitâches complexant les lanthanides.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Les acides aminés naturels ne permettent cependant pas d'atteindre des constantes de stabilité suffisamment élevées. Le laboratoire a donc conçu des acides aminés non naturels dont les chaînes latérales sont substituées par des fonctions aminodiacétates.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Ces fonctions sont identiques à celles que portent les ligands multidentes de la famille des polyaminocarboxylates (EDTA, DTPA, DOTA - voir figure 127) qui ont des affinités bien plus élevées pour les lanthanides que les peptides naturels grâce à de nombreux effets chélates. Les constantes apparentes d'affinité de ces ligands pour le gadolinium sont évaluées à pH 7,4 à $K_1(\text{EDTA}) = 10^{14,7}$, $K_1(\text{DOTA}) = 10^{17,7}$ et $K_1(\text{DTPA}) = 10^{18,3}$.¹⁷⁶

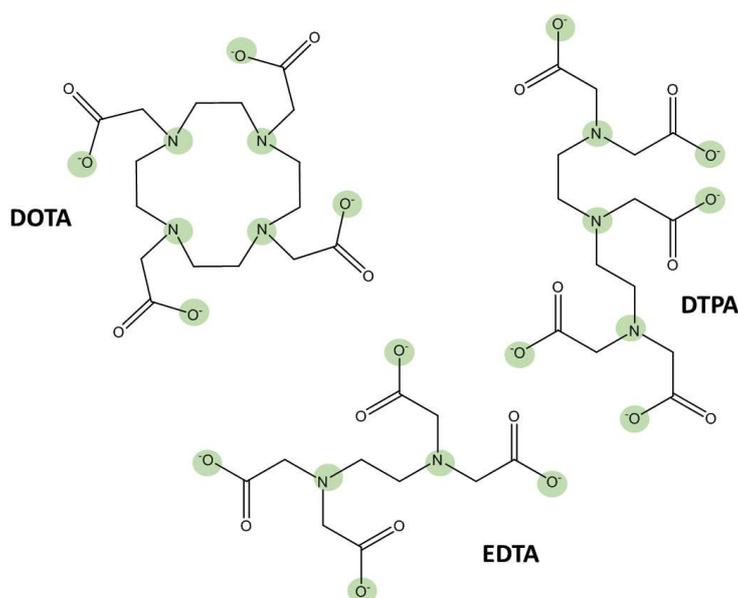


Figure 127 – Les ligands polyaminocarboxylates DOTA, EDTA et DTPA

Acides aminés synthétiques

Plusieurs résidus non naturels nommés Ada_n ont été synthétisés. Les fonctions aminodiacétates sont conservées mais la longueur de chaîne, notée n , est variable, allant de 1 à 3 carbones (figure 128).^{167,168} Chaque bras Ada_n se comporte comme un chélateur tridenté. Deux acides aminés modifiés sont introduits dans la séquence peptidique pour obtenir un nombre de coordination de 6 pour le cation lanthanide.

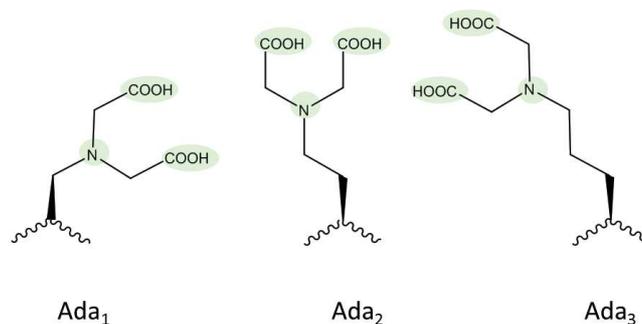


Figure 128 - Acides aminés non naturels Ada_n

Structure peptidique

Si le choix des fonctions chélatantes est crucial, nous avons pu voir au cours des chapitres I et III que l'adéquation entre une structure peptidique et une cible métallique favorisait la formation de complexes monométalliques plus stables. En ce qui concerne les lanthanides et la conception de peptides chélateurs, les deux acides aminés Ada_n sont introduits de part et d'autre d'un coude β (enchaînement Pro-Gly) qui induit un changement de direction de la chaîne peptidique (figure 129). Ce motif tend à favoriser la structuration du peptide et la coordination du cation métallique en mode hexadente.

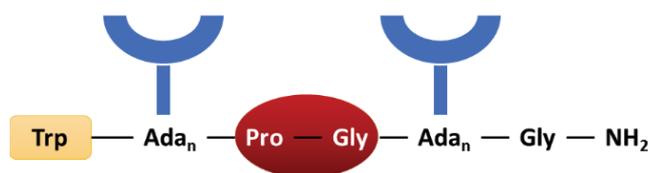


Figure 129 - Structure linéaire des hexapeptides P^n

Sensibilisation du lanthanide

Les lanthanides dont la couche f est partiellement remplie ont des propriétés luminescentes. Leur coefficient d'extinction molaire est cependant relativement faible et implique que l'excitation directe des lanthanides est difficile. Un chromophore peut en revanche jouer le rôle d'intermédiaire et permettre de sensibiliser le lanthanide *via* un transfert d'énergie. Les peptides ont été fonctionnalisés avec un résidu naturel fluorescent, le tryptophane, ajouté à proximité du site de liaison du métal, pour

permettre une sensibilisation par effet d'antenne. La proximité du chromophore induit un meilleur transfert d'énergie au cation métallique et donc une meilleure sensibilisation. En résulte une luminescence plus intense du lanthanide.

Complexation des lanthanides

Les résultats obtenus par notre équipe lors des études de complexation du terbium par les peptides Pⁿⁿ à pH 7,0 sont recensées dans le tableau 17.

Tableau 17 - Informations sur les complexes Pⁿⁿ-Tb³⁺ à pH 7,0. Source : Ancel et al.¹⁷⁰

	log K ₁ à pH 7,0 (Tb ³⁺)	Structure du complexe	Formation d'espèces polymétalliques ?
P ¹¹	10,3	Forme S	Oui
P ²²	9,1	Forme U	Non
P ³³	5,4	-	Oui

Dans le peptide P¹¹, la présence de deux unités Ada₁ aux bras plus courts contraint davantage la structure. Dans ce complexe, structuré en « S », le nombre de coordination du lanthanide est de 7 (figure 130a). Une contribution de l'oxygène de la fonction carbonyle du résidu Ada₁ est observée. Par ailleurs, en raison des contraintes géométriques observées, des espèces polymétalliques sont susceptibles de se former.¹⁶⁸

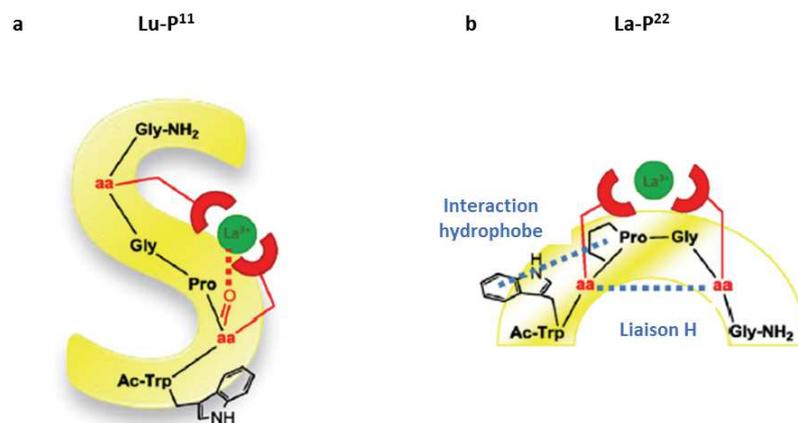


Figure 130 - Structures de complexes a. P¹¹-Lu et b. P²²-La

Dans le peptide P²², la structure adoptée par le peptide lors de la complexation du lanthanide est en forme de « U » (figure 130b), grâce à la présence du coude β et à l'existence d'interactions stabilisantes : liaison hydrogène entre les deux résidus Ada₂ et interaction hydrophobe entre le cycle du tryptophane et la proline. Dans ce complexe le nombre de coordination du peptide est de 6. La présence de cette structure en « U » favorise le positionnement des unités aminodiacétates l'une en face de l'autre et la

formation d'un complexe monométallique stable ($\log K_1 = 9,1$ à pH 7,0). Aucun complexe polymétallique n'a par ailleurs été observé.¹⁶⁷

Dans le peptide P³³, la présence de deux unités Ada₃ dont les chaînes latérales sont plus longues induit une flexibilité trop importante qui défavorise la formation d'un complexe monométallique stable ($\log K_1 = 5,4$ à pH 7,0). Chaque unité Ada₃ agit de façon presque totalement indépendante et la formation de complexes polymétalliques a été observée.¹⁶⁷

Une structure adaptée à la complexation de l'uranyle ?

La structure en « U » de la sonde P²² pourrait être adaptée à la géométrie de coordination de l'uranyle (figure 131). P²² constitue par ailleurs un mime peptidique de l'EDTA, dont la constante apparente d'affinité s'élève à $K_1 = 10^{8,1}$ à pH 7,0. Cette constante a été calculée à l'aide des équations (10) et (12) présentées au chapitre I, à partir de la valeur de constante absolue référencée dans la littérature ($\beta_{110} = 10^{11,4}$) et des pKa de l'EDTA en milieu KNO₃ 100 mM.^{177,178} L'espaceur existant entre les deux fonctions chélatantes Ada₂ permettrait la formation d'un complexe monométallique P²²-uranyle *a priori* plus stable à pH 7 que le complexe EDTA-uranyle.

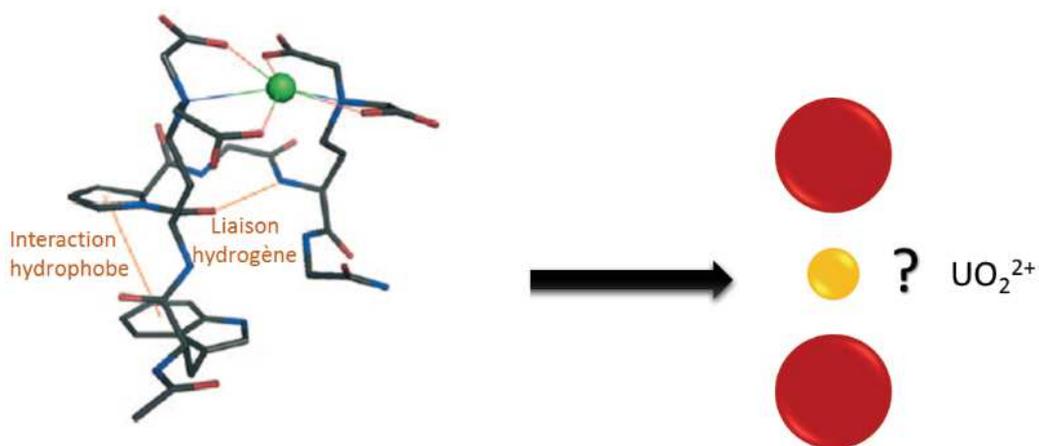


Figure 131 - La structure du peptide P²² favorable à la complexation de cations sphériques Ln³⁺ est-elle adaptée à la géométrie linéaire du cation UO₂²⁺ ?

1.1.2 Interaction P²²-uranyle

Spectrométrie de masse et spéciation

Le peptide P²² a été analysé par spectrométrie de masse à pH 7, en présence d'un équivalent d'uranyle. Le spectre obtenu en mode négatif (figure 132) indique que seul le complexe monométallique se forme.

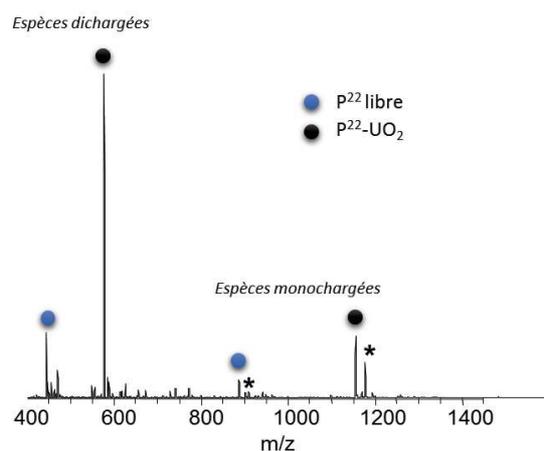


Figure 132 - (-)-ESI-MS de P^{22} (ca. $94 \mu\text{M}$) en présence d'un équivalent d'uranyle, en milieu NH_4OAc 20 mM, à pH 7,0. (*) indique un adduit sodium.

Fluorescence et détermination de constantes apparentes

Le peptide P^{22} a été dosé à pH 7,0 en présence de 10 équivalents d'IDA, par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Le dosage a été suivi par fluorescence en excitant l'échantillon à 280 nm (figure 133a). La courbe d'extinction de fluorescence à 350 nm est reportée en figure 133b, elle prend en compte les phénomènes de dilution induits par les ajouts successifs d'uranyle.

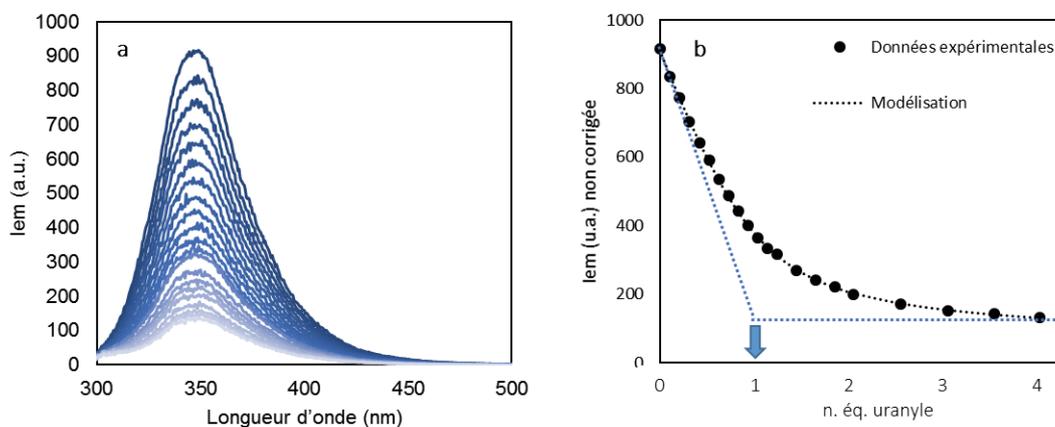


Figure 133 - Dosage du peptide P^{22} ($4 \mu\text{M}$ en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM) par ajout de doses croissantes d'uranyle, à pH 7,0, à 25°C en présence de 10 équivalents d'IDA. a. Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$). b. Modélisation par Specfit de l'extinction de fluorescence à 350 nm.

L'inflexion de la courbe d'extinction de fluorescence est observée pour 1 équivalent d'uranyle ajouté, indiquant la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1 uranyle: P^{22} . Les données expérimentales ont été modélisées en considérant la seule formation du complexe ML. Ce complexe est considéré émetteur c'est-à-dire qu'il ne permet pas une extinction totale de la fluorescence du tryptophane. La constante apparente de formation du complexe ML a été évaluée à $K_1 = 10^{9,5 \pm 0,1}$ à pH 7,0. Cette valeur

est plus élevée que celle d'un cyclodécapeptide polyglutamate ($K_1 = 10^{8,2 \pm 0,1}$, voir chapitre III) témoignant des bonnes propriétés chélatantes des aminodiacétates pour l'uranyle mais également de l'adéquation entre la structure du ligand et la géométrie linéaire du cation.

Le peptide P^{22} correspond à un mime peptidique de l'EDTA présentant à pH 7 une affinité apparente environ 25 fois plus importante pour l'uranyle que l'EDTA. Les deux chélateurs arborent les mêmes fonctions aminodiacétates. La différence d'affinité observée résulte donc de la différence de structure existant entre P^{22} et l'EDTA. La structure en « U » de P^{22} avec présence d'un espaceur Pro-Gly et de liaisons stabilisantes est plus flexible que le pont éthylènediamine de l'EDTA et permet aux deux fonctions aminodiacétates de se positionner dans le plan équatorial de l'uranyle sans contraintes stériques majeures. P^{22} représente donc un bon compromis entre flexibilité et préorganisation qui permet d'accroître la stabilité du complexe d'uranyle par rapport à la structure rigide de l'EDTA.

1.2 Sondes non naturelles PflP²² et NaphP²²

Le peptide P^{22} a été modulé pour la reconnaissance de l'ADN par les complexes P^{22} -lanthanides grâce à la présence d'un intercalant de l'ADN greffé en fin de séquence, à la place du tryptophane (figure 134). Divers fluorophores, parmi lesquels la proflavine et le naphthalimide, ont été testés au laboratoire à la fois pour leurs propriétés de sensibilisation des lanthanides et leurs propriétés d'intercalation de l'ADN. Ces fluorophores présentent des propriétés physicochimiques caractéristiques qui permettent de s'affranchir de la fluorescence des systèmes biologiques. Seuls le naphthalimide et la proflavine sont présentés ici.^{171,172}

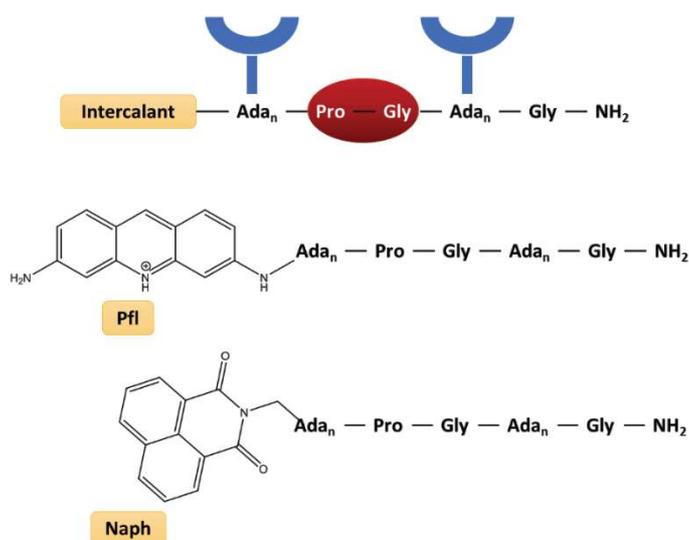


Figure 134 - Sondes $NaphP^{22}$ et $PflP^{22}$: le tryptophane est remplacé par un noyau aromatique non naturel permettant d'intercaler l'ADN et de sensibiliser le lanthanide.

1.2.1 La proflavine

La proflavine est une diaminoacridine, notamment connue pour se lier à l'ADN et à l'ARN (figure 135). Elle a été employée pour faire du marquage cellulaire en fluorescence.^{179,180}

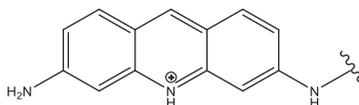


Figure 135 - Noyau Proflavine protonné à pH 7

La température et le pH modulent l'émission de fluorescence de ce noyau aromatique. Les spectres de l'acridine (non substituée, non greffée) sous ses formes neutre et protonnée sont présentés en figure 136 et permettent d'illustrer ce phénomène.¹⁵² La proflavine est protonnée à pH 7,0. Elle émet en fluorescence autour de 500 nm après avoir été soumise à sa longueur d'onde maximale d'absorption (449 nm). Les niveaux d'énergie des états singulets et triplet de la proflavine sont présentés en figure 137.

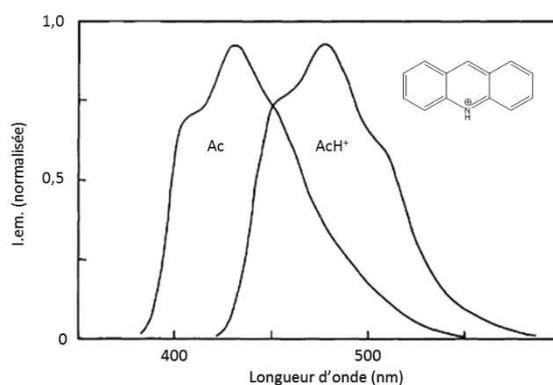


Figure 136 - Spectres d'émission de l'acridine sous ses formes neutre et protonnée. Source : Lakowicz¹⁵²

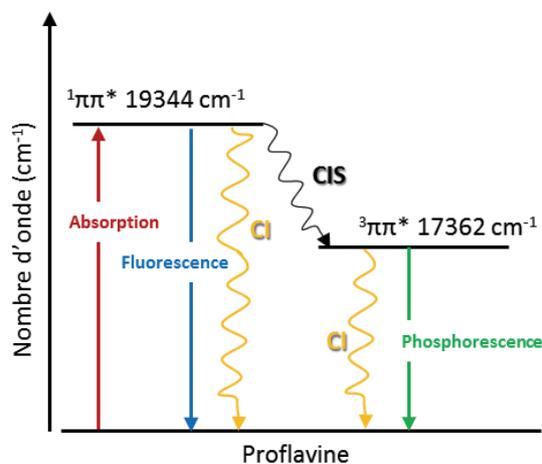


Figure 137 - Niveaux d'énergie de la proflavine et principaux phénomènes radiatifs et non radiatifs. CI = conversion interne et CIS = croisement inter-système.

1.2.2 Le naphthalimide

Le 1,8-naphthalimide est un aromatique polycyclique qui est connu pour sensibiliser l'ion Eu^{3+} (figure 138). C'est en revanche un moins bon intercalant de l'ADN que la proflavine.

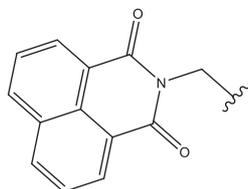


Figure 138 - Noyaux 1,8-naphthalimide

Lorsque le noyau est soumis à sa longueur d'onde d'absorption maximale (345 nm) à pH 7,0, il émet un signal de fluorescence à 380 nm correspondant au niveau d'énergie de son état excité singlet $^1\pi\pi^*$ (figure 139).

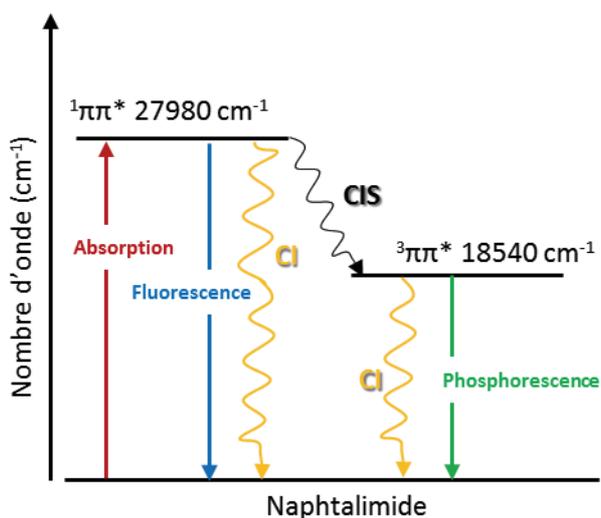


Figure 139 - Niveaux d'énergies du naphthalimide et principaux phénomènes radiatifs et non radiatifs. CI = conversion interne et CIS = croisement inter-système.

1.2.3 Interaction avec l'uranyle

Etude de la stabilité photochimique de PflP²² et NaphP²²

Les peptides PflP²² et NaphP²² ont été titrés en présence de 10 équivalents d'IDA, à pH 7,0, par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Les dosages ont été suivis par fluorescence en soumettant chaque échantillon à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du fluorophore, soit à 350 nm pour le naphthalimide et à 449 nm pour la proflavine (figures 140a et 140b). Les courbes d'extinction de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission maximale sont reportées en figures 140c et 140d, et tiennent compte des phénomènes de dilution induits par l'ajout d'uranyle. En parallèle de

chaque dosage, la fluorescence de références contenant respectivement les peptides PflP²² ou NaphP²² et dans lesquels aucun ajout d'uranyle n'est effectué est également mesurée à intervalles réguliers afin de contrôler la stabilité de la sonde en l'absence de métal. Le report de l'émission de fluorescence de la référence est présenté sur le même graphe que la courbe d'extinction de fluorescence obtenue lors de chaque dosage (figures 140c et 140d).

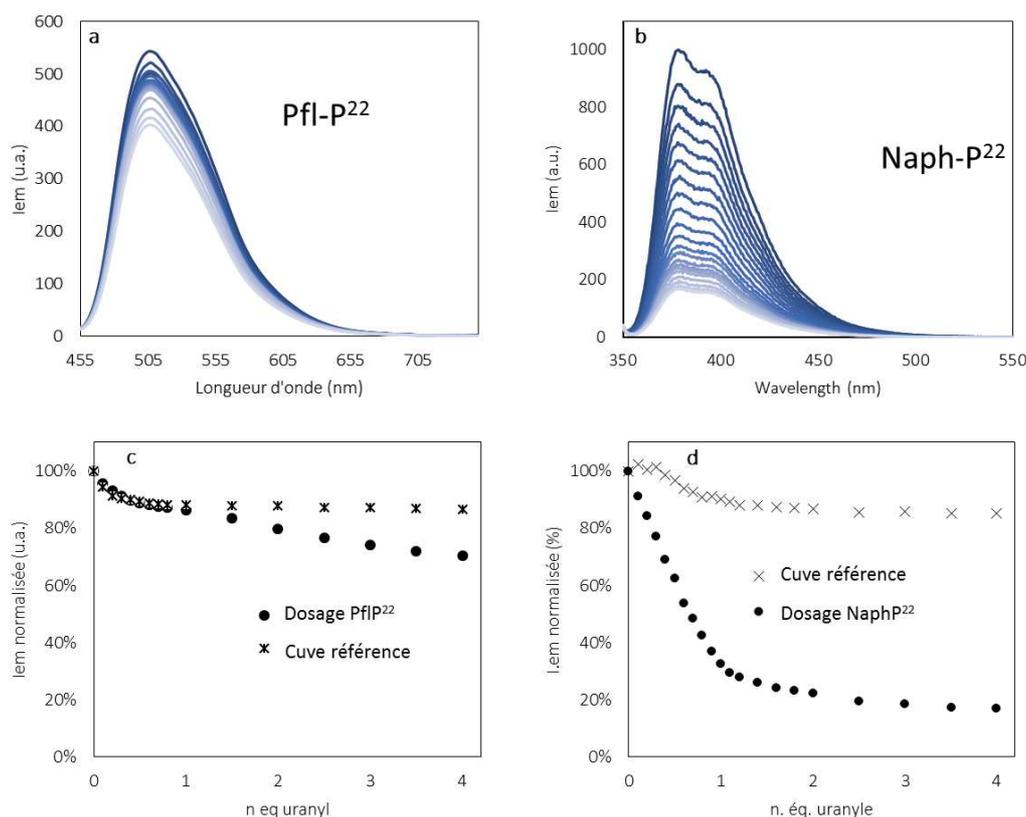


Figure 140 - Dosage des peptides PflP²² et NaphP²² en présence de 10 équivalents d'IDA à pH 7,0, par ajout de doses croissantes d'uranyle. a et b. Spectres de fluorescence, à 25°C ($\lambda_{ex} = 445\text{nm}$ pour PflP²² et 344nm pour NaphP²²). c et d. Courbes d'extinction de fluorescence pour les cuvettes de dosage et les cuvettes références ne contenant pas d'uranyle.

La mesure de l'intensité de fluorescence émise par chaque peptide seul en solution (cuvettes références) indique pour chacune des deux sondes un phénomène de photoblanchiment se caractérisant par une perte de fluorescence due à une altération photochimique du fluorophore. La résistance d'un fluorophore au photoblanchiment détermine le nombre moyen de photons qu'il peut émettre avant d'être détruit, c'est à dire le nombre moyen de cycles d'excitation-relaxation qu'il est en mesure de subir.¹⁵² Le photoblanchiment d'un fluorophore représente parfois un frein aux études de fluorescence. Les courbes obtenues indiquent une perte permanente de fluorescence de 15% pour la proflavine et le naphthalimide, sur environ 12h (durée de l'expérience).

Lors du dosage de PflP²² par ajout d'uranyle (figure 140c, cercles noirs), une faible extinction de fluorescence est observée (environ 30%). L'absence d'une franche extinction de fluorescence et la présence du phénomène de photoblanchiment ne permettent pas de détecter la formation du complexe PflP²²-uranyle. La proflavine n'est donc pas adaptée à la visualisation de la formation d'un complexe peptide-uranyle. Pour NaphP²² (figure 140d cercles noirs) l'extinction de fluorescence observée en présence de métal est beaucoup plus marquée, et la rupture de pente à 1 équivalent indique la formation du complexe NaphP²²-uranyle attendu.

Constante d'affinité apparente de NaphP²² pour l'uranyle

Les données expérimentales obtenues par dosage du peptide NaphP²² en fluorescence ont été modélisées en considérant la seule formation du complexe de stœchiométrie 1:1 qui ne permet pas une extinction totale de la fluorescence du tryptophane (figure 141). La modélisation est tout à fait satisfaisante et la constante apparente de formation du complexe ML est évaluée à $K_1 = 10^{9,7 \pm 0,1}$. Cette valeur est égale à celle du complexe P²²-uranyle ($\log K_1 = 9,5 \pm 0,1$) compte tenu des barres d'erreurs.

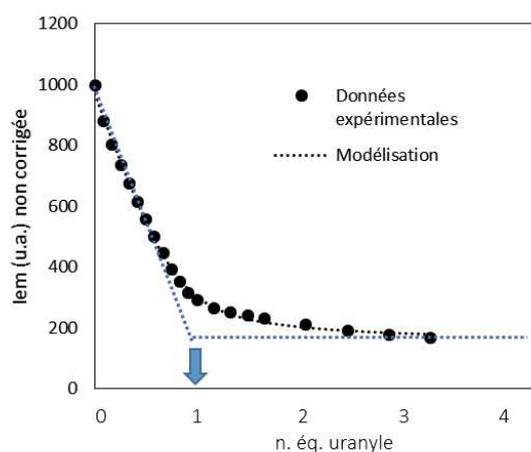


Figure 141 - Modélisation de la courbe d'extinction de fluorescence à 380 nm de NaphP²²

L'uranyle permet donc bien d'éteindre la fluorescence du naphthalimide lors de la formation du complexe uranyle-NaphP²² et la courbe d'extinction de fluorescence obtenue peut être exploitée pour évaluer la constante apparente d'affinité du peptide pour l'uranyle. NaphP²² présente des propriétés chélatantes et photochimiques intéressantes pour mettre au point des compétitions *in situ*. Des tests complémentaires sont cependant nécessaires pour valider la sonde.

1.3 Tests préliminaires de compétition *in situ*

1.3.1 Compétition NaphP²²-P²²

L'objectif est d'évaluer la stabilité de la sonde NaphP²² en présence d'une autre molécule dont les propriétés de fluorescence diffèrent, et de vérifier que le signal obtenu est bel et bien sélectif. Une compétition a donc été réalisée à pH 7,4 entre P²² porteur d'un tryptophane et NaphP²² porteur du naphthalimide (figure 142). Ces peptides ont des affinités similaires pour l'uranyle et permettront d'étudier le comportement de NaphP²² lorsque l'uranyle se partage entre les deux ligands.

Trois solutions sont préparées : (i) une cuve contenant P²² seul (2 μ M) ; (ii) une cuve avec NaphP²² seul (2 μ M) et (iii) une cuve de compétition contenant les deux ligands P²² et NaphP²² (2 μ M chaque). Chaque échantillon est titré par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Aucun compétiteur (IDA ou carbonate) n'est ajouté. Les données obtenues en fluorescence lors des différents dosages ont été enregistrées pour deux longueurs d'onde d'excitation correspondant aux longueurs d'onde maximales d'absorption des fluorophores : 280 nm pour le tryptophane et 344 nm pour le naphthalimide. Les cuves dans lesquelles les peptides sont seuls permettent d'évaluer la contribution de chaque fluorophore au signal résultant dans la cuve de compétition.

En soumettant les trois cuves à une excitation à 280 nm, longueur d'onde maximale d'absorption du tryptophane, les signaux de P²² et de NaphP²² sont observés en fluorescence (figures 142a et 142b). En résulte lors de la compétition une décroissance simultanée des émissions des deux fluorophores (figure 142c).

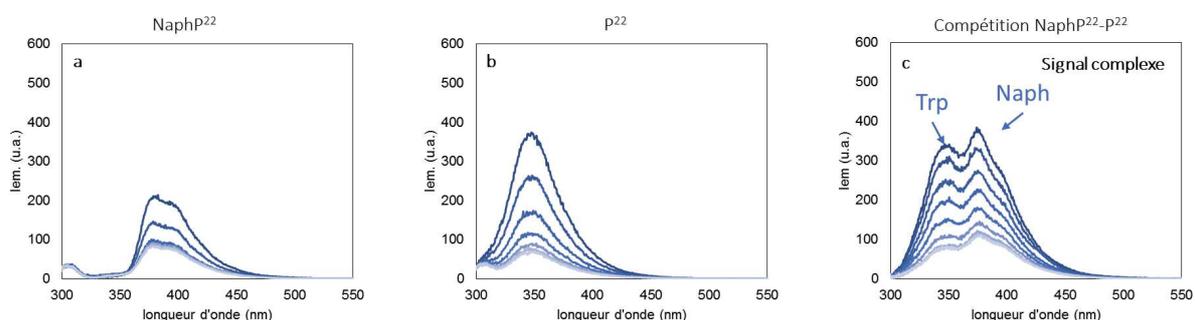


Figure 142 - Spectres de fluorescence de NaphP²² seul (a), P²² seul (b) et d'un mélange des deux ligands (c) lors d'un dosage par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Les signaux ont été enregistrés pour une excitation à 280 nm en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à pH 7,4 à 25°C.

En revanche, en soumettant les trois cuves à une longueur d'onde d'excitation de 344 nm, on s'affranchit du signal de fluorescence du tryptophane qui n'absorbe pas d'énergie à cette longueur d'onde (figure 143b). L'intensité de fluorescence maximale du mélange NaphP²² – P²² n'est donc liée qu'au naphthalimide et l'extinction de fluorescence est due à la seule formation d'un complexe uranyle-NaphP²² (figures 143c et 144).

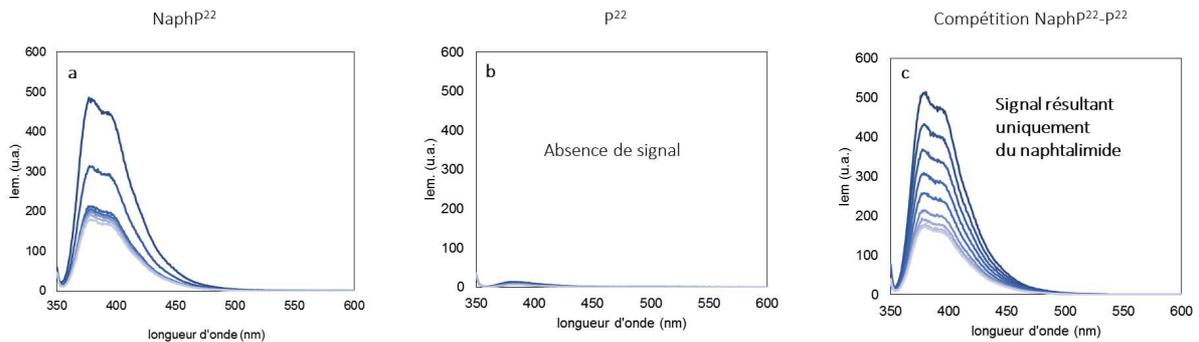


Figure 143 - Spectres de fluorescence de NaphP²² seul (a), P²² seul (b) et d'un mélange des deux ligands (c) lors d'un dosage par ajout de quantités croissantes d'uranyle. Les signaux ont été enregistrés pour une excitation à 344 nm en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à pH 7,4 à 25°C.



Figure 144 – Schéma illustrant la compétition NaphP²²-P²²

La comparaison des courbes d'extinction de fluorescence du naphthalimide pour les échantillons de NaphP²² seul et le mélange P²²-NaphP²² est présentée en figure 145. Pour l'échantillon de NaphP²² seul, la rupture de pente, très nette, est observée pour 1 équivalent d'uranyle ajouté en solution. Pour le mélange NaphP²² – P²², un décalage d'environ 1 équivalent de la rupture de pente est observé et indique la formation simultanée des complexes uranyle-P²² et uranyle-NaphP²² dont les stabilités apparentes à pH 7,0 sont égales (log K_{NaphP22} = log K_{P22} = 9,5).

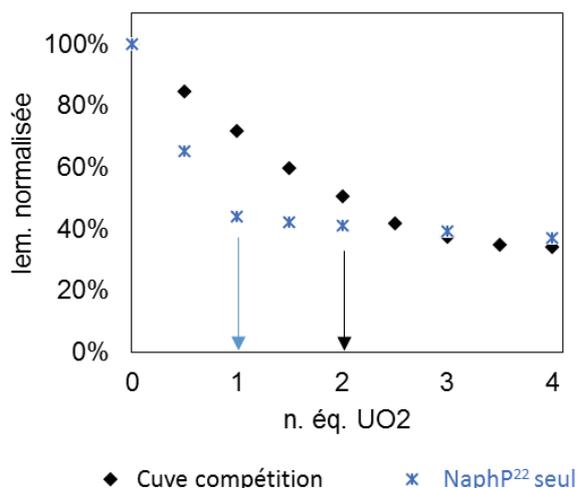


Figure 145 - Extinction de fluorescence du naphthalimide à 380 nm après excitation à 344 nm pour le dosage de NaphP²² (en bleu) et pour une compétition NaphP²²-P²² (en noir) à pH 7,4 en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à 25°C.

En cas de compétition *in situ* entre NaphP²² et une molécule porteuse d'un fluorophore naturel (Tyr, Trp), le signal du naphthalimide peut être sélectivement observé en fluorescence si la longueur d'onde d'excitation sélectionnée est de 344 nm. Le complexe uranyle-NaphP²² pourra être considéré seul responsable de l'extinction de fluorescence du naphthalimide, simplifiant de façon significative l'interprétation des spectres de fluorescence. Ces résultats permettent de valider NaphP²² comme sonde pour les compétitions, avec une constante apparente de 10^{9,5} à pH 7,0.

1.3.2 Compétition NaphP²²-EDTA

Une compétition a été réalisée à pH 7,0 entre le NaphP²² (log K_{NaphP22} = 9,5) et l'EDTA (log K_{EDTA} = 8,1) (figure 146). Aucun autre complexant de l'uranyle, de type IDA ou carbonate, n'est ajouté.

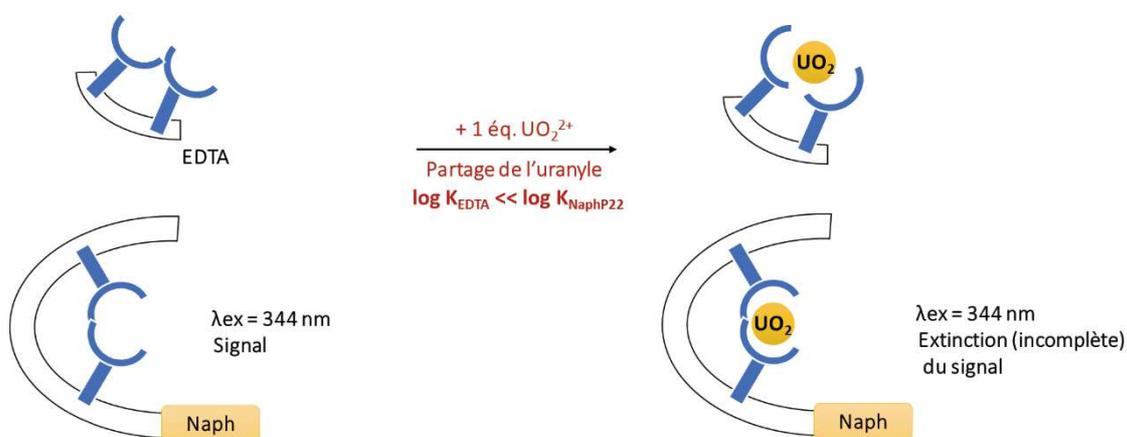


Figure 146 – Schéma illustrant la compétition NaphP²²-EDTA

Les données obtenues – spectres de fluorescence du naphthalimide et courbe d’extinction à 380 nm – sont présentées en figure 147.

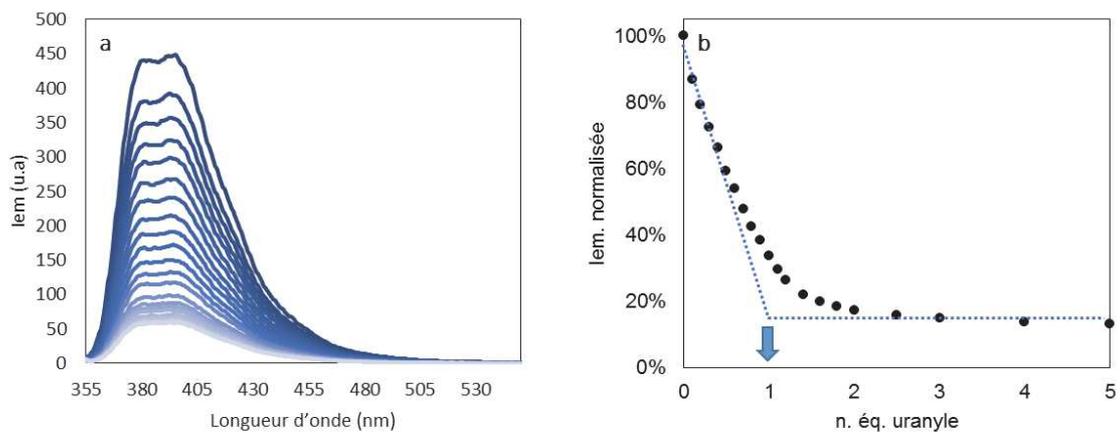


Figure 147 - Compétition NaphP²²- EDTA (2 μ M en chaque ligand en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM) à pH 7, à 25°C. a. Les spectres ont été enregistrés pour une excitation à 344 nm. b. Extinction de fluorescence à 380 nm.

La rupture de pente de la courbe d’extinction de fluorescence est observée pour 1 équivalent d’uranyle ajouté en solution. Les données ont été modélisées par Specfit (figure 148). Comme explicité précédemment, seul le complexe NaphP²²-uranyle est considéré responsable de l’extinction de fluorescence du naphthalimide, bien que la présence des deux complexes monométalliques NaphP²²-uranyle et EDTA-uranyle soit considérée lors de la modélisation. La constante apparente de l’EDTA a pu être recalculée en fixant la constante apparente de stabilité du complexe NaphP²²-uranyle à 9,5. La modélisation des données est satisfaisante. La constante d’affinité apparente de l’EDTA pour l’uranyle est évaluée à $10^{8,4 \pm 0,1}$ à pH 7,0. La valeur obtenue est en accord avec celle issue des données de la littérature ($\log K_{EDTA} = 8,1$ à pH 7, voir section 1.1.1).

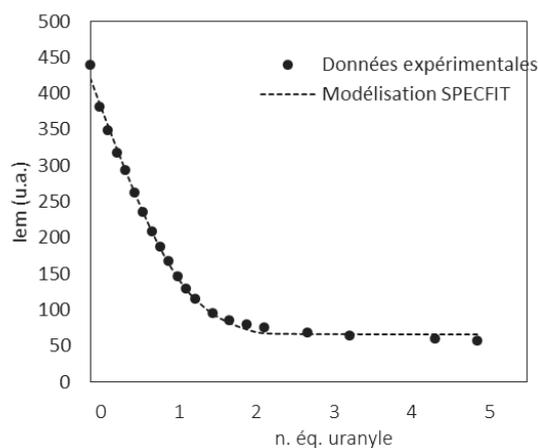


Figure 148 – Modélisation des données obtenues par fluorescence lors du dosage de NaphP²² et de l’EDTA par compétition à pH 7,0, en milieu HEPES 20mM, NaCl 100 mM, à 25°C.

Cette compétition confirme bien que l'affinité des sondes P^{22} et $NaphP^{22}$ est plus élevée que celle de l'EDTA et valide donc le design des hexapeptides non naturels pour la chélation de l'uranyle.

Un hexapeptide porteur de deux bras aminodiacétates $Ada_2 (P^{22})$ conçu à l'origine pour la complexation des lanthanides a une constante apparente pour l'uranyle évaluée à $10^{9,5}$ à pH 7,0 et est donc plus affin pour l'uranyle que l'EDTA ($\log K_1 = 8,1$). La présence du coude β entre les deux unités Ada_2 permet un meilleur espacement des fonctions chélatantes et favorise la formation d'un complexe stable, contrairement à l'EDTA dont le motif éthylènediamine séparant les deux unités chélatantes apporte des contraintes stériques pour la coordination de l'uranyle dans son plan équatorial.

Des sondes dérivées de P^{22} porteuses de fluorophores non naturels, initialement conçues pour la reconnaissance de l'ADN, ont montré que le naphthalimide est sensible à la formation du complexe uranyle- $NaphP^{22}$, ce qui se traduit par une extinction de fluorescence suffisamment marquée pour être interprétée et modélisée. La sonde $NaphP^{22}$ a été testée lors d'une compétition $NaphP^{22}$ - P^{22} . Elle présente des caractéristiques compatibles avec la mise en œuvre de compétitions entre ligands à pH 7 : le photoblanchiment est faible et l'intensité de fluorescence du naphthalimide n'est pas perturbée par la présence de fluorophores naturels portés par d'autres molécules.

L'utilisation de $NaphP^{22}$ comme sonde ($\log K_1 = 9,5$) lors de compétitions permettra d'interpréter simplement les résultats de fluorescence afin d'évaluer les constantes apparentes de compétiteurs en milieu aqueux à pH 7 dans une gamme d'affinité raisonnable ($10^{6,5}$ à $10^{12,5}$), cette gamme correspondant à la gamme d'intérêt des protéines cibles de l'uranyle.

2 Cyclodécapeptides non naturels

La sonde NaphP²² que nous avons validée possède une constante apparente à pH 7 qui est dépendante du pH, deux des pKa de la molécule étant élevés ($pK_{a1} = 8,2$ et $pK_{a2} = 8,8$). Un peptide cyclique monophosphorylé possède une affinité d'environ $10^{9,8}$, non dépendante du pH à partir de pH 7. L'utilisation de cyclodécapeptides monophosphorylés est envisagée afin d'évaluer les constantes apparentes d'un ligand à plusieurs pH.

Le naphthalimide a donc été introduit à la place du tryptophane dans un cyclodécapeptide polyglutamate afin de valider la sonde proposée avant de transposer la synthèse à un peptide monophosphorylé (figure 149). Le protocole de synthèse et les caractérisations des produits sont détaillés en partie expérimentale pour l'ensemble des synthèses décrites dans cette section.

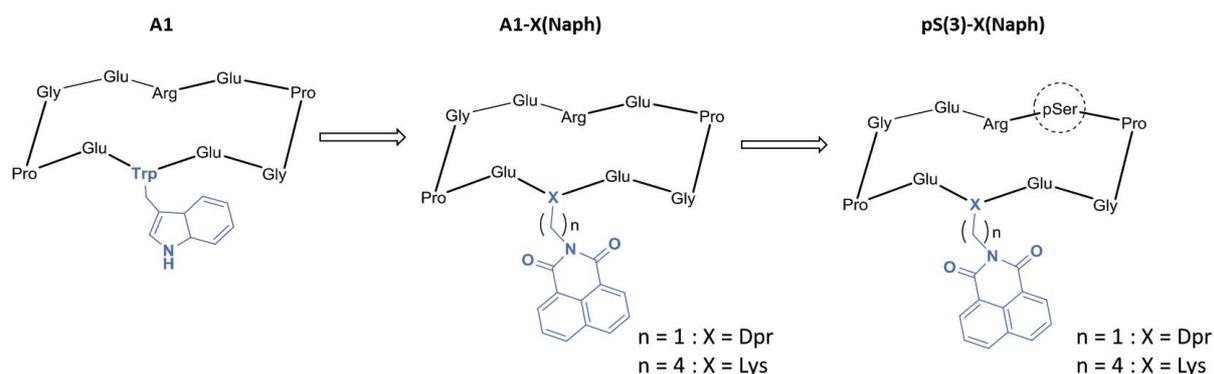


Figure 149 - Stratégie de conception de peptides cycliques non naturels

2.1 Synthèse de cyclodécapeptides polyglutamates porteurs du Naph

2.1.1 Acides aminés modifiés Fmoc-X(Naph)-OH

Deux acides aminés ont été fonctionnalisés par le naphthalimide, à savoir la lysine, acide aminé naturel porteur d'une chaîne latérale longue ($n = 4$), et l'acide 2,3-aminodipropionique, acide aminé non naturel porteur d'une chaîne latérale courte ($n = 1$) (figure 150).

Les acides aminés modifiés ont ensuite été introduits dans un décapeptide cyclique polyglutamate pour évaluer l'influence de la longueur de la chaîne ($n = 1$ ou 4) sur le phénomène d'extinction de fluorescence lors de la complexation, c'est-à-dire d'évaluer l'impact de la distance entre le naphthalimide et le site de liaison du métal.

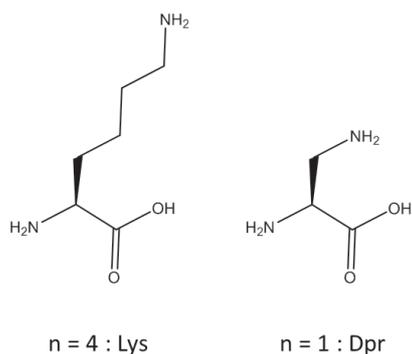


Figure 150 – (L)-lysine et acide (L)-2,3-diaminopropionique

Fmoc-Lys(Naph)-OH

Dans un premier temps le naphthalimide a été greffé sur la chaîne latérale d'une lysine ($n = 4$). La synthèse de la Lysine fonctionnalisée par le naphthalimide a été réalisée selon la voie de synthèse présentée ci-après (figure 151).

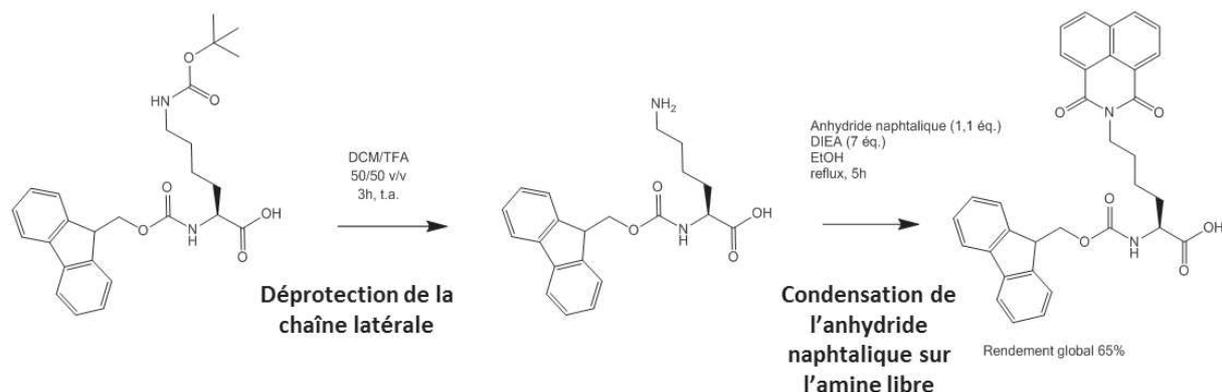


Figure 151 - Voie de synthèse de la *N-α-Fmoc-Lys(Naph)-OH*

L'acide aminé commercial *N-α-Fmoc-Lys(Boc)-OH* a été déprotégé de la fonction *tert*-butoxycarbonyl (Boc) sur la chaîne latérale par un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). L'anhydride naphthalique est ensuite introduit en léger excès et condensé sur la fonction amine de la chaîne latérale déprotégée de la lysine. Le produit final a pu être isolé avec 65% de rendement, après purification par HPLC préparative sur phase inverse.

Fmoc-Dpr(Naph)-OH

Dans un second temps, nous avons raccourci la chaîne alkyle du résidu porteur du naphthalimide en partant de l'acide 2,3-diaminopropionique (figure 150).

La synthèse de *N-α-Fmoc-Dpr(Naph)-OH* a été réalisée à partir de l'acide aminé commercialisé *N-α-Fmoc-Dpr(Boc)-OH*. La stratégie de synthèse a été adaptée du protocole de synthèse de l'acide aminé modifié *Fmoc-Lys(Naph)-OH* présenté ci-avant.

Le produit final a pu être isolé avec 24% de rendement, après purification sur colonne de gel de silice. Le faible rendement obtenu s'explique par des difficultés à purifier le composé, ce dernier étant peu soluble dans le dichlorométhane.

2.1.2 Synthèse des peptides A1-X(Naph)

Les peptides A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) sont présentés en figure 152.

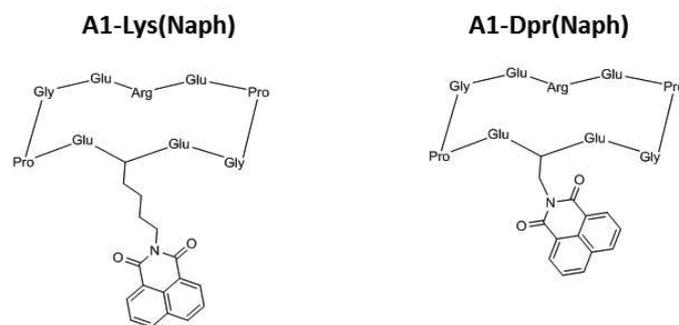


Figure 152 - Peptides polyglutamates porteurs de sondes non naturelles

Le protocole de synthèse de ces peptides a été adapté du protocole de synthèse du peptide polyglutamate A1 développé au laboratoire (figure 153).¹⁵¹

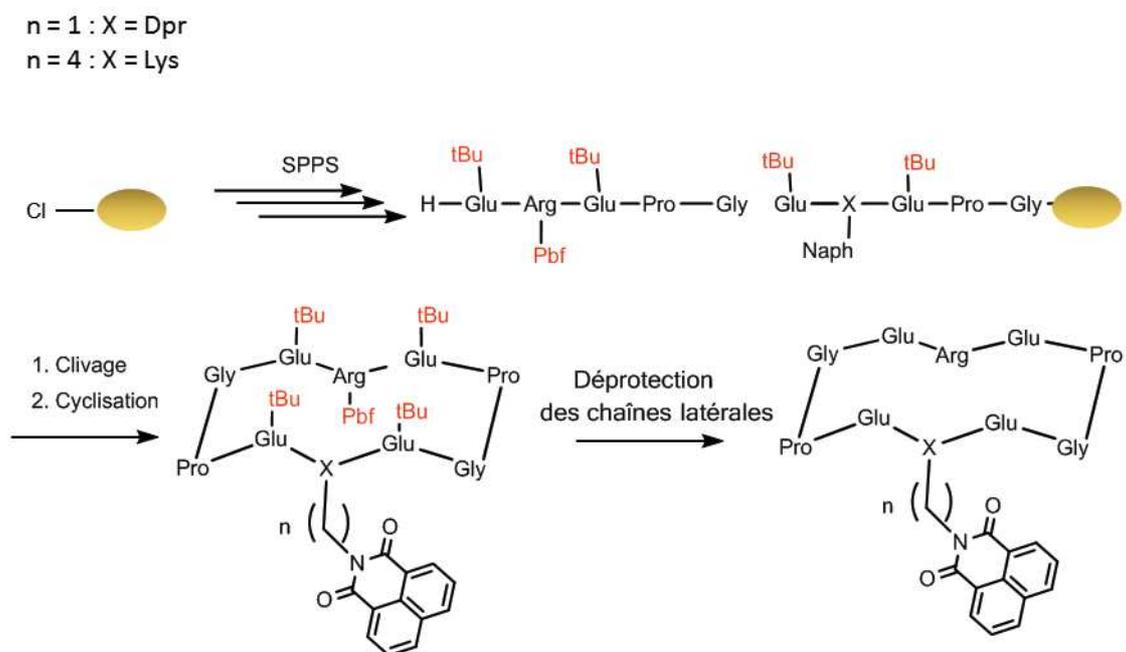


Figure 153 - Voie de synthèse du peptide A1-Lys(Naph). Protocole adapté de la synthèse de A1. Source : Lebrun et al.¹⁵¹

L'acide aminé modifié *N*- α -Fmoc-X(Naph)-OH a été manuellement introduit au cours de la SPPS à la place du tryptophane, ce qui a mené au précurseur linéaire du cyclodécapeptide final. Le précurseur est clivé de la résine, cyclisé par réaction de couplage peptidique entre les fonctions N-ter et C-ter, purifié puis déprotégé en milieu acide (TFA).

Le composé A1-Lys(Naph) a été obtenu avec un rendement global de 34% et une pureté de 98%, après purification sur phase inverse par HPLC préparative.

Le composé A1-Dpr(Naph) a été obtenu avec un rendement global de 7% et une pureté de 95%, après purification sur phase inverse par HPLC préparative. Ce rendement n'est pas représentatif, la charge initiale de la résine étant trop élevée pour cette synthèse.

2.2 Interaction avec l'uranyle

Les deux peptides synthétisés présentent les mêmes propriétés complexantes que le peptide A1 dont l'affinité pour l'uranyle est évaluée à $\log K_1 = 8,2$ à pH 6,0 (voir chapitre III). Les peptides ont été titrés par ajout de quantités croissantes d'uranyle, en présence de 10 équivalents d'IDA, à pH 6,0. Les spectres obtenus sont présentés en figures 154a et 154c, et les courbes de fluorescence à 380 nm sont reportées en figures 154b et 154d. De même que décrit en section 1.2.3 pour les sondes NaphP²² et PflP²², une solution de référence contenant le peptide A1-X(Naph) dans laquelle aucun ajout d'uranyle n'est effectué est également analysée à intervalles réguliers afin de contrôler la stabilité de chaque sonde en l'absence d'inhibiteur de fluorescence. La fluorescence des références de A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) sont présentées en figures 154b et 154d respectivement.

Les extinctions de fluorescence obtenues pour les solutions de référence des peptides A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) (sans uranyle, croix bleues) indiquent qu'un phénomène de photoblanchiment a lieu dans les deux cas. Près de 50% de la fluorescence initiale du naphthalimide est perdue lors de cycles successifs d'excitation-relaxation. L'extinction de fluorescence du naphthalimide obtenue lors des dosages des deux sondes (cercles noirs, figures 154b et 154d) ne peuvent donc être imputées à la formation de complexes A1-X(Naph)-uranyle.

En raison de phénomènes de photoblanchiment non négligeables, les deux sondes A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) ne présentent pas les propriétés requises pour une compétition *in situ*. La longueur de chaîne de l'acide aminé porteur du fluorophore n'est pas en cause dans la stabilité de la sonde.

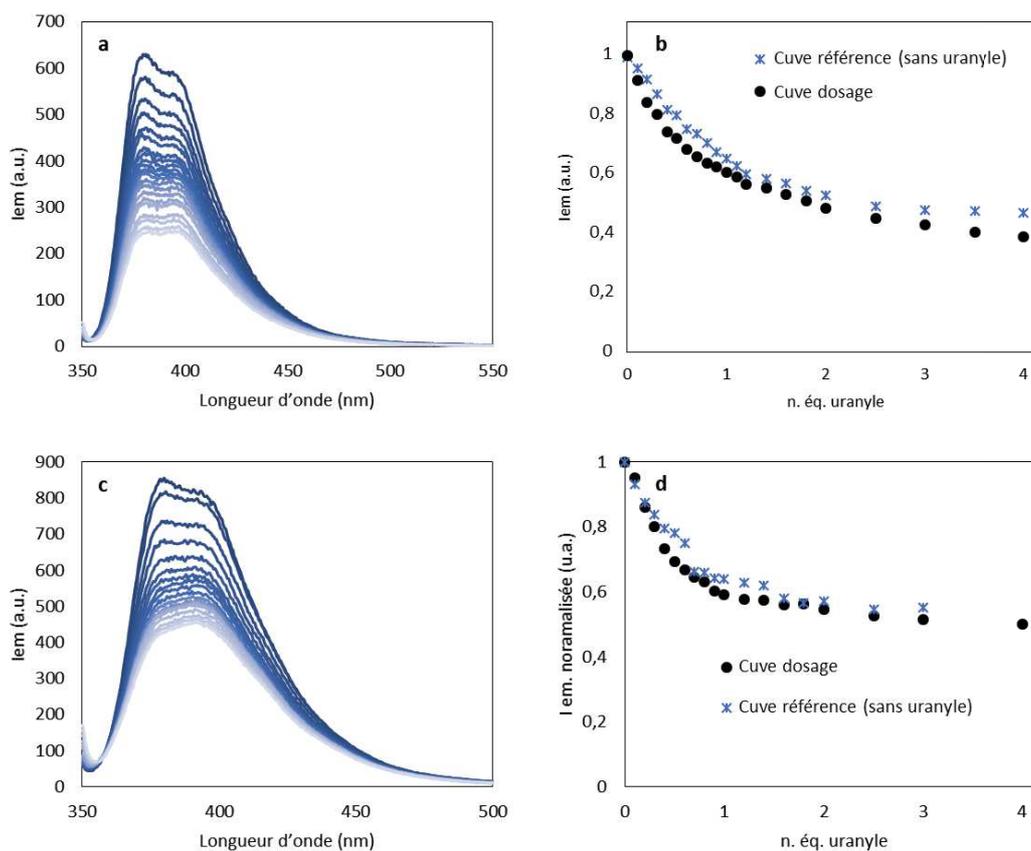


Figure 154 - Dosage des peptides A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) (5 μ M en milieu MES 20 mM, NaCl 100 mM) par ajout de doses croissantes d'uranyle, à pH 6, à 25°C, en présence de 10 équivalents d'IDA. a. et c. Spectres de fluorescence ($\lambda_{ex} = 344$ nm). b. et d. Extinction de fluorescence à 350 nm pour la cuve de dosage et pour la cuve de référence (sans uranyle).

2.3 Perspectives en synthèse

2.3.1 Environnement électronique du Naph

Dans le peptide NaphP²², le noyau aromatique est lié à la chaîne peptidique *via* une liaison $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$ (figure 155). Il est possible que l'effet inductif donneur de la chaîne alkyle de la lysine ou de l'acide 2,3-diaminopropionique soit responsable de l'instabilité photochimique des deux sondes précédemment développées.

La synthèse du composé N- α -Fmoc-Dpr(Gly-Naph) est donc proposée (figure 156). La glycine intermédiaire permet d'introduire le même espaceur que dans l'hexapeptide NaphP²².

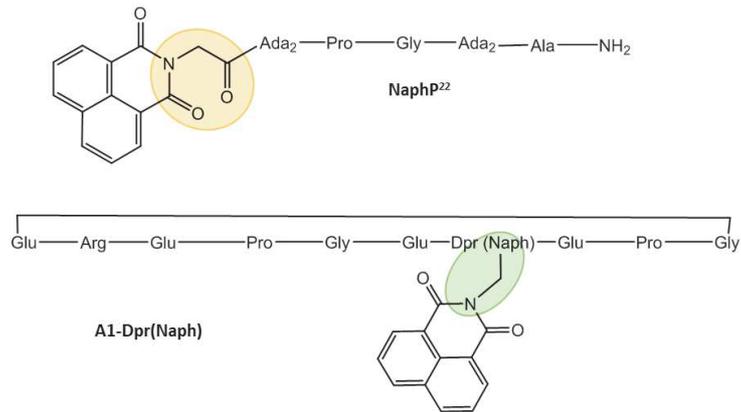


Figure 155 – Différence d'environnement électronique au sein des peptides NaphP²² et A1-Dpr(Naph)

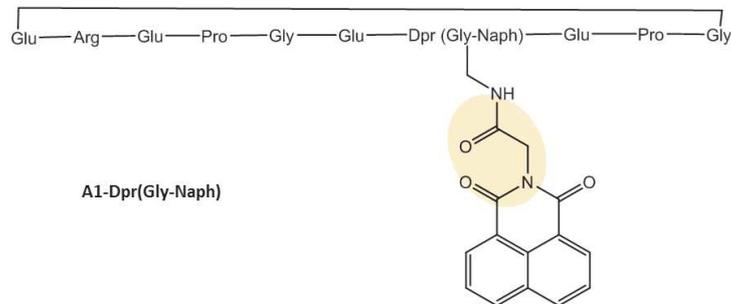


Figure 156 - Peptide A1-Dpr(Gly-Naph)-OH

Un protocole de synthèse convergente en cinq étapes est proposé en figure 157. La synthèse est encore en cours aujourd'hui.

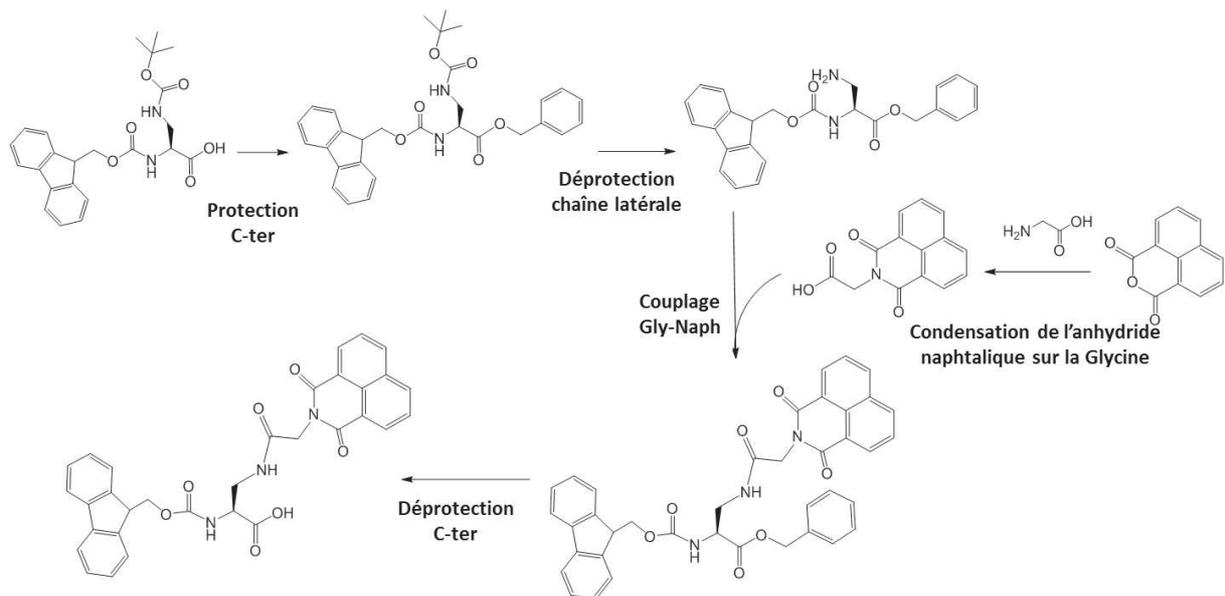


Figure 157 - Voie de synthèse proposée pour le résidu N- α -Fmoc-Dpr(Gly-Naph)-OH

2.3.2 Nature du fluorophore

Une autre possibilité serait de greffer un autre fluorophore comme, par exemple, le dansyle, noyau aromatique connu en biologie pour le marquage de protéine (figure 158).

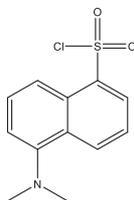


Figure 158 - Chlorure de dansyle

Des peptides mimes de la boucle de calmoduline conçus pour complexer l'uranium dans diverses applications ont été brevetés par Vita, Le Clainche et Monjardet.¹⁸¹ Ces mêmes auteurs proposent la labélisation de ces peptides par un fluorophore (coumarine, dansyle,...) pour identifier la formation de complexe(s) uranyle-peptide. Les propriétés d'absorption et d'émission du dansyle sont compatibles avec la mise au point de compétitions avec des molécules porteuses d'acides aminés fluorophores naturels (figure 159).

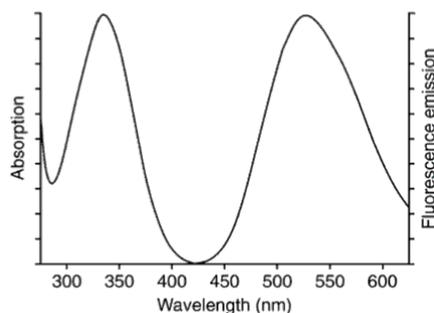


Figure 159 - Spectres d'absorption et d'émission du dansyle, à pH7,0 en milieu aqueux, à 25°C. Source : Jena Bioscience ; accessible depuis <https://www.jenabioscience.com/images/PDF/CLK-FA016.pdf>

La lysine substituée par un dansyle à l'extrémité de la chaîne latérale est disponible commercialement (figure 160). Par ailleurs, il est possible de faire réagir le chlorure de dansyle sur une amine déprotégée (chaîne latérale d'un acide 2,3-aminodipropionique par exemple). La synthèse de la sonde A1-Dpr(Dansyle)-OH pourrait être envisagée pour valider cette approche.

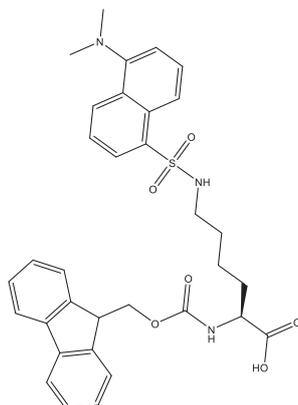


Figure 160 - N- α -Fmoc-Lys(Dansyle)

Suite aux résultats obtenus avec NaphP²², des cyclodécapeptides ont été synthétisés dans le but d'introduire le naphthalimide dans une structure dont la constante apparente pour l'uranyle est indépendante du pH au-delà de pH 7. Une lysine et un acide 2,3-aminopropionique fonctionnalisés par le naphthalimide ont été introduits par SPPS dans des structures cyclodécapeptidiques polyglutamates. Les acides aminés modifiés Fmoc-Lys(Naph)-OH et Fmoc-Dpr(Naph)-OH ont été obtenus respectivement avec 65% et 24% de rendement. Les deux peptides A1-Lys(Naph) et A1-Dpr(Naph) ont été respectivement obtenus avec 34 % et 7 % de rendement. Les mesures de fluorescence indiquent un fort photoblanchiment pour ces deux sondes empêchant toute interprétation des courbes d'extinction de fluorescence en présence d'uranyle. De nouveaux acides aminés modifiés pourront être développés, en introduisant une glycine entre la chaîne latérale de l'acide aminé et le naphthalimide de façon à modifier l'environnement électronique du fluorophore, ou bien en introduisant d'autres fluorophores comme le dansyle.

3 Le NaphP²² comme sonde référente pour compétitions *in situ*

Le peptide NaphP²² est comme nous l'avons montré en section 1 un excellent candidat pour mesurer des constantes d'affinité comprises entre $10^{6,5}$ et $10^{12,5}$. Cette sonde a donc été employée pour développer et valider le concept de compétition *in situ* que nous proposons. Dans un premier temps, NaphP²² a été utilisé pour évaluer précisément les constantes apparentes de stabilité des complexes formés avec pS(168) et pS(1368).

3.1 Evaluation de constantes de stabilité par modélisation : peptides à 3 et 4 pS

Comme nous l'avons vu au chapitre III, l'évaluation des constantes apparentes de stabilité des différents complexes ML, M₂L et ML₂ formés avec les cyclodécapeptides pS(168) et pS(1368) est difficile à partir des données obtenues par fluorescence. La spéciation en solution n'étant pas simple, l'interprétation des spectres est délicate. Nous avons mis à profit la sonde NaphP²² pour évaluer les constantes apparentes des trois complexes formés avec pS(168) ou pS(1368) à pH 7,0.

Compétitions

Des compétitions sont réalisées *in situ* entre le peptide phosphorylé et NaphP²². Des quantités croissantes d'uranyle sont ajoutées et le dosage est suivi par fluorescence à 380 nm après avoir excité l'échantillon à 350 nm. Les spectres obtenus et les courbes d'extinction de fluorescence sont présentés en figure 161.

Pour les compétitions NaphP²²-pS(168) et NaphP²²-pS(1368), les courbes d'extinction de fluorescence obtenues sont des sigmoïdes. Le palier en début de dosage est cohérent avec la différence de constante existant entre un cyclodécapeptide à 3 ou 4 phosphosérines ($\log K_1 > 10,5$) et le NaphP²² ($\log K_1 = 9,5$) et témoigne de l'absence de complexe NaphP²²-uranyle en début de dosage, en faveur de la formation de complexe(s) pS(168)-uranyle ou pS(1368)-uranyle.

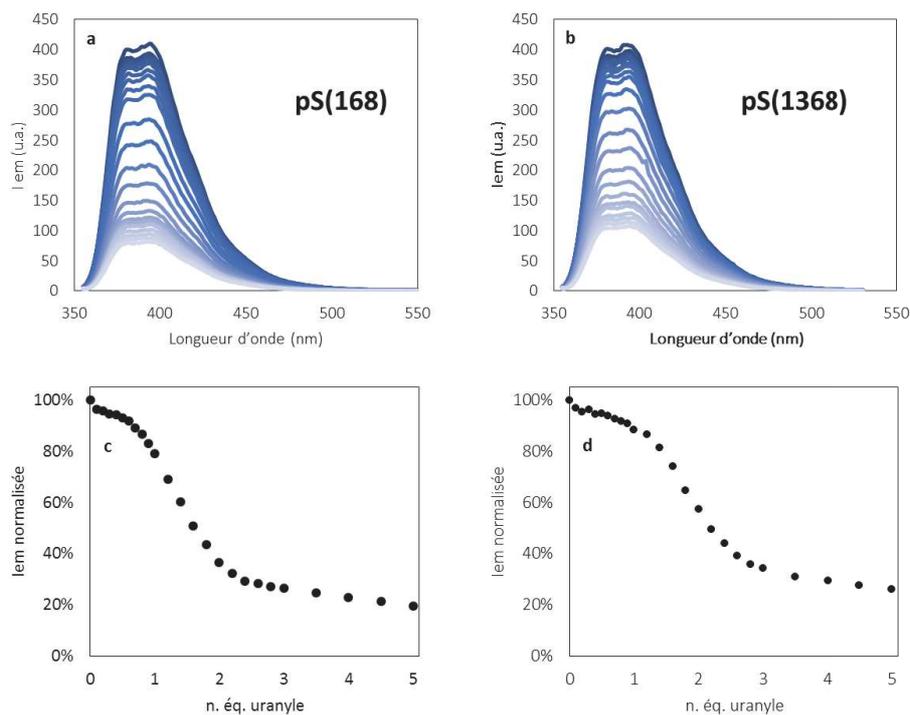


Figure 161- Compétitions pS(168)-NaphP²² et pS(1368)-NaphP²² à pH 7 (milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM), par ajout de doses croissantes d'uranyle ([peptide] = 2 μM chaque). a. et b. Spectres obtenus à 25 °C (λ_{ex} = 344 nm). c et d. Extinction de fluorescence du naphthalimide pour pS(168) et pS(1368) respectivement.

Modélisations par Specfit

Les courbes obtenues ont été modélisées pour des ajouts d'uranyle inférieurs à trois équivalents pour éviter les contributions dues à l'hydrolyse du métal (figure 162). Dans les deux cas, 4 complexes ont été considérés à savoir le complexe NaphP²²-uranyle, émetteur de fluorescence et seul responsable de l'extinction de fluorescence du naphthalimide et les trois complexes cyclodécapeptide-uranyle ML, ML₂ et M₂L identifiés précédemment (chapitre III). La constante apparente de complexation du complexe NaphP²²-uranyle est fixée à 9,5. Les constantes de complexation obtenues sont présentées dans le tableau 18.

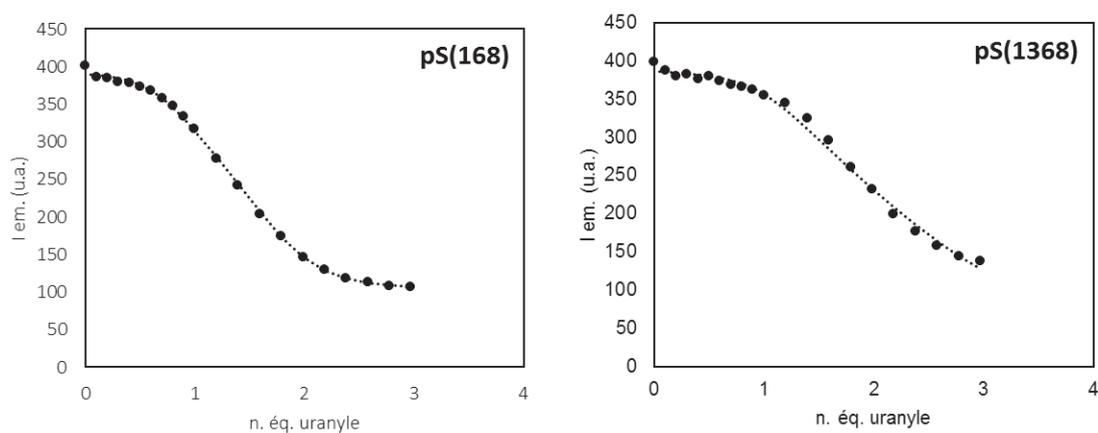


Figure 162 - Modélisation des données de fluorescence pour des compétitions NaphP²² – pS(168) et NaphP²² – pS(1368).

Tableau 18- Evaluation des constantes apparentes de stabilité de pS(168) et pS(1368) par modélisation des données obtenues en fluorescence en compétition avec NaphP²² à pH 7 en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à 25°C.

peptide	stœchiométrie	comportement en fluorescence	log β_{mlo}	log K_i
pS(168)	ML	Non émetteur	10,7 (1)	10,7 (1)
	ML ₂	Non émetteur	16,8 (2)	6,1 (2)
	M ₂ L	Non émetteur	18,7 (1)	8,0 (1)
pS(1368)	ML	Non émetteur	11,1 (3)	11,1 (3)
	ML ₂	Non émetteur	14 (3)	5 (2)
	M ₂ L	Non émetteur	20,4 (3)	9,2 (3)

Les modélisations sont satisfaisantes. Les valeurs obtenues pour les constantes apparentes de stabilité des complexes ML sont légèrement supérieures à celles qui ont été évaluées par fluorescence, au chapitre III. Contrairement aux valeurs obtenues au chapitre III les constantes sont ici évaluées avec une interprétation simple et fiable des spectres de fluorescence.

Série des cyclodécapeptides phosphorylés

L'ensemble des constantes d'affinité évaluées à pH 7 pour les peptides cycliques phosphorylés sont comparées dans le tableau 19.

Tableau 19 - Evaluation des constantes apparentes de stabilité des peptides phosphorylés par modélisation des données obtenues en fluorescence à pH 7 en milieu HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à 25°C.

peptide	stœchiométrie	log K	
pS(1)	ML	9,1 (1)	Fluorescence du peptide
pS(16)	ML	10,1 (1)	
	M ₂ L	9,3 (2)	
pS(168)	ML	10,7 (1)	Fluorescence de la sonde NaphP ²²
	ML ₂	6,1 (2)	
	M ₂ L	8,0 (1)	
pS(1368)	ML	11,1 (3)	
	ML ₂	4 à 6	
	M ₂ L	9,2 (3)	

L'introduction de quatre phosphosérines permet d'atteindre progressivement une constante apparente proche de celle de la protéine (log $K_{1\text{ pS}(1368)}$ = 11,1 et log $K_{1\text{ OPN}}$ = 11,5). Ces résultats valident l'hypothèse selon laquelle l'uranyle est environné de plusieurs résidus phosphorylés dans l'OPN (minimum 3), au niveau du site de haute affinité tout du moins.

3.2 Construction d'une échelle d'affinité

3.2.1 Sélection des molécules

L'objectif principal de cet axe d'étude est de valider le concept de compétition *in situ* avec une sonde non naturelle, le NaphP²² permettant d'évaluer la constante apparente d'une cible protéique de l'uranyle sur une gamme allant de 10^{6,5} à 10^{12,5} (voir section 1), quelle que soit la structure, la taille ou les propriétés de fluorescence de cette protéine. Pour valider le concept il est nécessaire de conforter la méthode grâce à un pool de molécules modèles (molécules chimiques, peptides ou protéines) dont les constantes de complexations ont été évaluées à l'aide de techniques robustes et sont distribuées sur une échelle d'affinité intéressante, en accord avec ce que nous avons défini ci-avant.

La série de cyclodécapeptides avec un nombre de phosphosérines allant de 0 à 4 a été sélectionnée, l'ajout progressif de phosphosérines permettant d'augmenter l'affinité des composés pour le métal de log K₁ = 8,2 à log K₁ = 11,1. Les peptides sélectionnés (ou compétiteurs) sont les cyclodécapeptides suivants : polyglutamate A1, monophosphorylé pS(3), diphosphorylés pS(16) et pS(18), triphosphorylé pS(168) et enfin tetraphosphorylé pS(1368). Une molécule chimique, l'EDTA (log K₁ = 8,1) et une protéine, la FETUA (log K₁ = 11,4) ont également été sélectionnées.

3.2.2 Compétitions à pH 7

Les molécules et peptides sélectionnés ont été dosés en compétition avec la sonde NaphP²² à pH 7, en présence d'un équivalent d'uranyle par rapport à la sonde.

Dans ces conditions, la quantité de ligands (sonde et compétiteur) est en excès et permet de s'affranchir des phénomènes d'hydrolyse de l'uranyle. Une forte extinction de fluorescence du naphthalimide témoigne de la formation du complexe NaphP²²-uranyle et donc de la faible affinité du compétiteur. A l'inverse, une faible extinction de fluorescence du naphthalimide indique la formation du complexe compétiteur-uranyle et une forte affinité du compétiteur pour l'uranyle.

Le pourcentage d'extinction de fluorescence du naphthalimide est défini par l'équation (17).

$$(17) \quad \% \text{ d'extinction du Naph à 1 } \acute{e}q. = 1 - \frac{I_1 \acute{e}q.}{I_0}$$

La figure 163 présente les résultats obtenus pour le groupe de molécules sélectionnées.

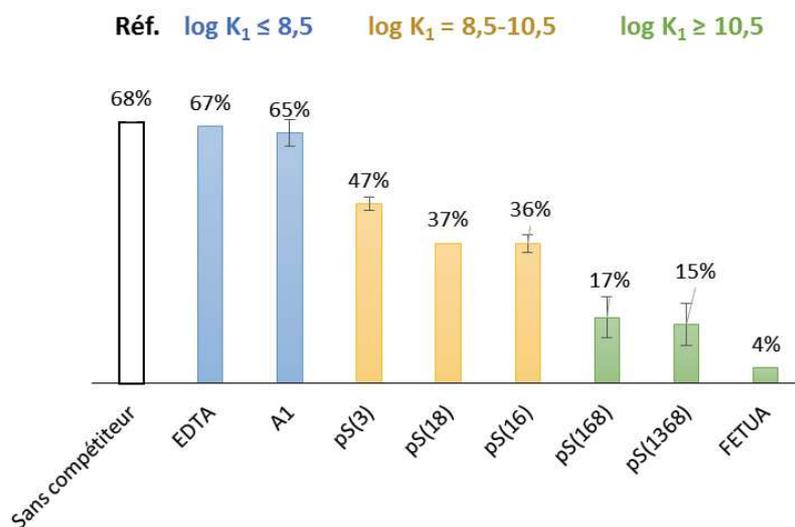


Figure 163 – Pourcentage d’extinction de fluorescence du naphthalimide pour 1 équivalent d’uranyle ajouté en solution, des compétitions peptide-NaphP²², EDTA-NaphP²² ou FETUA-NaphP²² ou en l’absence de compétiteur (référence). [NaphP²²] = [compétiteur] = 2 μM, en tampon HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, à pH 7,0 et à 25°C. Les barres d’erreurs correspondent à l’écart-type obtenu pour deux mesures effectuées sur deux cuves différentes.

Trois catégories de compétiteurs sont identifiées :

- (i) En bleu, apparaissent les compétiteurs dont la constante est inférieure à celle de la sonde d’au moins un ordre de grandeur ($\log K_1 \leq 8,5$). Ils ne modifient pas l’extinction de fluorescence du naphthalimide par rapport à la solution de référence. Pour un équivalent d’uranyle ajouté en solution, le métal est principalement complexé par la sonde. La formation du complexe NaphP²²-uranyle est donc prépondérante.
- (ii) En jaune apparaissent les compétiteurs qui impactent l’extinction de fluorescence du naphthalimide de façon significative mais modérée. Ils correspondent aux ligands dont la constante K_1 est comprise entre $10^{8,5}$ et $10^{10,5}$ environ. Pour un équivalent d’uranyle ajouté en solution, le métal se partage entre compétiteur et sonde NaphP²².
- (iii) En vert apparaissent les compétiteurs dont la constante apparente est supérieure celle de NaphP²² d’au moins 1 ordre de grandeur ($\log K_1 \geq 10,5$). La formation du complexe sonde-uranyle est retardée en faveur de la formation du complexe compétiteur-uranyle.

3.2.3 Modèle d’évaluation de constantes apparentes

L’extinction de fluorescence de la sonde est proportionnelle à la constante apparente de complexation uranyle-compétiteur à pH 7 (unité log), selon la régression linéaire $\log K_1 = f(1-(I/I_0))$ avec I l’intensité du naphthalimide en présence d’un équivalent d’uranyle, I_0 l’intensité du naphthalimide en l’absence de métal et K_1 la constante apparente d’affinité du compétiteur à pH 7,0 (figure 164).

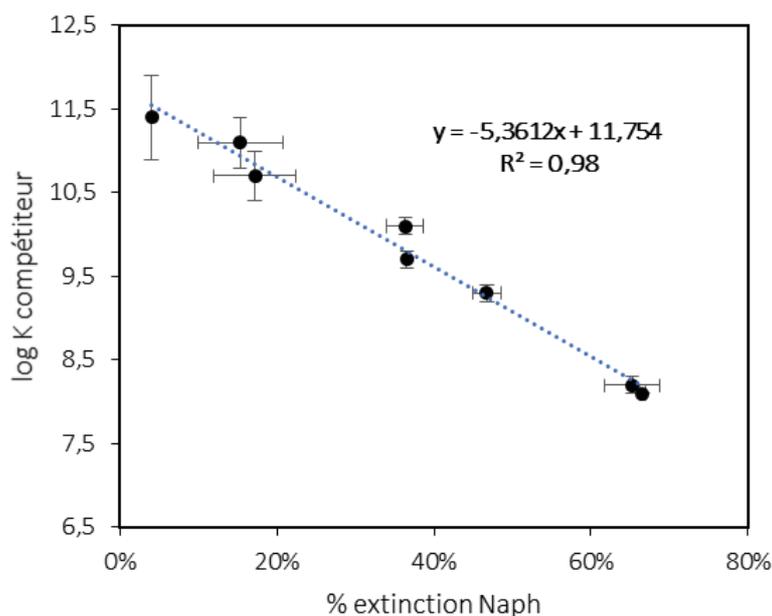


Figure 164 – Modèle de détermination de constantes apparentes à pH 7,0 par régression linéaire $\log K_1 = f(1-(I/I_0))$

La régression linéaire est tout à fait acceptable. L'extinction de fluorescence du naphthalimide peut être quantifiée entre 0% et 66% (extinction maximale observée en présence d'un compétiteur de faible affinité ou en l'absence de compétiteur) et permet donc l'évaluation de constantes d'affinité dans une gamme allant de $10^{8,5}$ à 10^{12} environ, comprise dans la gamme admise en section 1 ($10^{6,5}$ à $10^{12,5}$). Ce modèle n'est pas strictement quantitatif et d'autres techniques devront être employées notamment pour déterminer la stœchiométrie des complexes formés avec le compétiteur. La méthode est toutefois simple à mettre en œuvre et peu consommatrice d'échantillon. Elle est réalisée en solution, en phase homogène et à l'équilibre, et constitue une évaluation fiable de la constante apparente K_1 du compétiteur mis en présence du NaphP²², permettant une comparaison entre cibles de l'uranyle.

La mise en application des compétitions NaphP²²-compétiteur a permis de mettre au point une méthode de détermination de constantes apparentes de complexation à partir d'un pool de compétiteurs dont les constantes apparentes sont connues.

La méthode développée se base sur le signal de fluorescence du naphthalimide obtenu après ajout d'un seul équivalent d'uranyle dans une solution contenant la sonde et le compétiteur en quantités équivalentes. Une relation linéaire est établie entre la constante apparente du compétiteur et le pourcentage d'extinction du naphthalimide. Cette méthode est applicable pour des ligands dont la constante apparente de complexation est comprise entre $10^{8,5}$ et environ 10^{12} . Elle n'est pas strictement quantitative mais donne un résultat fiable permettant de positionner les cibles de l'uranyle les unes par rapport aux autres. Elle est par ailleurs applicable à des molécules de tailles et structures variées, avec ou sans fluorophore naturel, et consomme peu d'échantillon.

La compétition avec une sonde dont on maîtrise la spéciation représente un atout pour les cas où la fluorescence d'une molécule ne permet pas d'évaluer fiablement son affinité pour l'uranyle. La sonde NaphP²² a été utilisée pour évaluer les constantes apparentes des peptides pS(168) et pS(1368) pour lesquels les résultats en fluorescence étaient difficiles à interpréter.

4 Conclusion

Le troisième et dernier axe de ce projet porte sur le développement d'une méthode de compétition à l'équilibre suivie par fluorescence dans le but de pouvoir comparer et classer différents ligands de l'uranyle *via* la détermination d'une constante apparente d'affinité. Dans le but de réaliser ces compétitions, nous avons sélectionné la sonde NaphP²², un hexapeptide porteur de deux unités aminodiacétates tridentes conçu au laboratoire dans le cadre du développement de sondes de reconnaissance de l'ADN par des complexes peptides-lanthanides. NaphP²², mime flexible de l'EDTA, présente une structure en coude s'adaptant à la géométrie de coordination de l'uranyle ce qui se traduit par une affinité apparente du peptide pour le métal supérieure à celle de l'EDTA à pH 7. Le naphthalimide, fluorophore non naturel introduit dans la sonde permet de s'affranchir du signal de fluorophores naturels grâce à une excitation sélective. L'obtention d'un signal sélectif en fluorescence permet une interprétation simple et fiable des phénomènes d'extinction.

La sonde NaphP²² permet de procéder à diverses expériences de compétitions *in situ* à pH 7, avec des molécules dont les structures, les tailles et les propriétés de fluorescence sont variées et dont les constantes apparentes pour l'uranyle sont connues : cyclodécapeptides, EDTA et FETUA. Une méthode d'évaluation de constantes apparentes est proposée à partir de ces compétiteurs, se basant sur une régression linéaire qui est fonction du pourcentage d'extinction de la sonde NaphP²² à 1 équivalent d'uranyle en présence de compétiteur.

La gamme de constantes apparentes évaluables à pH 7 est comprise entre $10^{8,5}$ à 10^{12} environ ce qui est adapté à la gamme de constantes apparentes des cibles protéiques identifiées de l'uranyle. Il est possible de réaliser des mesures sur une gamme de pH plus étendue en concevant de nouvelles sondes dont l'affinité ne varie plus à partir de pH 7, propriété que l'on retrouve par exemple avec les cyclodécapeptides monophosphorylés. Nous avons donc réalisé la synthèse de plusieurs sondes cyclodécapeptidiques polyglutamates porteuses de naphthalimide avec pour objectif de transposer ces synthèses aux candidats monophosphorylés. Les sondes proposées se sont cependant avérées photochimiquement instables, ne permettant pas de suivre la formation du complexe sonde-uranyle. Nous proposons quelques pistes d'amélioration qui permettraient d'atteindre ces objectifs par la suite : modification de l'environnement électronique du naphthalimide ou introduction d'un autre fluorophore.

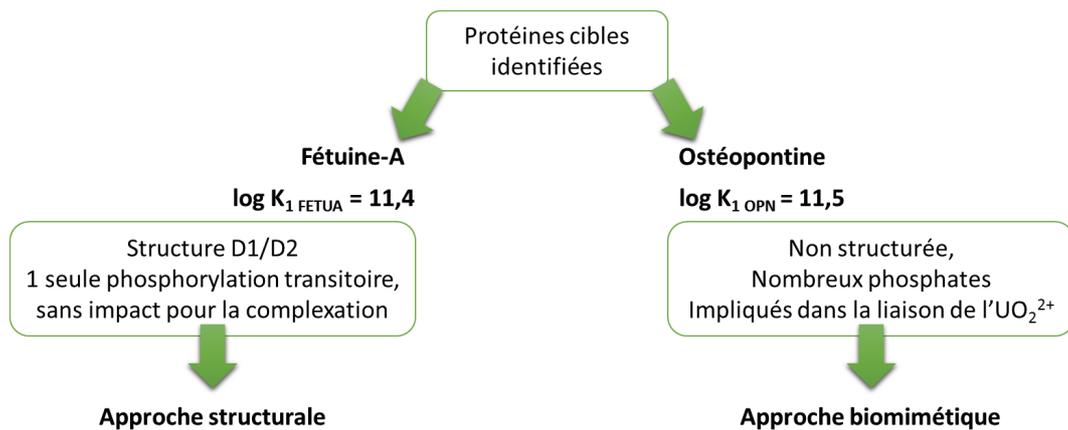
La méthode de compétition a également permis d'évaluer les constantes apparentes de stabilité des complexes ML, ML₂ et M₂L uranyle-pS(168) et uranyle-pS(1368) avec fiabilité, ce que ne permettait pas

la fluorescence des peptides. Les valeurs de constantes obtenues confirment que l'ajout de la troisième puis de la quatrième phosphosérine permettent d'atteindre des valeurs de constantes apparentes rivalisant avec la constante apparente de l'OPN. Ces résultats indiquent que l'uranyle complexé dans le site de haute affinité de l'OPN est entouré de 3 à 4 fonctions phosphates, ce qui permet de valider l'approche que nous avons proposée pour mimer l'environnement de coordination du métal dans la protéine au chapitre III.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse avaient pour objectifs de contribuer à la caractérisation des sites d'interaction protéine-uranyle et à l'identification des facteurs clés gouvernant ces interactions.

Pour répondre à ces objectifs et obtenir des données thermodynamiques et structurales sur ces sites, deux approches stratégiques, l'une biomimétique et l'autre structurale, ont été adaptées respectivement à l'ostéopontine et à la fétuine-A, deux protéines humaines prédites comme cibles majeures de l'uranyle par l'équipe de C. Vidaud (figure 165).^{7,60}



165 – Stratégies développées pour élucider les sites d'interaction protéine-cible-uranyle

Les domaines structurés D1 et D2 de la FETUA ont été produits sous formes recombinantes pour être étudiés indépendamment l'un de l'autre, dans l'objectif de mettre en évidence l'affinité de l'uranyle pour ces domaines riches en fonctions carboxylates et phénolates. Les études ont été menées à l'aide d'une technique structurale, la RMN, et de diverses techniques physico-chimiques adaptées à l'étude de la protéine entière. Nous avons notamment validé la technique de fluorescence sur la protéine entière pour évaluer la constante apparente du site de haute affinité. La constante obtenue (10^{11}) est cohérente avec la valeur référencée dans la littérature ($10^{11,4}$). Des études complémentaires sur les domaines D1 et D2 effectuées en bioinformatique ont permis d'identifier un cluster acide à la surface de D1 qui pourrait avoir un rôle majeur dans la complexation du métal.

D2 a été obtenu avec une structure représentative de celle du domaine dans la protéine. L'absence du site de haute affinité de la FETUA sur D2 a été montrée. Une interaction relativement faible est toutefois suspectée et devra être confirmée ou contestée par la suite, les techniques employées n'ayant pas permis de quantifier cette interaction de façon fiable.

Pour vérifier que D2 a un rôle minime lors de la complexation FETUA-uranyle il serait envisageable soit de modifier la séquence de la protéine recombinante de D2 pour rendre le domaine fluorescent soit de s'affranchir des propriétés de fluorescence de D2 sous sa forme actuelle et de déterminer la constante apparente du domaine avec une méthode de compétition basée sur une sonde non naturelle.

D1 a été obtenu sous forme de *molten globule* partiellement structuré malgré les optimisations de production qui ont été effectuées. Le cluster acide de surface pourrait donc être soit partiellement soit totalement absent, et les données structurales souhaitées n'ont pas été obtenues par RMN. Il a toutefois été montré que D1 partiellement structuré interagit avec le métal avec une affinité plus faible (10^9) que la protéine selon des conditions d'analyse identiques, témoignant de la présence d'un potentiel site d'interaction local.

Nous suspectons que la cystéine N-terminale non appariée constitue un inconvénient majeur pour obtenir le bon repliement de la protéine. Il serait intéressant de produire D1 seul sous forme recombinante non marquée en remplaçant cette cystéine par une sérine qui permettrait d'éviter la formation de ponts disulfures inadéquats. Le rôle du cluster acide pourrait ainsi être évalué.

Nous avons montré que le domaine D2 ne participait pas au site de haute affinité de la FETUA. Compte tenu de cette information, il serait intéressant de produire les domaines D1-D2 conjointement sous forme recombinante. La solubilité de D2 pourrait avoir un impact positif sur la solubilité de D1 à condition, à nouveau, de remplacer la cystéine N-terminale de D1 lors de la production. Le système D1-D2 a une taille de 26 kDa et sera donc plus difficile à analyser par RMN. Des analyses physico-chimiques permettraient cependant de conclure quant à la présence ou non du site de haute affinité sur D1-D2, et d'évaluer l'importance du domaine D3 sur la stabilité du complexe FETUA-uranyle.

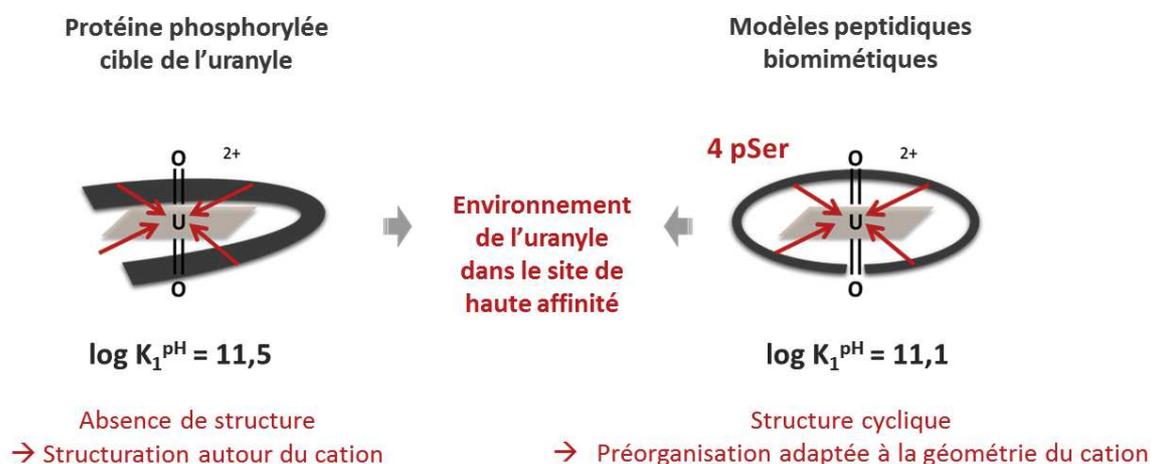
Contrairement aux domaines de la FETUA, l'**OPN** est plus difficile à analyser à l'aide de techniques structurales en raison de sa taille (35 kDa) et aussi de son absence de structure globale. C'est pourquoi une approche biomimétique a été préférée. L'équipe de P. Delangle travaille depuis plusieurs années sur la conception de cyclodécapeptides modèles bioinspirés dans le but de mimer l'environnement du métal dans une protéine phosphorylée. Des cyclodécapeptides porteurs d'une à quatre phosphosérines ont pu être développés au cours du projet. Ces peptides structurés en feuillet β sont particulièrement adaptés à la complexation de l'uranyle car ils permettent de prédisposer les fonctions carboxylates et phosphates des chaînes latérales des acides aminés dans le plan équatorial du cation. Les modèles monophosphorylés ont permis de rationaliser le rôle majeur de la première pSer dans la coordination de l'uranyle en montrant que le remplacement d'un Glu par une pSer permet à lui seul un gain d'affinité d'un facteur 50. Les pSer suivantes, introduites en diverses positions, permettent d'obtenir un gain d'affinité moins élevé, d'un facteur 16 au maximum. Nous avons néanmoins montré que l'ajout progressif de fonctions phosphates augmente systématiquement la constante apparente d'affinité du peptide pour l'uranyle, malgré la présence de nombreuses charges négatives au niveau du site de complexation.

Deux difficultés majeures ont été rencontrées au cours de ce travail, à la fois en synthèse et dans l'évaluation des affinités. Tout d'abord, la méthode développée par le laboratoire pour la synthèse de peptides à une ou deux pSer n'a pas permis de synthétiser les peptides plus riches en pSer. Nous avons donc développé un protocole original de synthèse comprenant l'ensemble des étapes sur support, y compris la phosphorylation, ce qui a permis d'obtenir les composés désirés.

Par ailleurs, les constantes apparentes d'affinité des peptides pS(168) et pS(1368) ont été difficiles à évaluer par fluorescence en raison d'une spéciation complexe. Il est donc apparu nécessaire de développer une méthode de compétition *in situ* avec une sonde fluorescente qui s'affranchit de ces problèmes pour évaluer les constantes.

Mes travaux de thèse ont conduit au développement d'une **méthode de compétition *in situ*** à l'équilibre en phase homogène entre une cible (peptide ou une protéine) et une sonde sur laquelle est greffé un fluorophore non naturel. La sonde NaphP²² fonctionnalisée avec un naphthalimide est un peptide présentant une structure adaptée à la formation d'un unique complexe monométallique stable NaphP²²-uranyle ($\log K_1 = 9,5$ à pH 7,0). L'outil présenté permet d'évaluer la ou les constante(s) apparentes de complexation cible-uranyle pour des constantes allant de $10^{6,5}$ à $10^{12,5}$. L'interprétation des données est facilitée par une spéciation simple et maîtrisée de l'uranyle en présence de cette sonde et grâce à une réponse en fluorescence centrée sur l'unité naphthalimide.

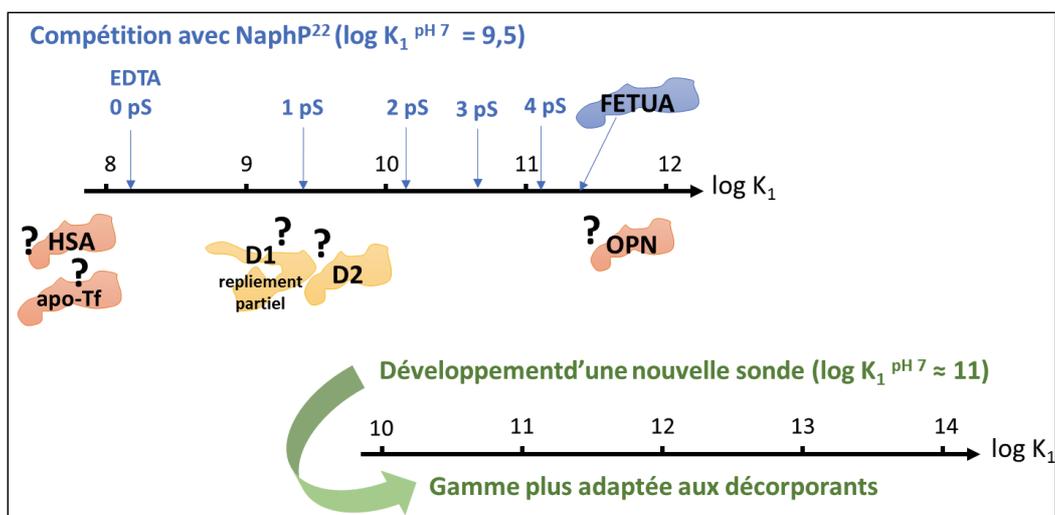
Les compétitions entre sonde et peptides porteurs de 3 à 4 pSer ont tout d'abord permis d'évaluer les constantes apparentes des trois complexes formés par l'uranyle avec ces peptides avec fiabilité, démontrant que l'augmentation du nombre de pSer dans les structures cyclodécapeptidiques menait effectivement à l'obtention d'un site de liaison du métal mimant de façon pertinente le site de haute affinité de l'OPN (figure 166).



166 – Adéquation de structure et de stabilité entre un peptide modèle tétraphosphorylé et le site de haute affinité de l'OPN

Notre objectif a ainsi été atteint. Les structures des cyclodécapeptides et plus spécifiquement le modèle tétraphosphorylé permettent de recréer l'environnement de coordination du métal dans la protéine, en favorisant le positionnement des fonctions phosphates dans le plan équatorial de l'uranyle grâce à une structure adaptée à la géométrie du cation, phénomène que reproduit l'OPN *in vitro*, en se structurant autour du métal.

Les compétitions ont également mené à un modèle de détermination de constantes apparentes construit sur une échelle d'affinité pertinente pour les cibles protéiques de l'uranyle à pH proche du pH physiologique (gamme d'affinité allant de $10^{8,5}$ à environ 10^{12}). La modélisation repose sur une série de molécules de natures, poids et structures différentes. Bien que des analyses complémentaires consacrées à l'évaluation précise des affinités des cibles soient nécessaires, cette technique permet de comparer ces cibles entre elles dans des conditions d'analyse identiques, à l'équilibre et en milieu homogène, tout en s'affranchissant de leurs différences et de leurs propriétés de fluorescence. Indépendamment des problèmes d'interprétation de données que nous avons rencontrés, la méthode permet donc de classer des molécules complexant l'uranyle qui sont de structures différentes. Il s'agit, avec la technique développée par Averseng *et al.* basée sur la SPR, de l'une des rares techniques permettant une telle hiérarchisation.⁹¹ Le modèle pourra être utilisé pour classer les différentes protéines cibles de l'uranyle connues avant d'être appliqué à la détermination des constantes apparentes des domaines D1 et D2 de la FETUA (figure 167). Une sonde non naturelle de constante apparente plus élevée que NaphP²² pourrait être développée pour adapter le modèle de hiérarchisation de cibles à l'étude de décorporants d'affinité comparable ou supérieure à celle des cibles protéiques majeures de l'uranyle.



167 – Application du modèle de détermination de constantes apparentes et conception d'une sonde plus affine pour l'étude de décorporants

Ces travaux de thèse, réalisés à l'interface chimie-biologie, montrent que l'identification des sites de liaison de l'uranyle sur une protéine entière est difficile en l'absence de données structurales (structure RX ou RMN). L'approche RMN choisie pour étudier les domaines de la FETUA, de plus petites tailles que la protéine, s'est par ailleurs avérée délicate. Les travaux portant sur les peptides biomimétiques de l'OPN montrent que si la nature des fonctions complexantes est déterminante, la capacité de ces fonctions à s'organiser dans le plan équatorial de l'uranyle est également cruciale. Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des études de sites de liaison de l'uranyle identifiés au sein de protéines ou conçus par ingénierie. Les cyclodécapeptides modèles structurés en feuillet β ont aujourd'hui montré tout leur potentiel pour mimer les sites de liaison de l'uranyle au sein de protéines phosphorylées.

La conception de pseudo-peptides dans lesquels les acides aminés coordinants sont greffés sur des plateformes chimiques judicieusement choisies permettra de tester de nouvelles structures adaptées à la complexation de l'uranyle en milieu aqueux, avec une spéciation simple et maîtrisée. Cette approche a notamment été validée par notre laboratoire pour la complexation du Cu(I)^{182} et pourrait être adaptée à la conception de décorporants pour l'uranyle. L'insertion de résidus phosphorylés permettrait d'obtenir des ligands très affins et sélectifs pour l'uranyle vis-à-vis du calcium, comme observés avec les cyclodécapeptides phosphorylés. Les structures pourront également être élaborées pour favoriser des interactions en seconde sphère de coordination permettant de stabiliser les complexes et d'atteindre des valeurs de constantes apparentes particulièrement élevées, comme par exemple des liaisons hydrogènes avec les atomes d'oxygènes du cation.

EXPERIMENTAL PART

1 Synthesis

1.1 General information

Solvents and reagents were purchased from Alfa Aesar, Carlo Erba, Fluka, Sigma Aldrich and VWR, and were used without further purification unless specified. Natural amino acids were purchased from Merck Novabiochem and Bachem. Deuterated solvents were purchased from Euriso-top. All aqueous solutions were prepared from ultra-pure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore Milli-Q cartridge system (resistivity 18.2 M Ω .cm at 25 °C). Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on Silica gel 60 plates, coated with fluorescent indicator F254 from Merck Millipore. The detection was done under UV light, at 254 or 365 nm. Organic compounds were purified when specified on a silica gel column with Silica gel Kieselgel 60 (0.040 0.063 mm, Merck), and characterized by ^1H NMR and ESI-MS. Peptides were purified by preparative RP-HPLC and purities were established by analytical HPLC analyses. All peptides were characterized by ESI-MS and phosphorylated compounds were characterized by $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR and ^{19}F NMR when specified.

Nuclear magnetic resonance (NMR)

NMR spectra were measured on a Bruker AVANCE 400 spectrometer (^1H : 400 MHz, ^{31}P : 162 MHz, ^{19}F : 376.4 MHz) at 298 K. The magnetic field homogeneity was achieved using 3D gradient shimming method. Chemical shifts were referenced to $\delta\text{TMS} = 0.00$ ppm (^1H), $\delta\text{CF}_3\text{COOH} = 0.00$ ppm (^{19}F) and $\delta\text{H}_3\text{PO}_4$ (85%) = 0.00 ppm (^{31}P , externally). Chemical shifts (δ) are reported in ppm and multiplicity is reported according to the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet) or m (multiplet), and coupling constants (J) are reported in Hz. For ^1H NMR, assignments of individual resonances were done using 2D techniques (HH-COSY) when necessary.

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)

Mass spectra were acquired on a LXQ-type Thermo Scientific spectrometer equipped with an electrospray ionization source and a linear trap detector. The LXQ calibration (m/z 50-2000) was achieved according to the standard calibration procedure from the manufacturer. Solutions were injected into the spectrometer using a syringe pump, at 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate. The ionization voltage was in the range of 2-6 kV. The capillary temperature of the LXQ was set to 250 °C for organic compounds and peptides complexes. The samples were analyzed in positive and/or negative modes.

High performance liquid chromatography (HPLC)

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) were performed on a LaChrom system equipped with a UV monitor. UV chromator wavelength was set at 214 nm. Peptide samples (ca 1 mg.mL⁻¹ for analytical HPLC and 10 mg.mL⁻¹ for preparative HPLC) were prepared in a solvent or in a mixture of solvent identical to initial chromatographic conditions. Samples were filtrated on a 0.45 µm PTFE (polytetrafluoroethylene) filter before injection. Different types of stationary and mobile phases were used, depending on the compound to analyze.

Reference peptides **A1**, **pS(1)**, **pS(6)** and **P²²** were analyzed by RP-HPLC using a Merck Purospher®STAR RP-18 endcapped column (250-4.6 i.d. mm, 5 µm), and purified on a Merck Purospher®STAR column (125-25 i.d. mm, 5 µm). Solvents used for RP-HPLC were: A = H₂O/TFA (v/v=99.925/0.075), solvent B = ACN/H₂O/TFA (v/v/v = 90/10/0.1). Applied flow rate was 1 mL.min⁻¹ for analytical HPLC and 15 mL.min⁻¹ or 30 mL.min⁻¹ for preparative HPLC.

Peptides **pS(168)** and **pS(1368)** acids were analyzed by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) on a SeQuant® ZIC®-HILIC column (150 x 4.6 i.d. mm, 5 µm, 200 Å, Merck Millipore) and purified on a SeQuant® ZIC®-HILIC preparative column. Solvents used for HILIC were: A : ACN and B: 50mM NH₄OAc buffer (pH 6.9). Applied flow rate was 1 mL.min⁻¹ for analytical HPLC and 20 mL.min⁻¹ for preparative HPLC.

All other peptides were analyzed by RP-HPLC on a Chromolith® Performance RP-18 endcapped column (100-4.6 i.d. mm, Macropore size 200A and mesopore size 13 Å, Merck Millipore) equipped with a Chromolith® guard cartridge. Compounds were purified on a Chromolith® Performance RP-18 endcapped column (100 x 25 i.d.) preparative column. Solvents used for RP-HPLC were: A: ACN/H₂O/TFA (90/10/0.1, v/v/v) and B: H₂O/TFA (99.925/0.075, v/v). Applied flow rate was 1 mL.min⁻¹ for analytical HPLC and 20 mL.min⁻¹ for preparative HPLC.

1.2 Unnatural amino acid synthesis

1.2.1 Fmoc-Lys(Naph)-OH synthesis

The unnatural amino acid Fmoc-Lys(Naph)-OH was synthesized by M. Debayle, following the synthetic pathway presented in figure 168.

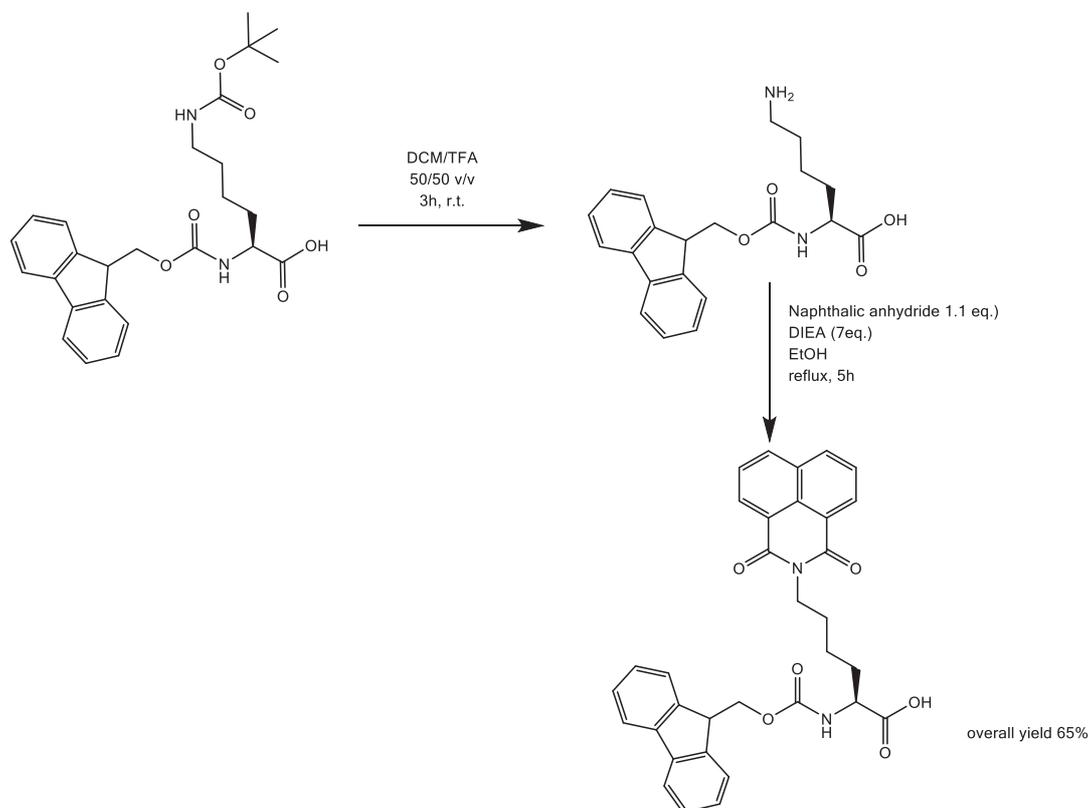
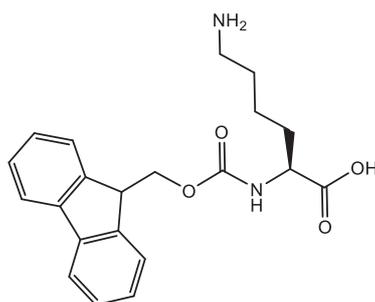
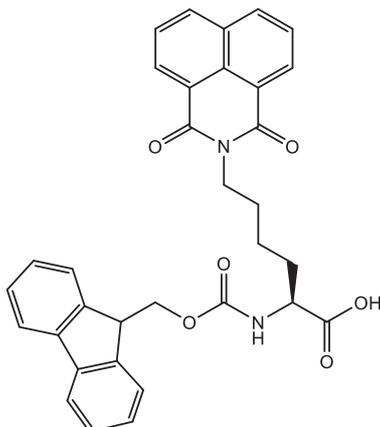


Figure 168 -Synthetic pathway to *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Naphthalimide-*L*-lysine (Fmoc-Lys(Naph)-OH).



N- α -Fmoc-*L*-lysine **1**

N- α -Fmoc-*N*- ϵ -Boc-*L*-lysine (500 mg, 1.1 mmol) lateral chain was deprotected in 10 mL CH₂Cl₂/TFA 50/50 v/v during 3h at room temperature. CH₂Cl₂ was evaporated under reduced pressure and TFA was evaporated with H₂O. The crude product was precipitated in cold ether yielding to a yellow oil. The crude product was used without further purification.



***N*-α-Fmoc-*N*-ε-Naphthalimide-L-lysine 2**

Compound 1 was solubilized in 20 mL of absolute EtOH. DIEA (1.25 mL, 7.2 mmol) and naphthalic anhydride (240 mg, 1.2 mmol) were added. The mixture was agitated at reflux for 5h then solvent was evaporated under reduced pressure. Compound 2 was purified by RP-HPLC on a Chromolith column (50 to 100% of B in 15 min).

The pure compound (440 mg, 0.80 mmol) was isolated as a white solid (65% overall yield).

(-)-ESI-MS calculated for $C_{33}H_{28}N_2O_6$ $[M-H]^-$ m/z 547.2 experimental $[M-H]^-$ m/z 546,9.

1.2.2 Fmoc-Drp(Naph)-OH synthesis

The unnatural amino acid Fmoc-Dpr(Naph)-OH was synthesized by O. Four Merlin using synthetic pathway presented in figure 169. The protocol was adapted from synthetic pathway presented in figure 168 for Fmoc-Lys(Naph)-OH.

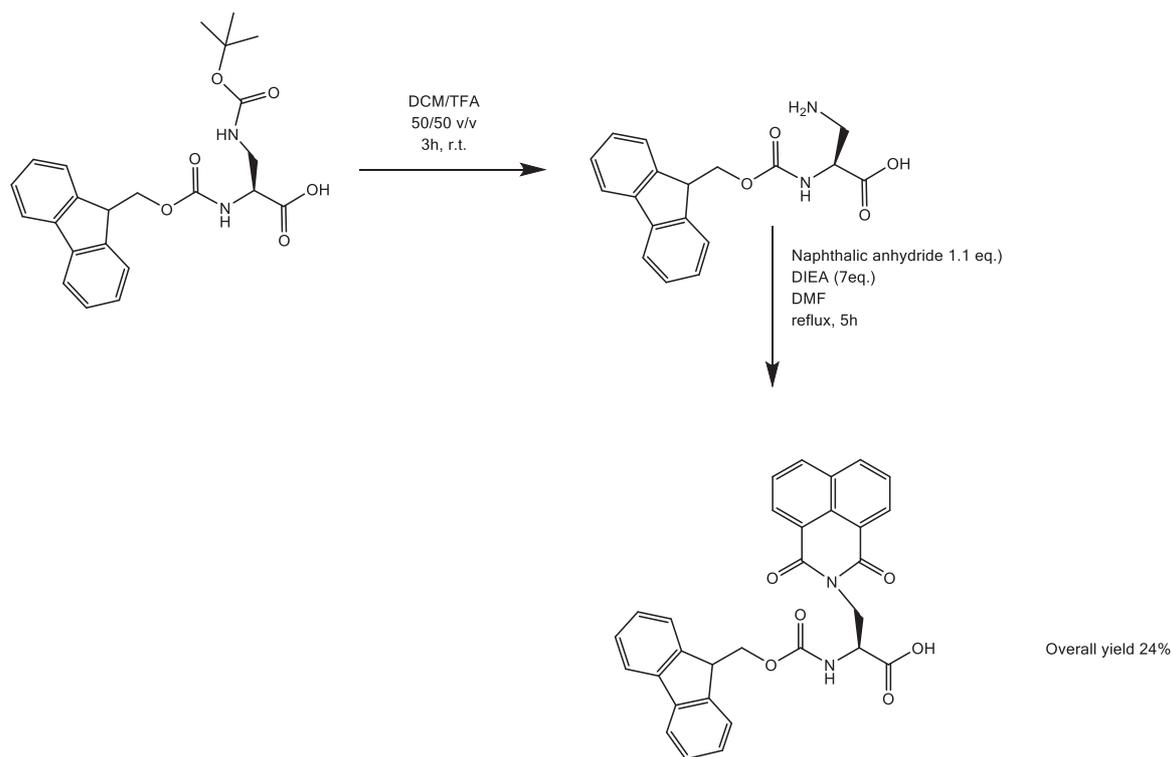
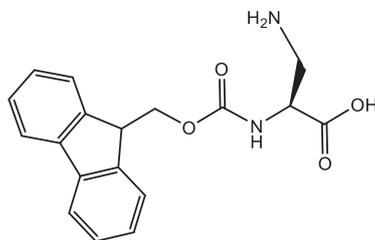
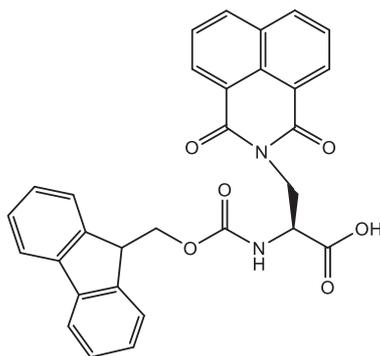


Figure 169 - Synthetic pathway to *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Naphthalimide-*L*-diaminopropionic acid (Fmoc-Dpr(Naph)-OH).



N- α -Fmoc-*L*-diaminopropionic acid **3**

N- α -Fmoc-*N*- β -Boc-*L*-diaminopropionic acid (1 g, 2.4 mmol) lateral chain was deprotected in 24 mL CH₂Cl₂/TFA 50/50 v/v during 4h at room temperature. CH₂Cl₂ was evaporated under reduced pressure and TFA was evaporated with H₂O. The crude product was precipitated in cold ether yielding to a yellow oil. Absence of initial product was confirmed by TLC analysis (eluent: CH₂Cl₂/MeOH 90/10). The crude product **3** was used without further purification.



N- α -Fmoc-N- β -Naphthalimide-L-diaminopropionic acid 4

N- α -Fmoc-L-diaminopropionic acid **3** (1.18 g, 2.4 mmol) was solubilized in 110 mL of absolute EtOH. 4.6 mL of DIEA and 510 mg of naphthalic anhydride (2.6 mmol, 1.1 eq.) were added yielding to a heterogeneous mixture. The mixture was agitated at reflux. The reaction media was homogenous after 1h and a TLC analysis (90/10, CH₂Cl₂/MeOH) showed conversion of **3** after 5 hours. Solvents were evaporated under reduced pressure and the product was purified on silica gel chromatography (eluent: CH₂Cl₂/MeOH (0 to 5% MeOH)) to give compound **4** (0.28g, 24% overall yield) as a yellowish solid.

(-)-ESI-MS: calculated for C₃₀H₂₁N₂O₆ [M-H]⁻ m/z 505.1, experimental [M-H]⁻ m/z 504.9.

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298 K): δ 8.41 (d, ³J(H,H) = 7.3 Hz, 2H, Ar (Naph)); δ 8.38 (d, ³J(H,H) = 8.2 Hz, 2H, Ar (Naph)); δ 7.843 (d, ³J(H,H) = 7.6 Hz, 2H, Ar (Fmoc)); δ 7.78 (dd (app.t), ³J(H,H) \approx 7.7 Hz, 2H, Ar (Naph)); δ 7.53 (d, ³J(H,H) \approx 7.4 Hz, 1H, Ar (Fmoc)); δ 7.38 (m, 3H, Ar (Fmoc)); δ 7.27 (dd (app.t), ³J(H,H) \approx 7.3 Hz, 1H, Ar (Fmoc)); δ 7.18 (dd (app.t), ³J(H,H) \approx 7.5 Hz, 1H, Ar (Fmoc)); δ 4.41 (m, 2H, CH₂ β); δ 4.35 (m, 1H, H α); δ 3.93 (m, 1H, H(Fmoc)); δ 3.85 (m, 2H, CH₂(Fmoc)).

1.3 Reference polyglutamate peptide A1

The reference polyglutamate peptide **A1** was synthesized according to protocol described by Lebrun *et al.*¹⁵¹

Reference peptide **A1** was analyzed by RP-HPLC using a Merck Purospher®STAR RP-18 endcapped column (250-4.6 i.d. mm, 5 μ m), and purified on a Merck Purospher®STAR column (125 x 25 i.d. mm, 5 μ m). Solvents used for RP-HPLC were: A = H₂O/TFA (v/v=99.925/0.075), solvent B = CH₃CN/H₂O/TFA

(v/v/v = 90/10/0.1). Applied flow rate was 1 mL.min⁻¹ for analytical HPLC and 15 mL.min⁻¹ for preparative HPLC.

Cyclic peptide A1: c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-Glu-Pro-Gly).

52 mg, 45 μmol, 47% overall yield.

Analytical HPLC : 99% purity, t_R = 19.4 min.

(+)-ES-MS: calculated for C₅₁H₇₀N₁₄O₁₈ [M+H⁺]⁺ = 1167.5 ; exp [M+H⁺]⁺ = 1167.5

1.4 Phosphorylated peptides

1.4.1 Monophosphorylated peptides

Monophosphorylated peptides (figure 170) were analyzed by RP-HPLC using a Chromolith® RP-18 endcapped column (100 x 4.6 i.d. mm, Merck Millipore), and purified on a Chromolith®, RP-18e preparative column (100 x 25 i.d. mm). Solvents used for RP-HPLC were: A = H₂O/TFA (v/v=99.925/0.075), solvent B = ACN/H₂O/TFA (v/v/v = 90/10/0.1).

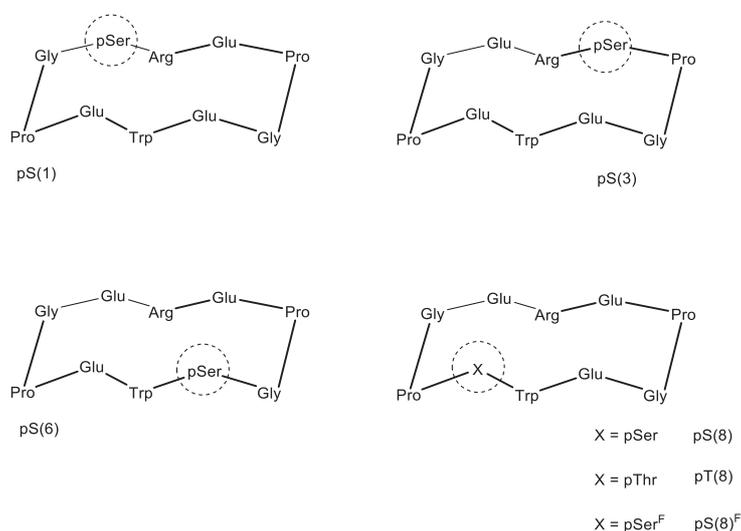


Figure 170 -Monophosphorylated peptides

Peptides pS(1) and pS(6) were synthesized by M. Starck and S. Oros. Synthesis is described in figure 171 for pS(8) as an example, for synthetic path B.

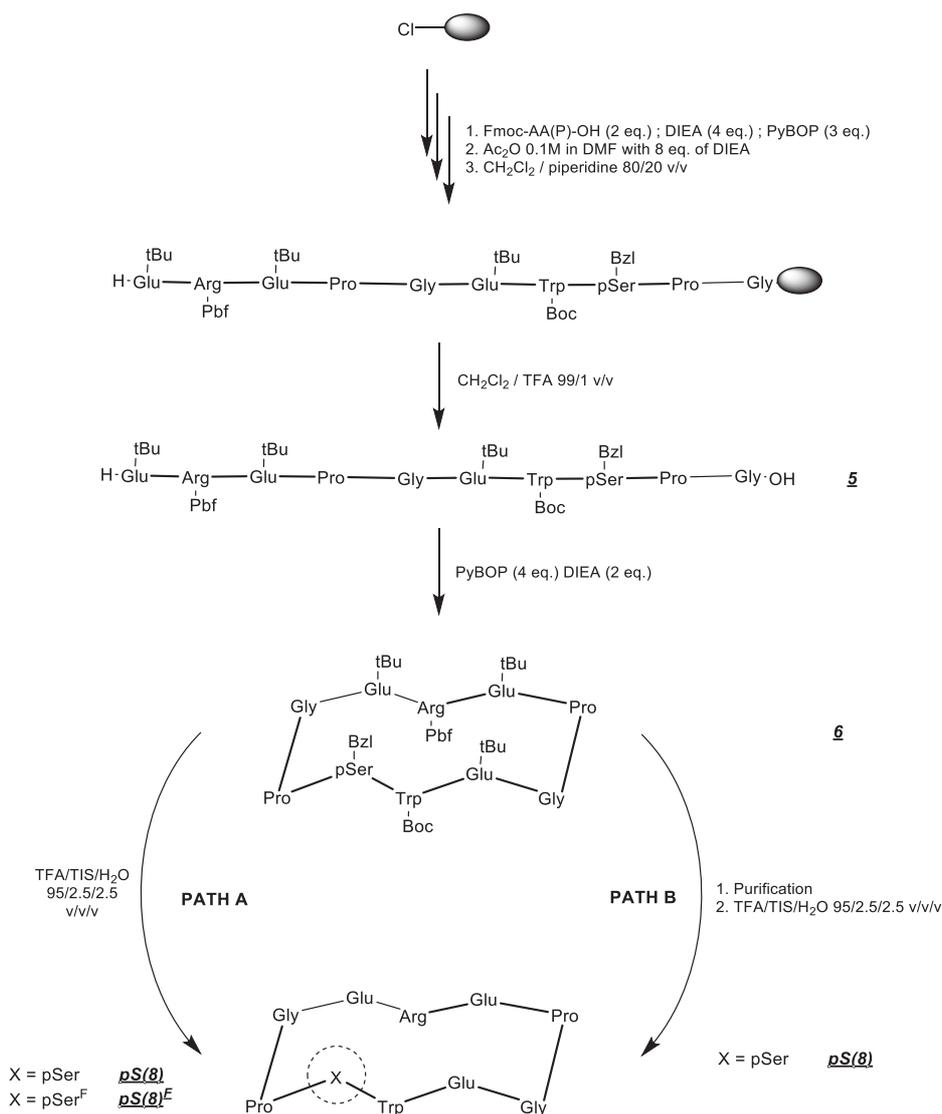


Figure 171 -Synthetic pathway to phosphorylated peptide **pS(8)** by introduction of protected phosphorylated amino acids by SPPS.

Linear precursor 5 $\text{H-Glu}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-Arg}(\text{Pbf})\text{-Glu}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-Pro-Gly-Glu}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-Trp}(\text{Boc})\text{-pSer}(\text{Bzl})\text{-Pro-Gly-OH}$

The linear precursor with protected side-chains was assembled by automated solid-phase peptide synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin (substitution $0.568 \text{ mmol.g}^{-1}$, 419 mg) using Fmoc strategy with a synthesizer (LIBERTY 1-CEM) and microwave activation. After Fmoc titration (Final loading = $0.384 \text{ mmol.g}^{-1}$, $161 \mu\text{mol}$, SPPS yield 68%), the peptide was cleaved from the resin by treatment with a CH_2Cl_2 /TFA solution (45 mL, 99/1 (v/v)) (3x3 min), then solvent was evaporated and the residue was precipitated in cold Et_2O to obtain an orange oil. Compound **5** was directly used for the next step without further purifications.

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient from 50 to 100% B over 15 min): 86.1 % purity, $t_R = 8.2$ min.

(+)-ESI-MS: calculated for $\text{C}_{86}\text{H}_{125}\text{N}_{14}\text{O}_{26}\text{PS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1833.8 experimental $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1833.4

Cyclic protected peptide 6 c(Glu(O^tBu)-Arg(Pbf)-Glu(O^tBu)-Pro-Gly-Glu(O^tBu)-Trp(Boc)-pSer(Bzl)-Pro-Gly)

Linear protected peptide 5 (161 μmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mM) and DIEA (0.55 mL, 3.2 mmol, 20 eq.) was added. Then PyBOP (3.1 eq.) was added. The reaction was monitored using analytical RP-HPLC (Merck Chromolith®) and was stopped after 2 hours. The solvent was concentrated and the residue precipitated in cold Et₂O to obtain an orange oil. The compound was dissolved in ACN/H₂O (50/50 v/v), filtered on 0.45 μm PTFE and purified by preparative RP-HPLC (Merck Chromolith®) to yield pure protected cyclodecapeptide 6 (106 mg, 58 μmol, 36%) as a white solid after lyophilization.

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 50 to 100% B over 15 min): 95.5 % purity, t_R = 11.6 min.
(+) ESI-MS: calculated for C₈₆H₁₂₃N₁₄O₂₅PS [M+H]⁺ m/z 1815.8, experimental [M+H]⁺ m/z 1815.6.

Cyclic peptide pS(8) c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-pSer-Pro-Gly)

Cyclic protected peptide 6 (53 mg, 29 μmol) was treated with a TFA/TIS/H₂O solution (5 mL, 95/2.5/2.5 v/v/v). After being stirred for 2.5h the solution was evaporated under reduced pressure to afford a yellow oil, which was precipitated with cold Et₂O to yield the crude compound pS(8) as a yellowish solid. Pure cyclodecapeptide pS(8) (29 mg, 24 μmol) was isolated after preparative RP-HPLC (Merck Chromolith®) as a white solid after lyophilisation (83% yield, 20% overall yield).

Analytical RP-HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 99.1% purity, t_R = 13.9 min.
(-)ESI-MS calculated for C₄₉H₆₉N₁₄O₂₀P: [M-H]⁻ m/z 1203.4, experimental [M-H]⁻ m/z 1203.4
³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ 0.35 (s, Ser₈(OPO(OH)₂)).

Cyclic peptide pS(1) c(pSer-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-Glu-Pro-Gly).

52 mg, 43 μmol, 21% overall yield.

Analytical HPLC (Purospher® star column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 100 % purity, t_R = 18.4 min.
(-)ESI-MS calculated for C₄₉H₆₉N₁₄O₂₀P: [M-H]⁻ m/z 1203.5, experimental [M-H]⁻ m/z 1203.3
³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -0.14 (s, Ser₁(OPO(OH)₂)).

Cyclic peptide pS(3) c(Glu-Arg-pSer-Pro-Gly-Glu-Trp-Glu-Pro-Gly).

28 mg, 23 μmol, 20% overall yield.

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 99.4 % purity, t_R = 14.4 min.
(-)ESI-MS calculated for C₄₉H₆₉N₁₄O₂₀P: [M-H]⁻ m/z 1203.5, experimental [M-H]⁻ m/z 1203.3
³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -0.07 (s, Ser₃(OPO(OH)₂)).

Cyclic peptide pS(6) c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-pSer-Trp-Glu-Pro-Gly).

18 mg, 15 μ mol, 10% overall yield.

Analytical HPLC (Purospher® star column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 100 % purity, t_R = 18.0 min.

(-)ESI-MS calculated for C₄₉H₆₉N₁₄O₂₀P: [M-H]⁻ m/z 1203.5 and [M-2H]²⁻ m/z 601.2, experimental [M-H]⁻ m/z 1203.2 and [M-2H]²⁻ m/z 601.1.

³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -0.06 (s, Ser₆(OPO(OH)₂)).

Cyclic peptide pT(8) c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-pThr-Pro-Gly).

10 mg, 8 μ mol, 6% overall yield.

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 99 % purity, t_R = 13.7 min.

(-)ESI-MS calculated for C₅₀H₇₁N₁₄O₂₀P: [M-H]⁻ m/z 1217.5 and [M-2H]²⁻ m/z 608.2, experimental [M-H]⁻ m/z 1217.5 and [M-2H]²⁻ m/z 608.3.

³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -0.07 (s, Thr₈(OPO(OH)₂)).

A sample of pure fluorophosphate by-product could be isolated after preparative RP-HPLC (Path A, figure 171):

Cyclic peptide pS(8)^F c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-pSer^F-Pro-Gly).

2.2 mg, 1.8 μ mol

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 89.6 % purity, t_R = 14.2 min

(+)ESI-MS calculated for C₄₉H₆₈N₁₄O₁₉PF: [M+H]⁺ m/z 1207.5, experimental [M+H]⁺ m/z 1207.6

³¹P{¹H} NMR (162 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -5.9 (d, ¹J_{PF} = 939 Hz, Ser₈(OPO(OH)F)).

¹⁹F NMR (376 MHz, H₂O/D₂O (90/10, v/v), 298 K): δ -75.4 (s, 3F, CF₃COO⁻); δ -78.9 (d, ¹J_{PF} = 939 Hz, 1F, Ser(OPO(OH)F))

1.4.2 Diphosphorylated peptides

Diphosphorylated peptides pS(16), pS(18), pS(38) and pS(68) (figure 172) were synthesized by M. Starck and S. Sisommay, using the same protocol as described for monophosphorylated peptides (Path B, with purification of cyclic protected intermediate – see figure 171).

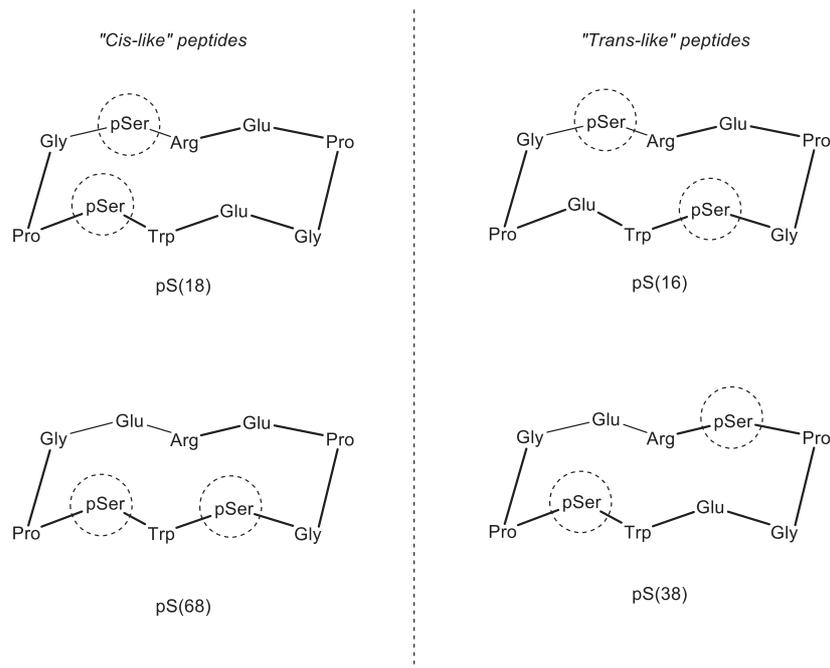


Figure 172 -Diphosphorylated peptides

Cyclic peptide **pS(18)** c(pSer-Arg-Glu-Pro-Gly-Glu-Trp-pSer-Pro-Gly).

17 mg, 12.5 μmol , overall yield 14%

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% of B in 30 min): Purity = 99.6%, t_R = 12.8 min

(-)-ESI-MS calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_2$: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4; experimental $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4

Cyclic peptide **pS(16)** c(pSer-Arg-Glu-Pro-Gly-pSer-Trp-Glu-Pro-Gly).

14 mg, 10.3 μmol , overall yield 5%

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% of B in 30 min): Purity = 99.8%, t_R = 12.8 min

(-)-ESI-MS calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_2$: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4; experimental $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4

Cyclic peptide **pS(68)** c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-pSer-Trp-pSer-Pro-Gly).

5 mg, 3.7 μmol , overall yield 5%

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% of B in 30 min): Purity = 98.8%, t_R = 12.9 min

(-)-ESI-MS calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_2$: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4; experimental $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4

Cyclic peptide **pS(38)** c(Glu-Arg-pSer-Pro-Gly-Glu-Trp-pSer-Pro-Gly).

10 mg, 7.4 μmol , overall yield 6%

Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% of B in 30 min): Purity = 100%, t_R = 12.4 min

(-)-ESI-MS calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_2$: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4; experimental $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 1241.4

1.4.3 Tri- and tetraphosphorylated cyclodecapeptides

Peptides pS(168) and pS(1368) (figure 173) were synthesized using an original protocol developed in the laboratory using global phosphorylation of serines post-SPPS. Peptide pS(1368) was manually synthesized to optimize the protocol and pS(168) was synthesized by C. Lebrun using automated SPPS. General protocol is described in figure 174.

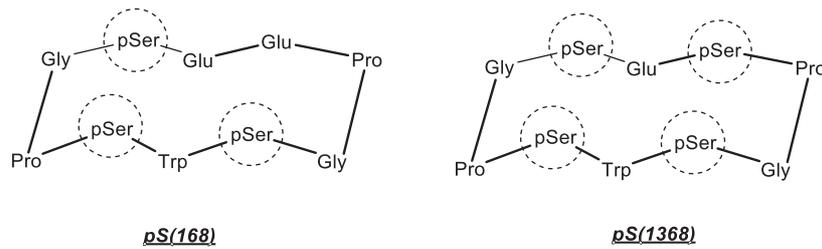


Figure 173 -Tri and tetraphosphorylated peptides

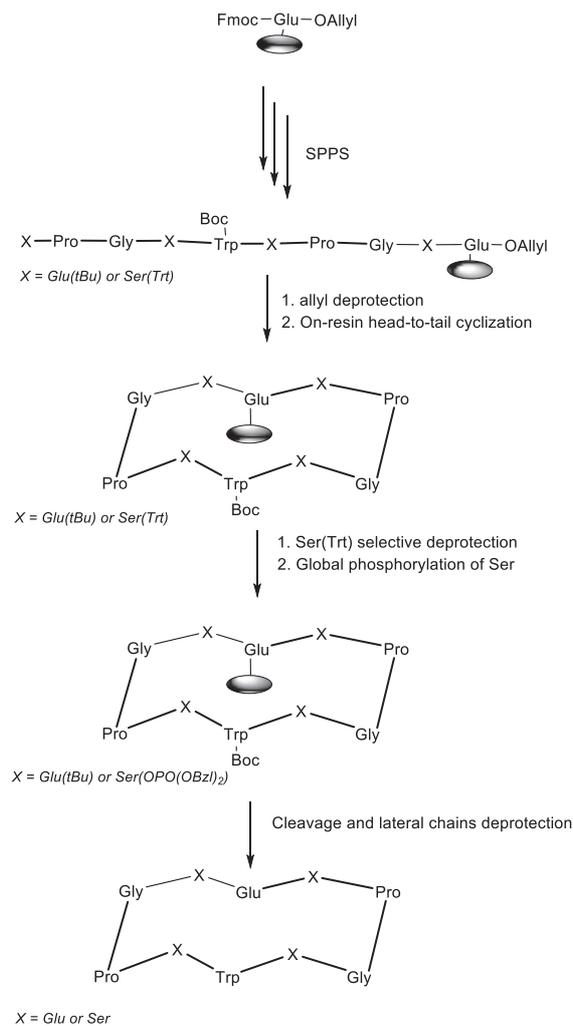


Figure 174 - Synthetic pathway to tri- and tetraphosphorylated peptides

SPPS

H-Glu(O^tBu)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin)-OAllyl

by automated SPPS

The linear precursor with protected side-chains was assembled by automated solid-phase peptide synthesis on pre-loaded resin Fmoc-Glu(Novasyn TGA resin)-Oallyl (substitution 0.21 mmol/g, 1.10 g) using Fmoc strategy with a synthesizer (LIBERTY 1-CEM) with microwaves activation. Final Fmoc titration was manually achieved, giving a final loading of 0.141 mmol/g, 155 μ mol, SPPS yield 67 %.

H-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin)-OAllyl

by manual SPPS

Linear precursor was manually assembled by SPPS on a preloaded Fmoc-Glu(Novasyn TGA resin)-Oallyl (loading = 0.20 mmol/g ; 1.020 g) by using Fmoc chemistry. The anhydrous resin beads were swelled in CH₂Cl₂ for 30 min then in DMF for 30 min. An initial deprotection of the Fmoc group grafted on the amine of the commercial preloaded resin, using a DMF/piperidine solution (4/1, v/v; 3 x 10 mL x 3 min), gave the initial loading of the resin. Coupling of the natural amino acids were performed with N α -Fmoc-protected amino acids (2 equiv.), PyBOP (2 equiv.) and DIEA (4 equiv.) in DMF (10 mL). After each coupling, the resin was treated with acetic anhydride solution (0.1M in DMF adjusted at pH 9 with DIEA, 2 x 5 mL x 5 min) to acetylate unreacted amino groups. Fmoc deprotection was achieved with DMF/piperidine (4/1, v/v, 3 x 10 mL x 3 min). The yield of each amino acid coupling was determined by UV/Vis spectroscopy ($\epsilon_{301\text{ nm}} = 7800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for the dibenzofulvene-piperidine adduct). The resin was washed with DMF (2 x 10 mL), CH₂Cl₂ (1 x 10 mL) and DMF (1 x 10 mL) before each step. The on-resin yield (77%) was defined as the ratio of global loading obtained at the end of the couplings, on the initial loading of resin.

Allyl deprotection

H-Glu(O^tBu)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin)-OH

H-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin)-OH

The NovaSyn TGA resin bearing the linear peptide was rinsed with anhydrous DMF (8 mL) and transferred under argon in a triple-neck round bottom flask using a solution of CHCl₃/AcOH/NMM solution (37/2/1, v/v/v, 14 mL). A solution of Pd(PPh₃)₄ (3 eq. / initial loading) in CHCl₃/AcOH/NMM (37/2/1, v/v/v, 5 mL, argon bubbling for 2 hours) was prepared and introduced in the reaction mixture under argon. The resin was stirred for 2 hours under argon, then transferred in a SPPS reactor. The reagents were removed by filtration. The resin washed with 0.5% DIEA solution in DMF (4x10 mL) and 0.5%w sodium diethylthiocarbamate solution in DMF (4x10 mL). Finally, the resin was washed with DMF (4 x 10 mL).

On-resin head-to-tail cyclization : Protocol was adapted from Renaudet *et al.*¹⁶⁴

c(Glu(O^tBu)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin))

c(Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Trp(Boc)-Ser(Trt)-Pro-Gly-Ser(Trt)-Glu(Novasyn TGA resin))

PyBOP (2 eq./initial loading) and DIEA (4 eq./initial loading) were added to the resin in DMF (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The reagents were filtered and the resin was washed with DMF (2x10 mL). This step was repeated twice.

To follow the reaction, an aliquot of resin beads were treated with TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) for 1 hour then the filtrate was analyzed by ESI-MS.

Precursor of pS(168) :

(-)-ESI-MS: calculated for C₄₄H₅₉N₁₁O₁₇ [M-H]⁻ m/z 1012.4 ; experimental [M-H]⁻ m/z 1012.3

Precursor of pS(1368):

(+)-ESI-MS: calculated for C₄₂H₅₇N₁₁O₁₆ [M+H]⁺ m/z 972,4 experimental [M+H]⁺ 972.5

Selective deprotection of trityl

c(Glu(O^tBu)-Pro-Gly-Ser-Trp(Boc)-Ser-Pro-Gly-Ser-Glu(Novasyn TGA resin))

c(Ser-Pro-Gly-Ser-Trp(Boc)-Ser-Pro-Gly-Ser-Glu(Novasyn TGA resin))

The removal of trityl groups was achieved using 10 mL aliquots of a DCM/TFA/TIS solution (94/1/5, v/v/v). The reaction completion was followed using UV-titration of the filtered reagents solution and the resin was treated until the filtered solution exhibits zero absorbance. A total of 145 mL of DCM /TFA/TIS solution were added. The resin was finally washed with CH₂Cl₂ (2 x 10 mL), and DMF (4 x 10 mL).

On-resin global phosphorylation

c(Glu(O^tBu)-Pro-Gly-pSer(OBzl)₂-Trp(Boc)-pSer(OBzl)₂-Pro-Gly-pSer(OBzl)₂-Glu(Novasyn TGA resin))

c(pSer(OBzl)₂-Pro-Gly-pSer(OBzl)₂-Trp(Boc)-pSer(OBzl)₂-Pro-Gly-pSer(OBzl)₂-Glu(Novasyn TGA resin))

Serine residues were phosphorylated using a 2 steps phosphitylation/oxidation protocol. After being swelled for 1 hour in anhydrous DMF, the loaded resin (0.141 mmol/g, theoretical loading) was washed twice with anhydrous DMF and transferred under argon into a triple-neck round bottom flask using 10 mL of anhydrous DMF. For pS(168) precursor, a 4,5-dicyanoimidazole (DCI) solution was prepared by dissolving 2.88 g (40 eq./Ser) of DCI in 5 mL of anhydrous DMF. For pS(1368) precursor, a 1H-tetrazole solution was prepared by dissolving 1H-tetrazole (40 eq./Ser) in 0.45M tetrazole solution. Dibenzyl N,N-

diisopropylphosphoramidite (10 eq/Ser) was added to the DCI or tetrazole solution and the resulting solution (DCI/phosphoramidite or tetrazole/phosphoramidite) was added to the resin through septum, under argon and the resin was stirred, under argon, at room temperature. After 3 hours, the reaction was quenched using a 5 M solution of tertbutylhydroperoxide (1.34 mL, 1.1 eq./phosphoramidite). After 30 min, the resin and reagents were transferred back to a funnel glass reactor and reagents were removed by filtration. The resin was washed with DMF (4 x 10 mL), MeOH (1 x 10 mL) and DMF again (2 x 10 mL). An aliquot of resin was taken and treated with TFA/TIS/H₂O (99/4/1, v/v/v) for 1 hour then the filtrate was analyzed by (-)-ESI-MS:

Precursor of pS(168) :

(-)-ESI-MS: calculated for C₄₄H₆₂N₁₁O₂₆P₃ [M-H]⁻ m/z 1252.3 experimental [M-H]⁻ 1252.1

Precursor of pS(1368) with 7 Bzl:

(-)-ESI-MS: calculated for C₉₁H₁₀₃N₁₁O₂₈P₄ [M-H]⁻ m/z 1920.6 experimental [M-H]⁻ 1920.3

Cleavage and deprotection of cyclodecapeptide

pS(168) and pS(1368)

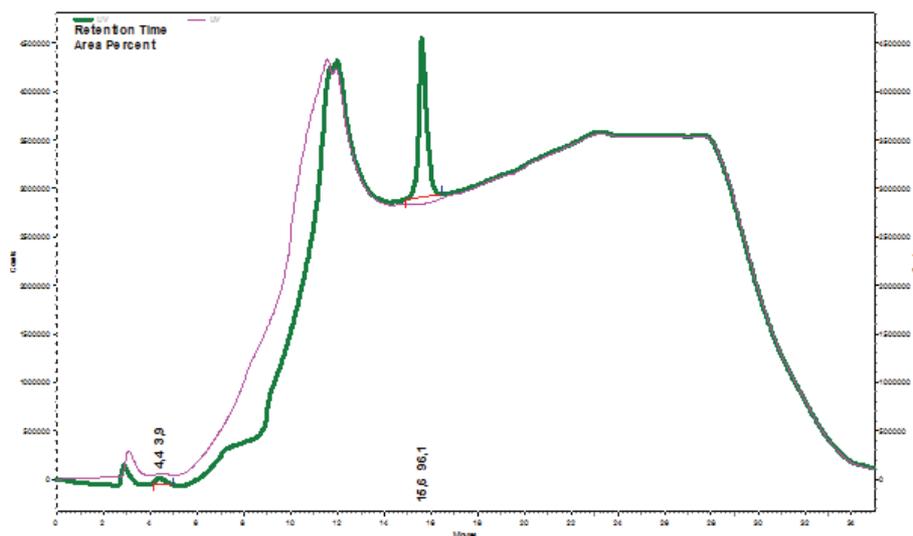
The cyclic peptides were cleaved from Novasyn TGA resin using a TFA/TIS/H₂O mixture (95/2.5/2.5, v/v/v 10 mL) under stirring for 1 hour. The reagents were filtered and collected and the operation was repeated twice. The resin was washed with TFA/H₂O/TIS mixture (2 x 10mL) and the reagents were collected. The collected fractions were combined then evaporated under reduced pressure. The crude compound (113 mg) was precipitated with cold diethylether or diisopropylether as a yellow solid.

Characterization of final products

The pure **cyclodecapeptide pS(168)** (11.7 mg, 8.5% overall yield) was isolated after preparative HPLC (Zic-Hilic, Merck) as a pinkish solid after several lyophilisations.

Analytical HPLC (Zic-Hilic® column, gradient 5 to 60% of B in 20 min): Purity = 96 %, Rt = 15.6 min.

(-)-ESI-MS calculated for C₄₄H₆₂N₁₁O₂₆P₃: [M-H]⁻ 1252.3 ; experimental [M-H]⁻ 1252.2 ; [M-2H]²⁻ 625.7.

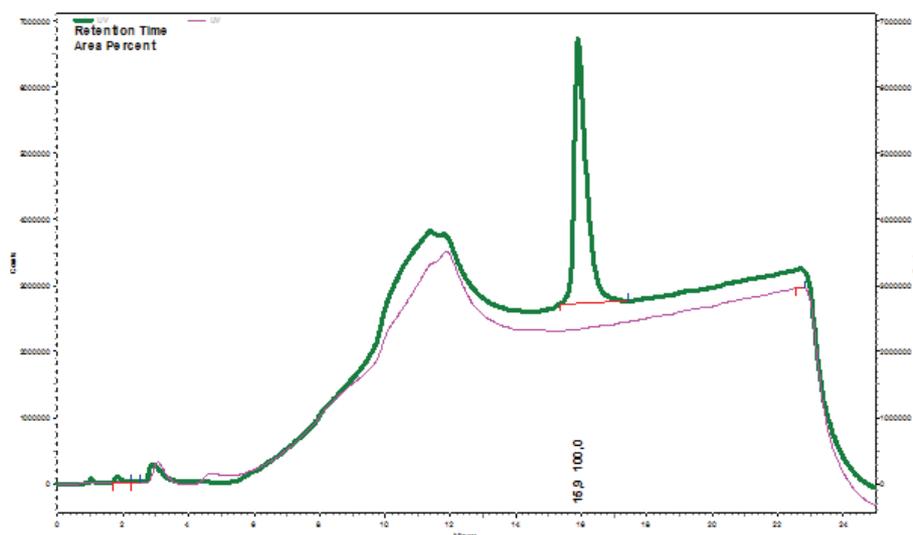


Analysis of *pS(168)* on HILIC® (compound in green and blank in pink)

The pure cyclodecapeptide *pS(1368)* (11.7 mg, 8% overall yield) was isolated after preparative HPLC on a Zic-Hilic® column as a white solid after several lyophilisations.

Analytical HPLC (Zic-Hilic® column, gradient 5 to 60% of B in 20 min): Purity = 96 %, Rt = 15.8 min.

(-)-ESI-MS calculated for $C_{42}H_{61}N_{11}O_{28}P_4$: $[M-H]^-$ 1290.3 ; experimental $[M-H]^-$ 1290.1 ; $[M-2H]^{2-}$ 644.8.



Analysis of *pS(1368)* on HILIC® (compound in green and blank in pink)

1.4.4 Linear tetraphosphorylated peptide

Linear tetraphosphorylated peptide *pS(1368)lin* was obtained by deprotection of linear protected precursor synthesized by N. Sisommay (figure 175). Solvents for high-performance liquid chromatography (HPLC) are A: H_2O/TFA (99.925/0.075, v/v) and B: $ACN/H_2O/TFA$ (90/10/0.1, v/v/v).

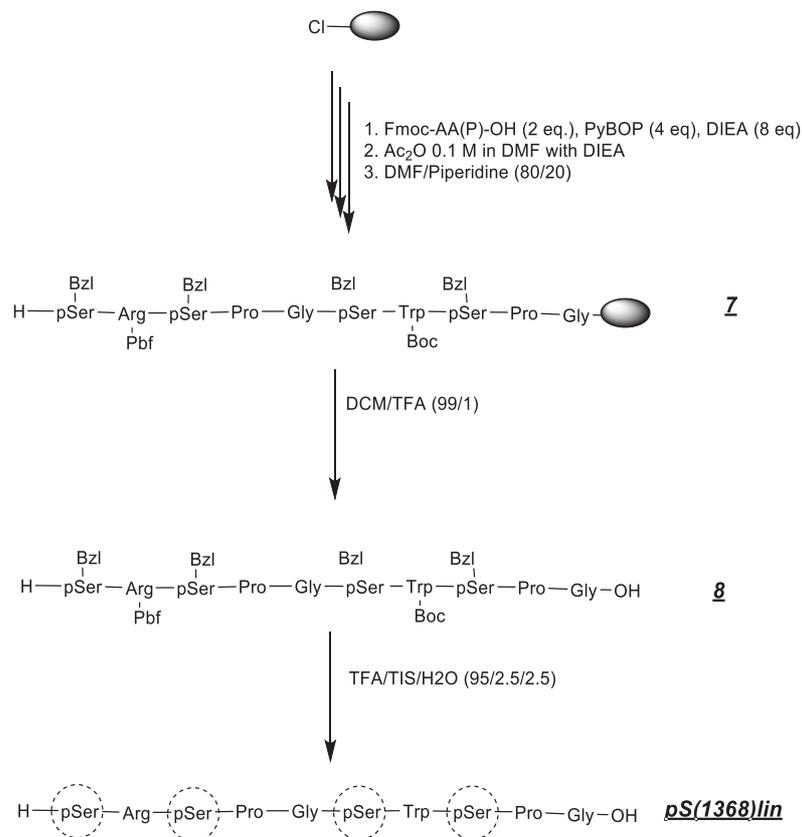


Figure 175 - Synthetic pathway to pS(1368)lin

The linear precursor **Z** was synthesized by N. Sisommay according to SPPS protocol described for monophosphorylated peptides. The peptide was assembled by automated solid-phase peptide synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin (substitution 0.558 mmol.g⁻¹, 457 mg) using Fmoc strategy with a synthesizer (LIBERTY 1-CEM) and microwave activation. After Fmoc titration (Final = 0.145 mmol.g⁻¹, 66 μmol, SPPS yield 26%), the peptide was cleaved from the resin by treatment with a CH₂Cl₂/TFA (99/1, v/v) solution (3x15 mL, 3min), then solvent was evaporated and the residue was precipitated in cold Et₂O to yield the crude compound. Purification was achieved by preparative RP-HPLC (Merck Chromolith®) and compound was obtained as a yellowish solid after lyophilisation (yield 25%, 135.6 mg). Analytical RP-HPLC (Chromolith® column, gradient 50 to 100% B over 15 min): 60% purity, t_R = 3.3 min. (-)ESI-MS calculated for C₈₉H₁₁₆N₁₄O₃₂P₄S: [M-H]⁻ m/z 2047.7 and [M-2H]²⁻ m/z 1023.6, experimental [M-H]⁻ m/z 2047.5 and [M-2H]²⁻ m/z 1023.6

The linear protected peptide **8** (13.6 mg, 6.6 μmol) was treated with 4 mL of a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) solution. After being stirred for 4h30, the solution was evaporated under reduced pressure to

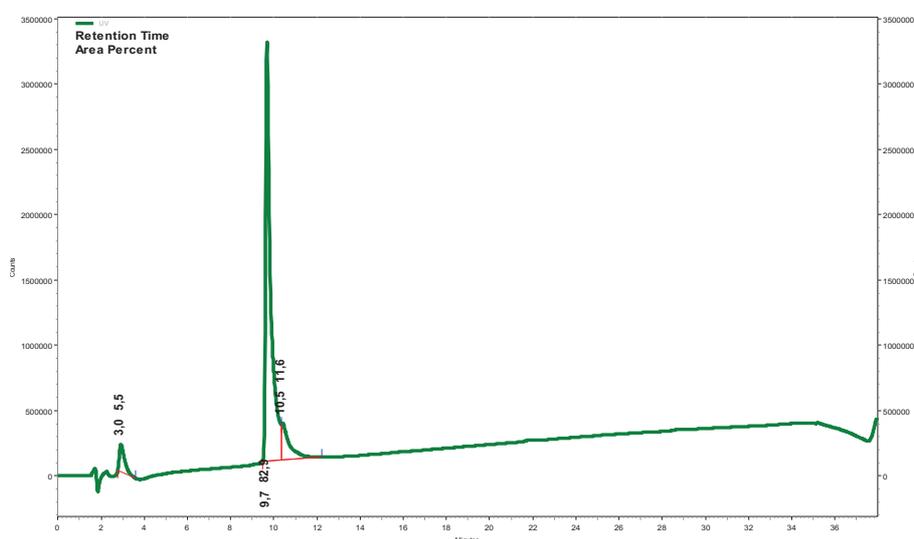
afford a yellow oil, which was precipitated with cold Et₂O to yield the crude compound *ps(1368)lin* as a yellowish solid.

Pure peptide *ps(1368)lin* (1.9 mg, 1.4 μmol) was isolated after preparative RP-HPLC (Merck Chromolith®) as a white solid after lyophilisation (25% yield, 6.5% overall yield).

Analytical RP-HPLC (Chromolith® column, gradient 0 to 60% B over 30 min): 83 % purity, t_R = 9.7 min.

(+)-ESI-MS calculated for C₄₃H₆₈N₁₄O₂₇P₄ [M+H]⁺ m/z 1335.3 [M+2H]²⁺ m/z 667.3, experimental [M+H]⁺ m/z 1335.2 and [M+2H]²⁺ m/z 667.3.

(-)-ESI-MS calculated for C₄₃H₆₈N₁₄O₂₇P₄ [M-H]⁻ m/z 1335.3 and [M-2H]²⁻ m/z 667.2, experimental [M-H]⁻ m/z 1335.2 and [M-2H]²⁻ m/z 667.3



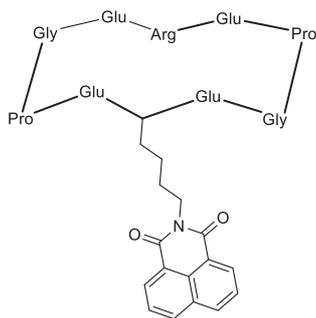
Analysis of *ps(1368)lin* on RP-HPLC

1.5 Cyclodecapeptides bearing unnatural aminoacids

Solvents for high-performance liquid chromatography (HPLC) are A: H₂O/TFA (99.925/0.075, v/v) and B: ACN/H₂O/TFA (90/10/0.1, v/v/v).

1.5.1 A1-Lys(Naph)

This peptide was synthesized by M. Debayle without using microwave activation. The general protocol was adapted from **A1** synthetic protocol described by Lebrun *et al.*¹⁵¹ Modified amino acid Fmoc-Lys(Naph)-OH was inserted manually during SPPS.



A1-Lys(Naph)

A1-Lys(Naph) c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Lys(Naph)-Glu-Pro-Gly)

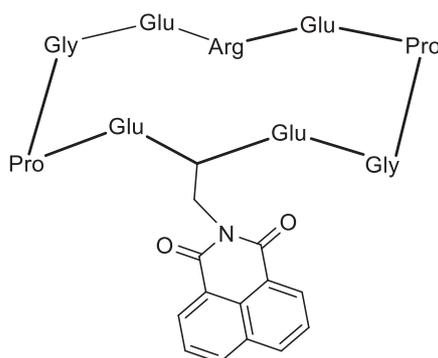
93 mg, overall yield 34%

Analytical HPLC (Chromolith® RP-18 column, gradient 0 to 60% of B in 30 min): Purity = 98 %, $t_R = 18.7$ min

(-)ESI-MS calculated for $C_{58}H_{76}N_{14}O_{20}$ $[M-H]^-$ m/z 1287.5 ; experimental $[M-H]^-$ m/z 1287.6.

1.5.2 A1-Dpr(Naph)

This peptide was synthesized by O. Four Merlin without using microwave activation. The general protocol was adapted from **A1** synthetic protocol described by Lebrun *et al.*¹⁵¹



A1-Dpr(Naph)

A1-Dpr(Naph) c(Glu-Arg-Glu-Pro-Gly-Dpr(Naph)-Glu-Pro-Gly)

9.5 mg, overall yield 7%

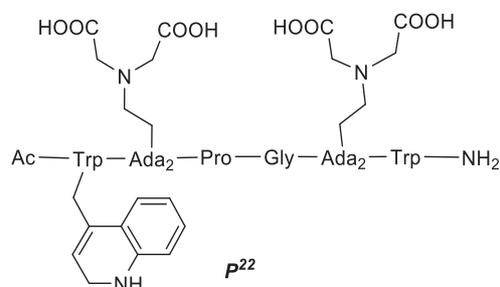
Analytical HPLC (Chromolith® column, gradient 5 to 60% of B in 20 min): Purity = 95 %, $t_R = 15.1$ min

(+)ESI-MS calculated for $C_{55}H_{70}N_{14}O_{20}$ $[M+H]^+$ m/z 1247.5, $[M+2H]^{2+}$ m/z 624.3 ; experimental $[M+H]^+$ m/z 1247.5, $[M+2H]^{2+}$ m/z 624.3.

1.6 Hexapeptides

The hexapeptides *P*²², *NaphP*²² and *PflP*²² were synthesized by F. Cisnetti, A. Botz and L. Ancel, according to protocols described by Cisnetti *et al.* and Ancel *et al.*^{167,171}

1.6.1 *P*²²



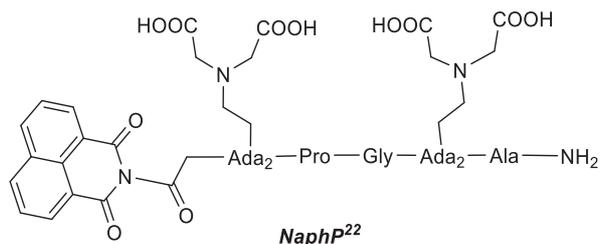
*P*²² Ac-Trp-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Gly-NH₂

58.5 mg, overall yield 48%

Analytical HPLC (Merck Purospher STAR column ; solvent A: H₂O/TFA (99.925/0.075,v/v) ; solvent B: ACN/H₂O/TFA (90/10/0.1, v/v/v) ; gradient of 10 to 40% of A in 15 min, at 1mL.min⁻¹) Purity = 97%, t_R = 10.8 min

(+)-ESI-MS calculated for $C_{38}H_{52}N_{10}O_{15}$ $[M+H]^+$ m/z 889.4 ; experimental $[M+H]^+$ m/z 889.3 ; $[M+2H]^{2+}$ m/z 445.3.

1.6.2 *NaphP*²²



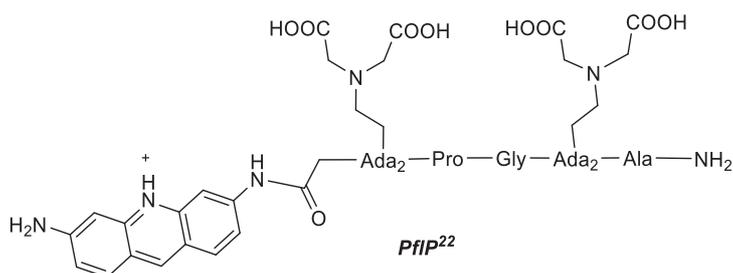
*NaphP*²² Naph-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂

48 mg, overall yield 44%

Analytical HPLC (Chromolith column ; solvent A: H₂O/TFA (99.925/0.075,v/v) ; solvent B: ACN/H₂O/TFA (90/10/0.1, v/v/v) ; gradient of 5 to 100% of B in 15 min, at 1mL.min⁻¹) Purity = 100%, t_R = 7.0 min

(-)-ESI-MS calculated for C₄₀H₄₉N₉O₁₆ [M-H]⁻ m/z 910.3 ; experimental [M-H]⁻ m/z 910.3.

1.6.3 PflP²²



PflP²² Pfl-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂

57.6 mg, overall yield 27%

Analytical HPLC (Chromolith column ; solvent A: H₂O/TFA (99.925/0.075,v/v) ; solvent B: ACN/H₂O/TFA (90/10/0.1, v/v/v) ; gradient of 5 to 100% of B in 15 min, at 1mL.min⁻¹) Purity = 98%, t_R = 6.7 min

(+)-ESI-MS calculated for C₄₁H₅₃N₁₁O₁₄ [M+H]⁺ m/z 924.4 ; experimental [M+H]⁺ m/z 924.3.

2 Metal binding studies

2.1 General information

All aqueous solutions were prepared from ultra-pure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore Milli-Q cartridge system (resistivity 18.2 MΩ.cm at 25 °C). Uranium standard solution was purchased from Spex Certi Prep.

Uranium nitrate salts and uranyl acetate stock solution were provided by Atomic and Alternative Energies Commission (CEA). Bovine fetuin (b-FETUA) was purchased from Sigma Aldrich (F2379) and further purified by C. Vidaud's team (BIAM laboratory, CEA Marcoule) by size exclusion chromatography (TSK SW 3000, 21 x 300 mm) with 50 mM TRIS 150 mM NaCl buffer as mobile phase. D1 and D2 recombinant domains of h-FETUA were expressed, produced and purified by C. Vidaud's team (BIAM laboratory, CEA Marcoule) (see annex 1 for more details).

All pH measurements were registered with a Metrohm pH meter, using a combined macro or micro glass electrode. The electrodes were filled with 3 M KCl aqueous solution and calibrated using a 2 points calibration protocol (pH 4 and pH 7). Macro electrode was used to adjust buffers solutions' pH and micro electrode to adjust peptides solutions' pH in UV cells.

2.2 Preparation of solutions

2.2.1 Uranyl and calcium solutions

A uranyl stock solution (ca 10 mM) was prepared from uranyl nitrate hexahydrate in nitric acid 0.01 M. The precise uranyl concentration was determined by measuring the absorbance of an aliquot compared to an ICP Uranium Standard (1000 µg U /mL in 2% HNO₃) at $\lambda = 415$ nm. This solution was eventually diluted according to the experimental conditions and was used for all experiments but NMR and CD for proteins.

A uranyl/carbonate stock solution (ca 7 mM) was prepared from uranyl acetate (0.1 M, provided by CEA/DEN) in 0.01 M Na₂CO₃ solution. The solution was stored at 4° C and used within a week. This

solution was eventually diluted according to the experimental conditions and used for NMR and CD experiments carried out on proteins.

A CaCl_2 stock solution (ca 1 M) was prepared by dissolving anhydrous calcium chloride salts in ultrapure water.

2.2.2 Buffers

MES buffers (20 mM MES, 100 mM NaCl) were prepared by dissolving solid 2-(*N*-Morpholino)Ethanesulfonic acid and sodium chloride in ultrapure water and by adjusting the pH to 6.0 with KOH.

HEPES buffers (20 mM HEPES, 100 mM NaCl) were prepared by dissolving solid 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and sodium chloride in ultrapure water and by adjusting the pH to 7.0 or 7.4 with KOH.

TRIS buffers (50 mM TRIZMA Base, 0.15 M NaCl) were prepared by dissolving solid 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol and sodium chloride in ultrapure water and by adjusting the pH to 7.4, 8 or 8.5 with HCl.

A stock solution of IDA (ca 100 mM) was prepared by dissolving solid iminodiacetic acid in ultrapure water. Precise concentration was determined by titration with a standard KOH solution (100 mM). Buffer solutions containing IDA were prepared by dilution of IDA solution (100 mM) in freshly made buffer. The pH was controlled and, if required, adjusted to 6.0, 7.0, 7.4, 8.0 or 8.5 with KOH.

2.2.3 Solutions of peptides and proteins

Peptides and proteins solutions were freshly prepared before use and their precise concentration was determined by their absorbance at their λ_{max} .

Parameters used to determine peptides concentrations by UV-titration are:

Tryptophane	$\epsilon = 5690 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	at	$\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$
Naphthalimide	$\epsilon = 10964 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	at	$\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$
Proflavin	$\epsilon = 39200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	at	$\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$

Parameters used to determine proteins concentrations by UV-titration were obtained with ProtParam tool on ExPaSy server :

b-FETUA (MW = 48000 Da)	$\epsilon = 0.41 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	at	$\lambda = 280 \text{ nm}$
D1 (MW = 13360 Da)	$\epsilon = 1.27 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	at	$\lambda = 280 \text{ nm}$
D2 (MW= 12549 Da)	$\epsilon = 0.237 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	at	$\lambda = 280 \text{ nm}$

2.3 ESI-MS experiments

Peptide solutions (ca. 100 μM) were prepared in ammonium acetate buffer (20 mM, pH 7). Aliquots of stock uranyl solution were added in order to prepare samples containing 0.5, 1 and 2 eq. of UO_2^{2+} per peptide. Mass spectra were recorded on a LXQ type THERMO SCIENTIFIC spectrometer equipped with an electrospray ionization source and a linear trap detector. Solutions were injected into the spectrometer at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. Ionization voltage and capillary temperature were about 2 kV and 250 $^\circ\text{C}$, respectively. The source settings were the same (sheath gas, auxiliary gas, capillary voltage and tube lens) for all the samples to get comparable data.

2.4 CD titrations

CD spectra were recorded at 25 $^\circ\text{C}$ and are reported in molar ellipticity ($[\Theta]$ in units of $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). $[\Theta] = \theta_{\text{obs}} / (10 \times l \times c)$, where θ_{obs} is the observed ellipticity in millidegrees, l the optical path length of the cell in centimeters and c the protein or peptide concentration in moles per liter.

2.4.1 Peptides

CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan Spectrometer in a 1 cm path cell. The peptide concentration was about 10 μM in water and the pH was adjusted to 6.0 or 7.0 with KOH. The pH was controlled in a reference cell to avoid Cl^- in the measurement cell since these ions absorb in the far UV-range. Aliquots of 0.25 to 1.0 eq. of uranyl were added. All spectra were obtained from 320 to 190 nm with a 1 nm data interval, a time constant of 2 s and a band width of 1 nm, with 3 scans.

2.4.2 b-FETUA, D1 and D2

For far-UV experiments, the protein solutions (ca. 10-15 μM) were dialyzed over night at 4 °C in a 5 mM Tris 15 mM NaCl, pH 7.4 buffer. For near UV experiments, the protein solutions (ca. 30-50 μM) were prepared in a 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.4 buffer. All the proteins' concentrations were first controlled by measuring their absorbance at 280 nm (aromatic residues). Diluted uranyl/carbonate solutions were prepared in appropriate buffers at least 3 hours before use. Aliquots of 0.25 equivalent of uranyl were added. CD spectra were recorded on a Jasco J-810 CD spectrometer in a 0.1 cm optical path length cell. All the spectra were obtained from 3 scans recorded from 400 to 250 nm (near UV) and from 300 to 190 nm (far UV) at 50 nm/mn with a 0.1 nm data interval, a time constant of 0.25 s and a band width of 1 nm.

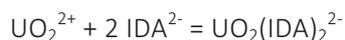
2.5 Fluorescence titrations

Trp, Tyr, Pfl and Naph fluorescence quenching were followed by titration of peptide or protein buffered solutions (ca. 4 to 22 μM) containing 10 equivalents of IDA (ca 40 - 220 μM), with uranyl (from 0 to 4 eq., aliquots 0.1 eq.) or with calcium (from 0 to 10 000 eq., aliquots 500 eq.). The pH was measured at the beginning and at the end of the experiment to check pH stability during the titrations. Spectra were recorded on a LS50B spectrofluorimeter connected to a computer equipped with FLWINLAB 2.0. The measurements were performed at 298 K, in a 1 cm optical path length cell. Tyr and Trp fluorescence titrations were performed with 280 nm excitation (excitation slit: 13 nm) and recorded respectively at 305 and 340 nm. Naph fluorescence titrations were performed with 344 nm excitation (excitation slit: 10-13 nm) and recorded at 380 nm. Pfl fluorescence titrations were performed with 350 nm excitation (excitation slit: 10-13 nm) and recorded at 505 nm. In each case, emission slit was adjusted (3.0-4.0 nm) to avoid signal saturation.

The conditional stability constants were extracted from the spectral data using the SPECFIT software, and taking into account the conditional stability constants of uranyl with the competing agent (IDA). The conditional stability constants of uranyl complexation by iminodiacetic acid (IDA) at pH 6.0, 7.0, 7.4, 8.0 and 8.5 were calculated from published global constants.¹⁸³



$$\log\beta_{11}^{\text{pH } 6} = 6.4 ; \log\beta_{11}^{\text{pH } 7} = 7.4 ; \log\beta_{11}^{\text{pH } 7.4} = 7.8 ; \log\beta_{11}^{\text{pH } 8.0} = 8.4 ; \log\beta_{11}^{\text{pH } 8.5} = 8.8$$



$$\log\beta_{12}^{\text{pH } 6} = 9.4 ; \log\beta_{12}^{\text{pH } 7} = 11.4 ; \log\beta_{12}^{\text{pH } 7.4} = 12.2 ; \log\beta_{12}^{\text{pH } 8} = 13.4 ; \log\beta_{12}^{\text{pH } 8.5} = 14.3$$



$$\log\beta_{22}^{\text{pH } 6} = 15.8 ; \log\beta_{22}^{\text{pH } 7} = 19.8 ; \log\beta_{22}^{\text{pH } 7.4} = 21.4 ; \log\beta_{22}^{\text{pH } 8} = 23.7 ; \log\beta_{22}^{\text{pH } 8.5} = 25.7$$

2.6 Competition experiments followed by fluorescence

2.6.1 Uranyl-calcium competition experiments

Peptide solutions (ca 5 μM) were prepared either at pH 6 (MES 20 mM, NaCl 0.1 M) or at pH 7.4 (HEPES 20 mM, NaCl 0.1 M). The Trp fluorescence was measured upon excitation at 280 nm. The fluorescence signal obtained for the free peptide was normalized to 1. The uranyl complex was formed by adding 2 eq. of the uranyl stock solution. Then aliquots of the calcium stock solution (1 M) were added to obtain samples containing 500, 1 000, 5 000 and 10 000 Ca^{2+} eq. Reverse titrations with addition of a large excess of calcium first, followed by uranyl gave similar results indicating that the thermodynamic equilibrium was reached.

2.6.2 Competition experiments between ligands

NaphP²² and ligand B (peptide or protein) mother solutions of approximately 10 μM were prepared in a HEPES buffered solution adjusted at pH 7.0. Solutions containing both ligands (2 μM each) were prepared by dilution and titrated with uranyl (from 0 to 4 eq., aliquots of 0.1 eq.). The pH of the sample was measured at the beginning and at the end of the experiment to check pH stability during titration.

Spectra were recorded on a Perkin Elmer LS55 Fluorescence Spectrometer with a pulsed xenon lamp and a photomultiplier tube R928 as detector, connected to a computer equipped with FL WinLab 4.0 software. The measurements were performed at 298 K, in a 1 cm optical path length cell. Naph fluorescence titrations were performed with 344 nm excitation (excitation slit: 10 nm) and recorded from 355 to 550 nm. Emission slit was adjusted (2.5 nm) to avoid signal saturation and an emission cut-off filter set at 350 nm was used to avoid second-order diffraction effects. The speedscan was set at 500

nm/min. When possible, Trp fluorescence was followed upon excitation at 280 nm (emission/excitation slits: 4/10 nm) and recorded from 290 to 550 nm (speedscan set at 600 nm/min).

2.7 NMR experiments

In collaboration with B. Brutscher from IBS (Institut de Biologie Structurale, Grenoble).

All NMR experiments were performed on a Bruker 950 MHz spectrometer. Domains' concentration experiments were set at 197 μM for D2 and 21 μM for D1. The buffer used was Tris 20mM, NaCl 25 or 50 mM, adjusted at pH 7.4. 3 to 5% D_2O was added. Uranyl complexes were formed by adding aliquots (1 eq. or 2 eq.) of concentrated uranyl/carbonate stock solution (7 mM) to domains samples. All the spectra were collected at 25 °C. Data were processed with Topspin software.

2.8 CE-ICP-MS experiments

In collaboration with A. Hagège from CNRS-ISA (CNRS - Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne).

Experiments were carried out on a Beckman P/ACE MDQ capillary electrophoresis instrument (CE) controlled by the 32 Karat software. The capillaries were HPC-coated fused-silica capillaries (65 cmx75 μm id, 375 μm od) from Photon Lines (St-Germain-en-Laye, France). An Agilent 7700 ICP/MS equipped with a Micromist micronebulizer was used for the specific detection of uranium species, by monitoring signal at m/z 238 using an integration time of 0.3 s. Operating conditions were the following: nebulizer gas flow rate: 1 L.min⁻¹, plasma gas flow rate: 15 L.min⁻¹, auxiliary gas flow rate: 0.9 L.min⁻¹, and radiofrequency power 1550 W for the plasma.

The hyphenation between CE and ICP/MS was achieved *via* a homemade sheath-flow interface previously described.¹⁸⁴

Background electrolyte (BGE) was 10 mM Tris, 15 mM NaCl, pH 7.4. Protein or domains' solutions (ca. 10 μM) were prepared in the same buffer. Uranyl complexes were formed by adding 0.1 eq. of uranyl (PlasmaCAL 1000 ppm standard solution in 1% HNO_3) in samples.

Samples were hydrodynamically injected (0.5 psi, 5 s) and separations were performed at 25°C, at -30 kV + 0.8 psi for 6 min, followed by a pressure step with 1 mM HNO₃ (5 psi, 3 min) to eliminate uranyl from capillary. Between runs, the capillary was washed with the BGE for several minutes under 5 psi.

ANNEXE 1 – STRATEGIES DE PRODUCTION DES DOMAINES D1 ET D2 DE LA FETUA

Cette annexe renseigne sur les principales optimisations et étapes qui ont permis d'aboutir à la production des domaines D1 et D2 de la h-FETUA sous forme marquée $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. La production de ces domaines a été assurée par M. Robert sous la responsabilité de C. Vidaud. Elle nécessite des compétences en biologie moléculaire, culture cellulaire et biochimie. La production a été assurée en parallèle de mes travaux de thèse aussi n'ai-je pu suivre directement toutes les étapes et optimisations. J'ai cependant été amenée à comprendre le cheminement et les difficultés qui ont été rencontrés et j'ai également pu réaliser la purification du domaine D2.

La production de protéines sous leur forme recombinante est réalisée à l'aide d'un système vecteur-hôte pour lequel il est nécessaire de disposer (i) de la séquence ADN linéaire codant pour la protéine en question et (ii) d'un hôte dans lequel on peut insérer le vecteur d'ADN recombinant. L'hôte surexprime la protéine qui est ensuite extraite et purifiée avant d'être caractérisée (figure 176).

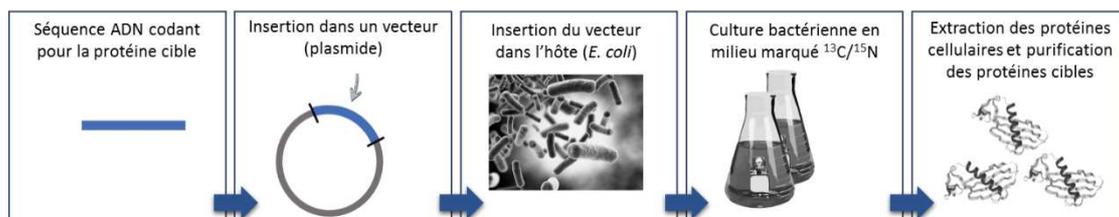


Figure 176 – Schéma simplifié des étapes de production d'une protéine sous forme recombinante.

Systèmes vecteur-hôte

Choix de l'hôte

L'hôte choisi pour la production des domaines D1 et D2 sous leur forme recombinante est la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), un organisme procaryote. Les cellules procaryotes n'ont pas de noyaux. De ce fait, la réplication, la transcription et la traduction de l'ADN se fait directement dans leur cytoplasme ce qui facilite la production par rapport à un système eucaryote plus complexe. *E. coli* permet d'obtenir de meilleurs rendements (environ 10 g/L contre 10 mg/L avec un système eucaryote) et a l'avantage d'être moins onéreuse. Très étudiée depuis les années 60, sa génétique est très bien connue et il existe aujourd'hui de nombreux outils de clonage commercialisés. *E. coli* a une grande vitesse de croissance (temps de doublement : minutes) et est facile à manipuler. La bactérie *E. coli* a cependant un faible potentiel de sécrétion et n'assure pas les modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations,...). Ce dernier n'était toutefois pas un objectif pour notre étude.

Plasmides recombinants

Les plasmides sont des vecteurs permettant d'introduire de l'information génétique dans un organisme hôte. L'objectif est d'introduire la séquence ADN linéaire codant pour la protéine dans les cellules bactériennes *E. coli*. Pour cela, le fragment d'ADN est introduit dans un plasmide dit « recombinant ». Ce plasmide est une molécule d'ADN circulaire distincte de l'ADN chromosomique de la bactérie. Il permet d'assurer le maintien du fragment d'ADN d'intérêt dans la cellule hôte, de génération en génération, au cours des divisions cellulaires. Il est capable de répllication autonome et n'est pas essentiel à la survie de la cellule. Lors de la répllication, le vecteur fonctionne comme un leurre, et l'organisme hôte duplique son propre ADN et le fragment d'ADN porté par le plasmide recombinant. De façon à contrôler la production, à favoriser le repliement et à faciliter la purification des protéines recombinantes, les plasmides sont munis de diverses étiquettes ou « tags » (figure 177).

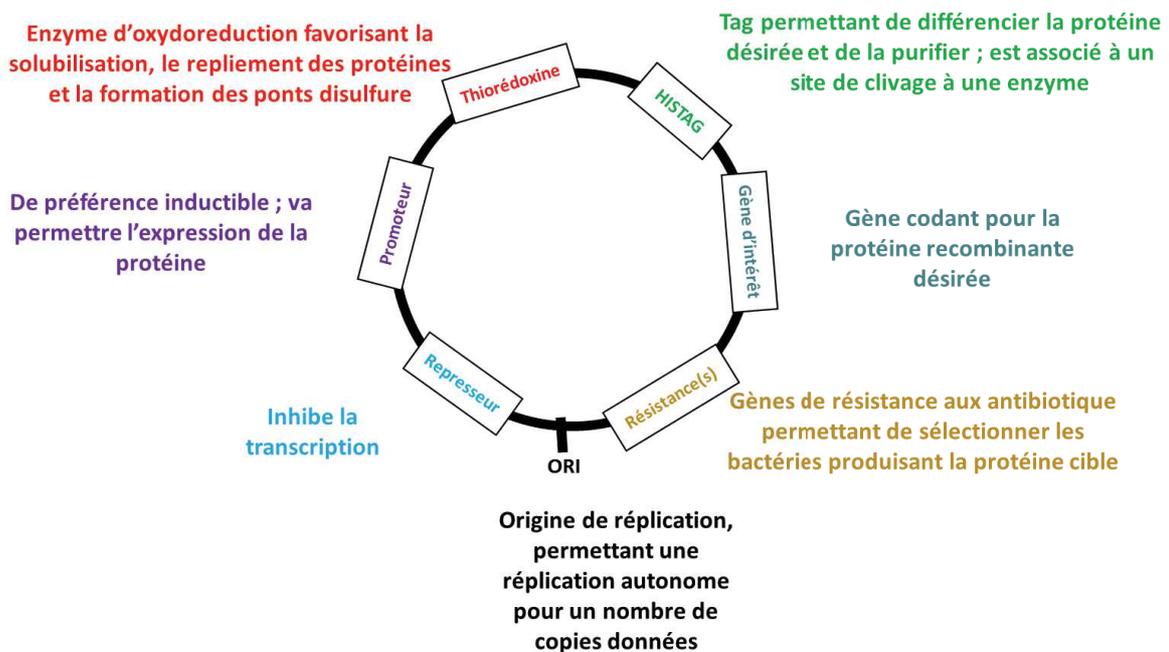


Figure 177 - Schéma simplifié d'un vecteur pET32 doté de tags et étiquettes permettant d'assurer la copie du gène d'intérêt

Systèmes vecteurs-hôtes sélectionnés pour D1 et D2

Les protéines recombinantes D1 et D2 ont été produites à partir de divers plasmides recombinants. Le tableau 20 renseigne les particularités des plasmides codant pour les protéines D1 et D2 qui ont été testés ainsi que les lignées cellulaires compétentes associées à ces plasmides.

Tableau 20 - Plasmides recombinants testés pour la production de D1 et D2 sous forme marquée

	Plasmide	Adressage	Étiquette pour purification	Souche <i>E. coli</i>
D2	pET32	cytoplasmique	HISTAG-thioredoxine en N-ter	BL21 (DE3)
	pET28	cytoplasmique	HISTAG-thioredoxine en C-ter	BL21 (DE3)
D1	pET32	cytoplasmique	HISTAG-thioredoxine en N-ter	BL21 (DE3) & ORIGAMI
	pET28	cytoplasmique	HISTAG- thioredoxine en C-ter	BL21 (DE3)
	pET22b	périplasmique	HISTAG en N-ter	BL21 (DE3)
	pGKJE8	cytoplasmique	HISTAG en N-ter	BL21 (DE3)

La différence entre les différents vecteurs de type pET (Plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) utilisés concerne la position du tag de purification. Une étiquette poly-histidine (ou tag 6-His) est un motif d'acides aminés dans une protéine constitué d'au moins six résidus histidine, souvent insérée à l'extrémité N-terminale (pET32) ou C-terminale (pET28) de la protéine dénotée His-Tag. Les différents plasmides encodent une séquence 6-His permettant la purification du domaine après extraction des cellules par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé, les groupements histidines étant des chélateurs du nickel.

La protéine D1 a nécessité plus de mises au point pour réaliser sa production. Elle a été obtenue sous forme de corps d'inclusions à l'aide des vecteurs pET28 et pET32. Les corps d'inclusion sont des amas très denses de la protéine, sous forme agrégée et donc insoluble, qui sont formés dans le cytoplasme lors de l'expression de la protéine par le microorganisme hôte. Ce phénomène est fréquent lors de production de protéines recombinantes chez *E. coli*. Cette forme nécessite une solubilisation qui entraîne une perte totale de la structure de la protéine, ce qui implique de mettre au point une phase de repliement indispensable pour obtenir une protéine correctement structurée. Diverses stratégies ont donc été développées pour favoriser l'expression de la protéine sous une forme soluble et avec un repliement correct.

- i. *Utilisation de la souche ORIGAMI* : la souche *E. coli* dite ORIGAMI est une souche de cellules au cytoplasme plus oxydant qui favorise la formation de ponts disulfure.
- ii. *Optimisation du milieu de culture et variation de la température d'induction.*
- iii. *Adressage spécifique de la protéine vers le périplasma (vecteur pET22b)* : contrairement au cytoplasme, le périplasma est un milieu plus oxydant que le cytoplasme et favorable à la formation de ponts disulfures. Une séquence signal spécifique permet d'exporter la protéine dans le périplasma de la bactérie. Les cystéines sont maintenues sous une forme réduite durant leur transport par les thiorédoxines et les glutarédoxines cytoplasmiques. Une fois dans le périplasma, certaines protéines d'*E. coli* vont aider la protéine recombinante à adopter sa conformation native en catalysant la formation de ponts disulfures. L'expression dans le

périplasme est relativement faible chez *E. coli*. Par ailleurs, dans certains cas la protéine peut aussi s'accumuler dans l'espace périplasmique sous forme de corps d'inclusion.

- iv. *Co-expression de protéines chaperonnes (vecteur pGKJE8, PDI « protein disulfide isomerase »)* : les chaperonnes ont pour fonction d'assister d'autres protéines pour leur assurer un repliement correct. Dans le cadre de la production de protéines recombinantes, elles améliorent la solubilité des protéines produites et aident à catalyser leur repliement, notamment grâce à une activité oxydo-réductrice favorisant la formation de ponts disulfures.

Localisation des protéines D1 et D2

L'ensemble des résultats obtenus au cours des diverses tentatives de production sont résumées dans le tableau 21 ci-après.

Tableau 21 – Résultats obtenus pour les productions de D1 et D2 à partir de diverses stratégies.

	Plasmide	Adressage	Localisation	Remarque
D2	D2pET32	Cytoplasme	Fraction soluble	Prête à être purifiée telle quelle
D2	D2pET28	Cytoplasme	Fraction soluble	Prête à être purifiée telle quelle
D1	D1pET32	Cytoplasme	Corps d'inclusion	Nécessité de solubiliser les corps d'inclusion avant purification
D1	D1pET28	Cytoplasme	Corps d'inclusion	Nécessité de solubiliser les corps d'inclusion avant purification
D1	D1pET22b	Périplasme	Fraction soluble	Faibles quantités produites (environ 100 µg/L de culture) - Non adapté à la quantité nécessaire aux études RMN
D1	D1pGKJE8	Cytoplasme et coexpression avec métallochaperonnes	Corps d'inclusion	Peu de surexpression + Nécessité de solubiliser les corps d'inclusion avant purification

La production de D2 sous forme recombinante à partir du plasmide pET32 s'est avérée relativement aisée en comparaison des nombreuses difficultés rencontrées lors de la production de D1 à partir des différents plasmides présentés en section précédente. En effet, que ce soit à partir du plasmide pET32 ou pET28, le domaine D2 a été systématiquement localisé dans la fraction soluble des culots cellulaires. Le domaine est donc isolé dans le surnageant puis est ensuite purifié.

Le domaine D1 n'a été obtenu que sous la forme de corps d'inclusion, sauf lors d'une expression à partir du plasmide pET22b avec adressage périplasmique. Malheureusement, comme nous l'avons vu en section 2.2.5, les quantités à produire pour l'application visée sont considérables et la production périplasmique de D1 nécessiterait environ 100 litres de milieu de culture, hors échelle d'un laboratoire.

La voie d'obtention de D1 *via* les corps d'inclusion a de ce fait été choisie par défaut. Des corps d'inclusions ont été produits à partir de la voie utilisant le plasmide pET32 et solubilisés avant purification de D1 suivie d'une étape de refolding.

Conditions de production et passage au milieu minimum $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$

Une fois déterminé le processus de production de chacun des domaines, les plasmides recombinants D1pET32 et D2pET32 choisis ont été insérés dans la bactérie hôte à l'aide d'un choc thermique. Les bactéries ont été cultivées en milieu nutritif *lysogeny broth* (LB) supplémenté des antibiotiques (ampicilline) nécessaires à la sélection des bactéries porteuses des gènes de résistance. En fin de phase d'expansion des bactéries, la transcription de la protéine d'intérêt est activée par ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), un analogue de l'allolactose non métabolisable par la bactérie et qui permet d'induire l'expression de la protéine d'intérêt. De même, diverses optimisations des conditions d'induction les plus adéquates (température, période d'induction) ont été assurées afin d'assurer la meilleure productivité de D1 et D2. A l'issue des différentes cultures, les cellules sont collectées et le culot cellulaire obtenu est remis en suspensions dans le tampon de lyse (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4 filtré 0,22 μm) en présence d'imidazole (5 mM) pour D1 et D2 et également d'agents dénaturants pour D1. Les cellules sont ensuite lysées par disruption (dislocation mécanique, différence de pression 1000 bar) en présence d'inhibiteurs de protéases afin d'éviter la dégradation des protéines. Les fractions soluble et insoluble (corps d'inclusion) obtenues sont alors séparées par centrifugation (16 000 g, 30 min). Après centrifugation D2 est isolé dans le surnageant (fraction soluble) alors que D1 est récupéré dans les corps d'inclusions (fraction insoluble). Les protocoles de purification qui sont présentés par la suite ont été optimisés à partir des cultures réalisées en milieu classique LB.

Rendements de production en milieu marqué $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$

Pour assurer la production des domaines sous forme marquée, les sources carbonées et azotées nécessaires à la croissance de la bactérie et à son métabolisme doivent provenir uniquement du glucose ^{13}C et du chlorure d'ammonium ^{15}N . Les bactéries sont au préalable cultivées en milieu « minimum » non marqué afin de permettre leur adaptation à ce milieu restrictif (diminution de la croissance cellulaire et perte de rendement). Pour les deux domaines, les pertes en rendements sont restées conformes à la moyenne attendue (tableau 22). Le passage au milieu marqué n'induit pas davantage de modification : les conditions de purification optimisées à partir de protéines non marquées peuvent être

appliquées aux domaines marqués et l'ensemble des contrôles au cours des purifications sont effectués de façon identique.

Tableau 22 – Rendements de production lors du passage au milieu minimum marqué $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$

	Milieu classique	Milieu minimum $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$	Rendement
D1 pET32	6,25 g/L	2,0 g/L	32%
D2 pET32	8,25 g/L	2,9 g/L	35%

Stratégies de purification des domaines

Rappel des contraintes imposées par la RMN

Les études RMN nécessitent de travailler dans certaines conditions. Tout d'abord, D1 et D2 doivent être obtenus avec un très haut degré de pureté (> 95%). Ils doivent également être obtenus en quantités importantes (600 μL à environ 200 μM) et doivent présenter la structure de type cystatine attendue. L'étape de purification est donc cruciale car elle doit mener à l'obtention de chaque domaine pur, correctement replié et dans des concentrations élevées. Pour atteindre ces objectifs, M. Robert a optimisé chacune des étapes du protocole de purification. J'ai participé à la purification du domaine D2 et les étapes de sa purification sont ici plus détaillées.

Généralités

Les purifications ont été effectuées sur des appareils Akta Purifier 10 (GE Health Care Life Sciences). Les chromatographies ont été suivies par mesure du signal d'absorbance en UV à 260 nm et 280 nm. Tous les tampons utilisés sont fraîchement préparés, filtrés et dégazés avant toute utilisation. L'ensemble des étapes de purification des domaines sont synthétisées en un schéma. Les étapes, après optimisation, requièrent une semaine de travail.

Purification du domaine D2

La purification du domaine D2 a été plus aisée car après lyse cellulaire la protéine est directement localisée dans la fraction soluble des protéines. La figure 178 schématise l'ensemble des étapes nécessaires à l'obtention du domaine D2 sous forme pure.

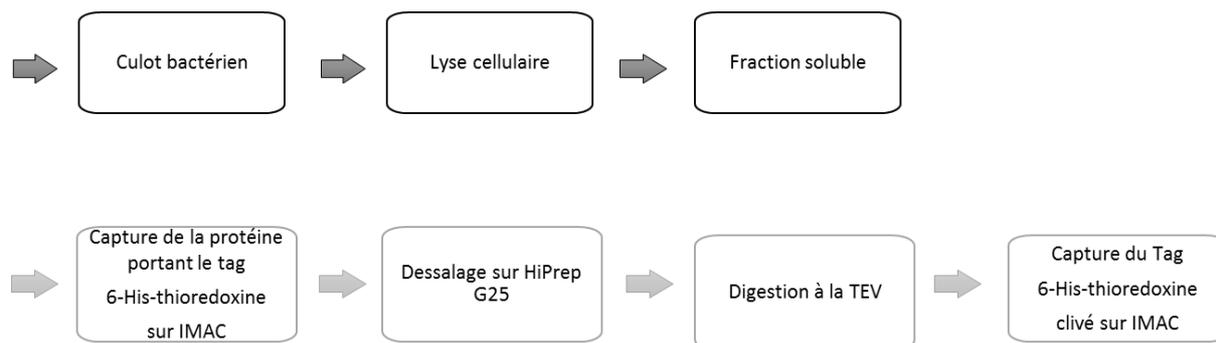


Figure 178 – Etapes d’extraction et de purification de la protéine D2 à partir de son expression chez *E. coli* par le plasmide recombinant pET32

Capture de la protéine portant le tag 6-His sur IMAC et élimination des protéines non taggées

La fraction des protéines solubles est tout d’abord injectée à faible débit (0,5 mL.min⁻¹) sur une colonne de chromatographie de type IMAC (colonne HisTrap, Ni-Sepharose, 1 mL, GE Health Care Life Sciences). L’étiquette 6-His-thioredoxine fusionnée à l’extrémité N-terminale de la protéine D2 facilite sa purification par sa capture sélective sur cette phase stationnaire où le nickel est immobilisé : ainsi la protéine d’intérêt peut être séparée de celles qui ne portent pas le tag (figure 179).

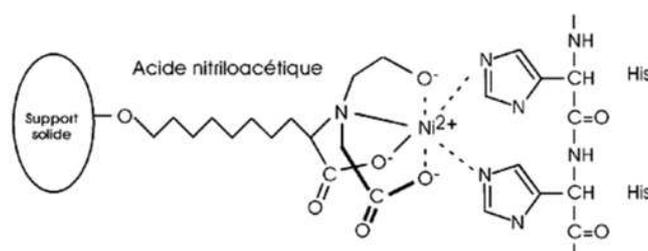


Figure 179 - Rétention du TAG 6-His par chromatographie d’affinité avec immobilisation d’ions métalliques (IMAC). Le nickel (II) interagit avec l’histidine et retient la protéine via son étiquette.

L’élution des protéines se fait par ajout en concentrations croissantes d’imidazole (0 à 500 mM), un compétiteur fort des histidines pour le métal immobilisé. Les protéines retenues de façon non spécifique sur la phase stationnaire sont éluées à l’aide de faibles concentrations d’imidazole (50 mM) tandis que la protéine d’intérêt, liée plus fortement *via* les interactions ioniques entre les six résidus histidine et les ions nickel de la résine, nécessite des concentrations plus élevées en imidazole (300 mM) pour être éluée de la colonne (figure 180).

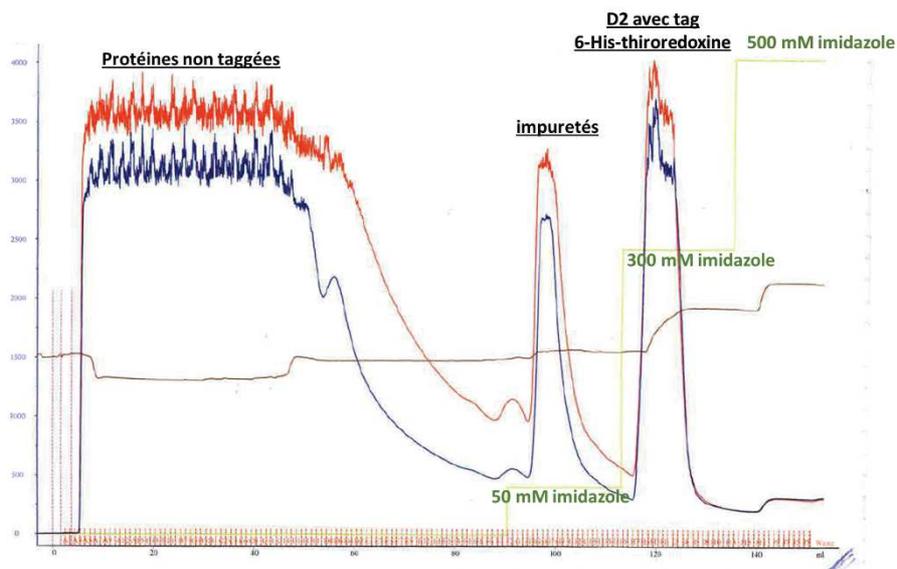


Figure 180 - Chromatogramme de D2 ave tag 6-His sur IMAC avec suivi UV à 280 nm

Les fractions éluées sont collectées et contrôlées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Les fractions contenant le domaine D2 sont alors regroupées (figure 181).

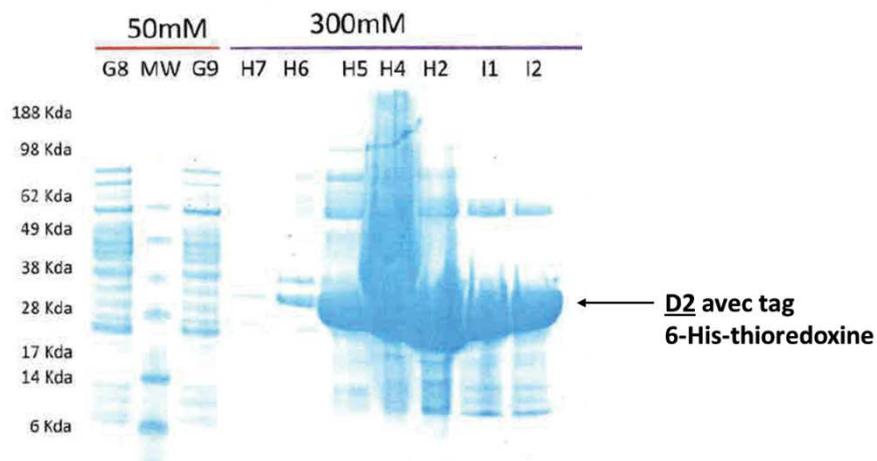


Figure 181 - Gel SDS-PAGE des fractions éluées post IMAC

Dessalage sur HiPrep et élimination de l'imidazole

L'imidazole qui a servi à éluer la protéine est éliminé par une étape de dessalage sur colonne en HPLC préparative (colonne HiPrep Desalting, 100x26 i.d. mm, 53 mL, GE Health Care Life Sciences ; tampon 50 mM tris, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8,0). Le chromatogramme obtenu est présenté en figure 182.

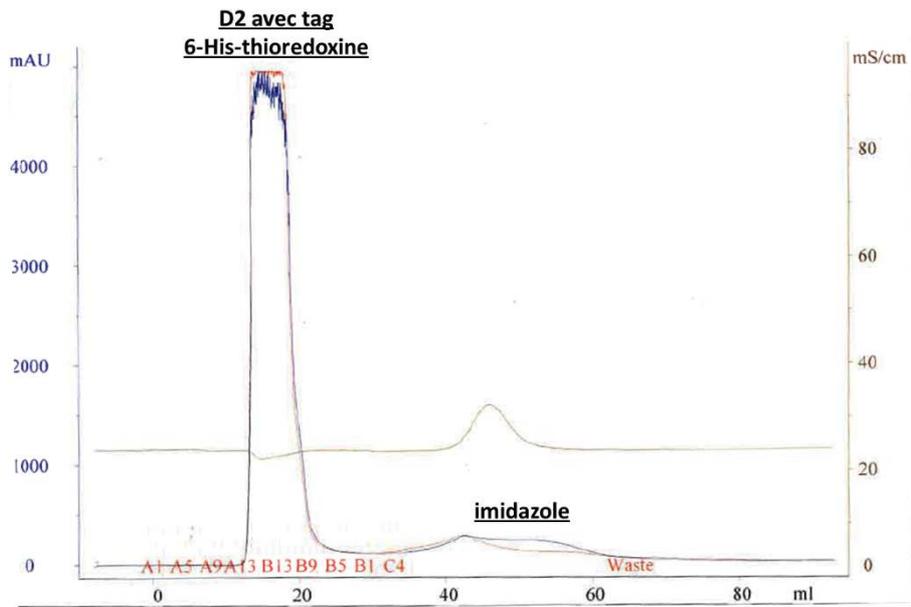


Figure 182 - Chromatogramme de D2 sur colonne HiPrep desalting avec suivi UV à 280 nm

Digestion à la TEV et clivage du tag 6-His

La protéine D2 est ensuite soumise à l'action d'une enzyme spécifique provenant d'un virus de la mosaïque du tabac (TEV ou *Tobacco Etch Virus*, 1 µl de TEV/40 µg de protéine avec incubation sur la nuit à 4°C) qui permet de séparer spécifiquement le tag 6-His-thioredoxine du domaine D2 via un site de clivage spécifique qui les sépare. La figure 183 présente les analyses SDS-PAGE en conditions dénaturantes de l'échantillon obtenu. Les bandes correspondant au tag 6-His et à D2 privé du tag sont présentes dans l'échantillon.

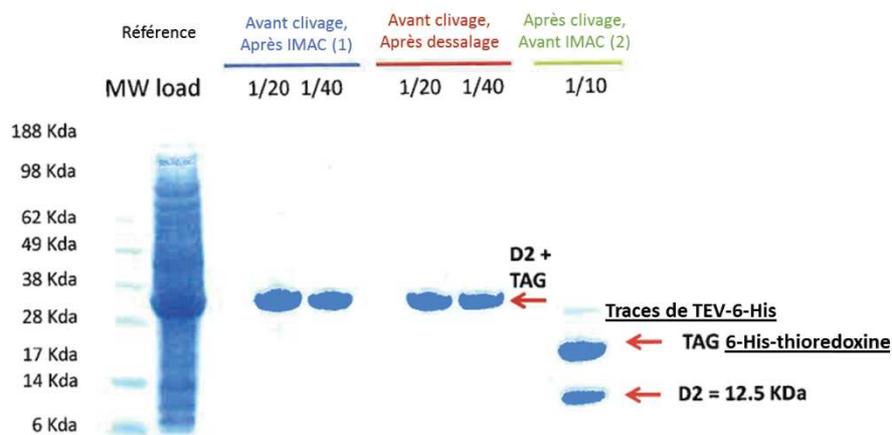


Figure 183 - Gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes des fractions éluées post IMAC (D2 avec tag 6-His-thioredoxine) et post HiPrep ainsi qu'après clivage à la TEV (D2 et tag 6-His-thioredoxine clivé).

Capture du tag 6-His sur IMAC et récupération de la protéine pure

Une deuxième étape de purification par chromatographie d'affinité IMAC (colonne HisTrap, Ni-Sepharose, 1 mL, GE Health Care Life Sciences) permet de retenir l'étiquette 6-His-thioredoxine clivée de la protéine et la TEV-6-His. La protéine ne portant plus l'étiquette 6-His-thioredoxine est immédiatement éluée dans les premières fractions puisqu'elle n'est pas retenue sur la colonne (figure 184). A nouveau, les fractions éluées sont contrôlées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et par chromatographie d'exclusion stérique (SEC, « *size-exclusion chromatography* »). Les fractions ne contenant que la protéine D2 purifiée sont rassemblées. Une illustration de l'analyse de ces fractions est donnée en figure 185. En fin d'étape, la protéine D2 présente les critères de pureté attendus.

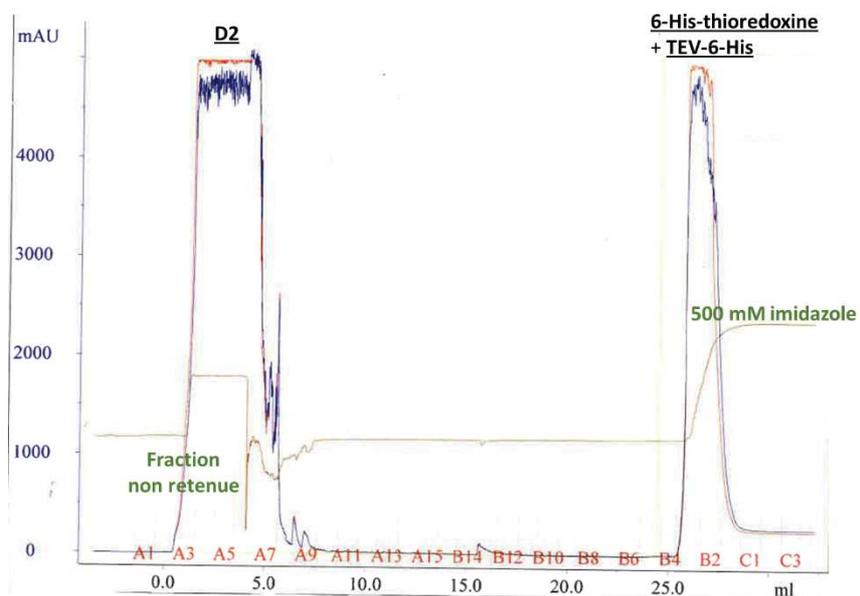


Figure 184 - Chromatogramme de D2 sur IMAC après clivage à la TEV du tag 6-His-thioredoxine avec suivi UV à 280 nm.

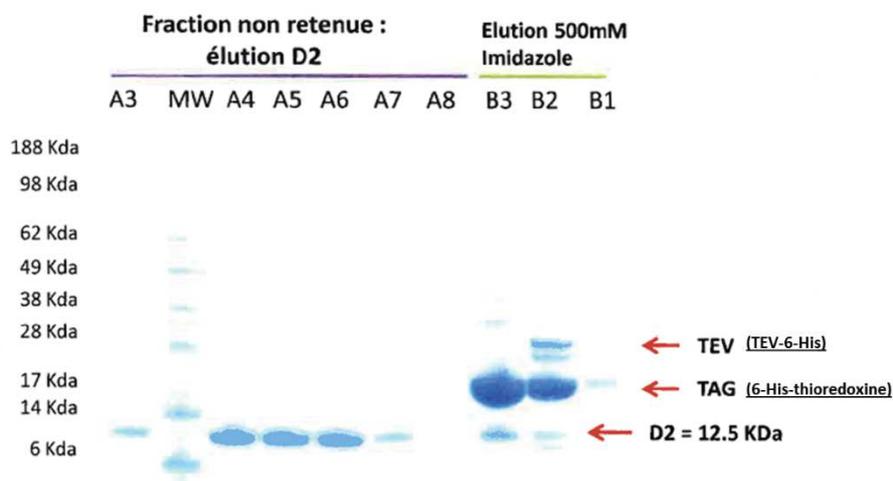


Figure 185 - Gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes des fractions éluées post IMAC (D2 sans tag 6-His).

Conditionnement et sélection de population par SEC et concentration des échantillons

Une dernière étape de chromatographie par exclusion stérique (colonne TSK gel® G3000SW, 300 x 21,5 mm) permet de sélectionner la population de protéine D2 la plus homogène possible et de la conditionner en tampon recommandé pour des études par RMN (tampon 50 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7,4, supplémenté de 0,05% d'azoture de sodium à la fonction bactériostatique). Le chromatogramme obtenu est présentée en figure 186.

La réduction du volume et la concentration de l'échantillon sont effectuées par centrifugation sur concentrateurs (4000g à 4°C, sur Amicon Ultra 15, cut-off 3000 Da). Le domaine D2 est obtenu avec une concentration finale de 197 µM.

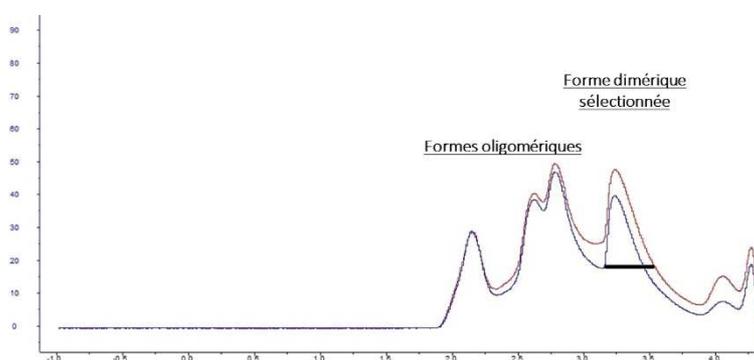


Figure 186 - Chromatogramme de D2 par SEC avec suivi UV à 280 nm. La forme sélectionnée est indiquée à l'aide d'une barre noire.

Purification du domaine D1

Je n'ai pas participé à la purification du domaine D1. Les étapes de purification de D1 sont similaires à celles utilisées pour la protéine D2 (figure 187) avec deux étapes complémentaires de solubilisation et repliement.

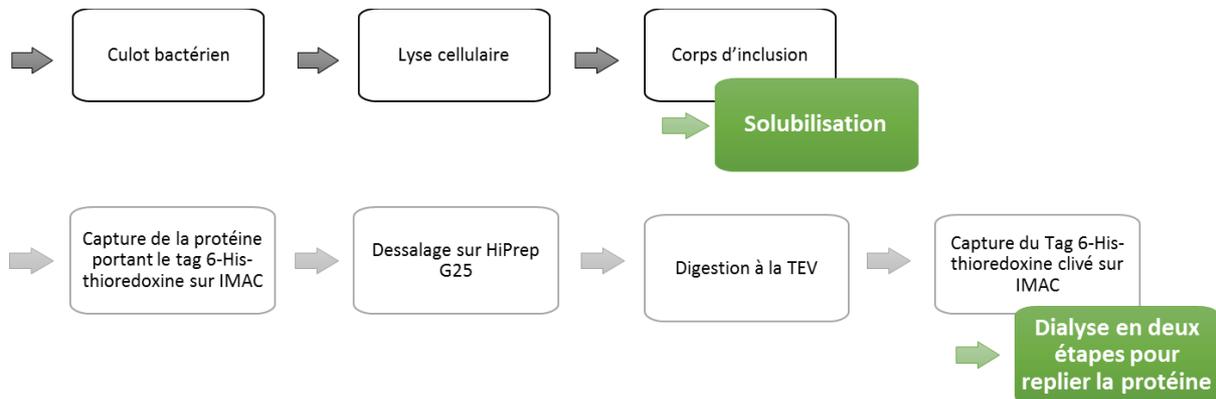


Figure 187 - Etapes d'extraction et de purification de la protéine D1 à partir des corps d'inclusion obtenus lors de son expression chez *E. coli* par le plasmide recombinant pET32.

Isolement et solubilisation des corps d'inclusion

Les corps d'inclusion sont facilement isolés par centrifugation après la lyse des bactéries. Ils sont ensuite lavés par reprises et incubations de 30 minutes à 4°C successivement dans deux tampons (Tris 25 mM, NaCl 2 M, DTT 1 mM pH 8,0 puis Tris 25 mM, DTT 1 mM, pH 8,0) suivis de centrifugations (16 000 g, 30 min). L'étape de solubilisation est critique et la démarche pour déterminer les conditions de solubilisation les plus douces est relativement empirique. Elle nécessite l'utilisation d'agents dénaturants, seuls ou en combinaisons, tels que le di-thio-thréitol (DTT) qui est un agent réducteur des ponts disulfures, un agent chaotropique comme l'urée ou le chlorure de guanidine qui va détruire la structure spatiale de la protéine et un détergent comme le Triton qui va favoriser la solubilisation de la protéine. La renaturation *in vitro* est plus facile lorsque la protéine n'est que partiellement dénaturée c'est pourquoi un processus d'optimisation est mené afin de déterminer la concentration minimale nécessaire à la solubilisation de l'agrégat protéique de D1. L'essentiel des conditions testées est synthétisé dans le tableau 23. Les conditions de dénaturation finalement retenues sont les suivantes : urée 2M et DTT 1mM en tampon Tris 25 mM et à pH 8,0.

Tableau 23 - Tests de solubilisation de la protéine D1. Les conditions de solubilisation retenues sont encadrées en rouge.

Corps d'inclusion	Tampon testé
Uniquement pET32 D1	Tris 25mM, DTT 1mM, Urée 2M, Triton 1%, pH8
	Glycine 25mM, DTT 1mM, Urée 2M, Triton 1%, pH10
pET32 D1, pET28 D1	Tris 25mM, DTT 1mM, Urée 2M, pH8
	Tris 25mM, DTT 1mM, Urée 4M, pH8
	Tris 25mM, DTT 1mM, Urée 6M, pH8
	Tris 25mM, DTT 1mM, Urée 8M, pH8
	Glycine 25mM, DTT 1mM, Urée 2M, pH10
	Glycine 25mM, DTT 1mM, Urée 4M, pH10
	Glycine 25mM, DTT 1mM, Urée 6M, pH10
	Glycine 25mM, DTT 1mM, Urée 8M, pH10

Purification en conditions dénaturantes

Les étapes de chromatographies de D1 sont similaires à celles de D2 mais sont réalisées en conditions dénaturantes. Le tampon de la première IMAC est constitué de 25 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 2 M urée et 1 mM DTT (pH 7,4). Le tampon de digestion par la TEV contient 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT et 1 M urée (pH 8,0). La quantité de TEV nécessaire au clivage du tag 6-His-thioredoxine a été adaptée pour conserver son efficacité en présence d'une telle quantité d'urée

Repliement de la protéine post-purification

A l'issue de chromatographies successives, la protéine D1 est dialysée lentement en deux étapes de façon à assurer un repliement correct de la protéine. Le premier tampon de dialyse est constitué de 50 mM Tris 150 mM NaCl, 0,5 M Arginine et 1 mM DTT (pH 7,4) et permet d'éliminer l'urée. Le second tampon est constitué de 50 mM Tris, 150 mM NaCl et 0,5 M arginine (pH 7,4) et permet d'éliminer le DTT.

Conditionnement et sélection de population par SEC

De même que pour D2 une dernière étape de chromatographie par SEC (colonne TSK gel® G3000SW, 300x21,5 i.d. mm) est réalisée pour sélectionner la population homogène de D1 et pour conditionner la protéine dans un tampon adéquat pour les futures études RMN (50 mM tris, 25 mM NaCl, pH 7,4 additionné d'azote de sodium à 0,05%). La concentration de D1 par centrifugation n'est pas réalisée car elle mène à l'agrégation de la protéine. L'échantillon final de D1 a donc une concentration de 28 µM.

ANNEXE 2 - DESCRIPTION DES OUTILS BIOINFORMATIQUES

LAlign

L'outil LAlign permet un alignement séquentiel de protéines à la recherche de similitudes et d'identités. Cet outil est basé sur un algorithme développé en 1991 par Huang et Miller.¹²⁵ Il existe deux types principaux de matrices : PAM (*Point Accepted Mutation*, développées par Dayhoff *et al.*), et BLOSUM (*Block SUBstitution Matrix*, développées par Henikoff et Henikoff.¹⁸⁵ L'utilisation de l'une ou l'autre de ces matrices dépend de la divergence existant entre les séquences. Les matrices BLOSUM sont les plus récentes et permettent un alignement local. Elles prennent en considération l'évolution des séquences dans le temps et acceptent des écarts et sauts de séquences. Ces matrices sont particulièrement efficaces pour des séquences divergentes. L'outil permet de définir pour l'alignement de segments de tailles variées les pourcentages d'identité et de similitude.

PSI-PRED

Le fonctionnement de cet outil repose sur l'algorithme PSI-BLAST (*Position Specific Iterative - Basic Local Alignment Search Tool*) développé par Altschul *et al.* pour comparer deux séquences de protéines entre elles par alignement local à la recherche de similitudes.¹⁸⁶ De façon simplifiée, le principe de fonctionnement de BLAST se décompose en trois étapes. La séquence du domaine est découpée en segments de k résidus se chevauchant et, pour chaque segment, une homologie de séquence est recherchée à partir de la base de données non redondante. Pour chaque entrée de la base de données, l'outil BLAST tente d'identifier une séquence homologue au segment de k résidus. Si tel est le cas, alors l'algorithme étend la recherche d'homologie en amont et en aval du segment. Enfin, l'algorithme évalue la probabilité de l'alignement proposé. Pour le serveur PSI-PRED ce sont 15 résidus qui sont alignés (k = 15). Un profil prédictif des structures secondaires de la protéine est généré à l'aide de cet outil.

Swiss-Model

L'outil Swiss-Model permet de prédire la structure d'une protéine en se basant sur un découpage de la protéine en des régions conservées et des régions variables qui sont modélisées séparément.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Premièrement, les fragments de structure conservée (hélices α et feuillets β) sont identifiés à partir d'une base de donnée (*SWISS-MODEL Template Library*) via des outils comme les BLAST par exemple, et permettent de construire le cœur du modèle. Vient ensuite la modélisation des régions moins structurées (boucles). Suite au positionnement du squelette, le positionnement des chaînes latérales est effectué en recherchant la conformation la plus probable pour chaque chaîne latérale (structures homologues, critères énergétiques...). Enfin il y a minimisation énergétique de l'ensemble de la structure.

Interalign

Le logiciel INTERALIGN a été employé pour superposer les deux structures prédites par SWISS-MODEL. Cet outil a été développé par Pible, Imbert et Pellequer. Il permet notamment d'évaluer la justesse de superposition entre deux structures en minimisant le RMSD (Root-Mean-Square Deviation).¹⁴¹ Le processus admet les sauts de séquences.

REFERENCES

1. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**, 823–830 (2009).
2. *Uranium 2016 : Resources, Production and Demand*. (A Joint Report by the Nuclear Energy Agency and the International Atomic Energy Agency, 2016).
3. Cadmium. Available at: <http://www.societechimiquedefrance.fr/extras/Donnees/metaux/cd/texcd.htm#Productions>. (Accessed: 21st July 2017)
4. Plomb-96. Available at: <http://www.societechimiquedefrance.fr/extras/Donnees/metaux/pb/texpb.htm>. (Accessed: 21st July 2017)
5. MÉNAGER, GARNIER-LAPLAU & GAYFFON. *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*. (Lavoisier, 2009).
6. ATSDR - Toxicological Profile: Uranium.
7. Basset, C. *et al.* Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target? *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 645–653 (2013).
8. Qi, L. *et al.* Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics* **6**, 166–176 (2014).
9. Maher, K., Bargar, J. R. & Brown, G. E. Environmental Speciation of Actinides. *Inorg. Chem.* **52**, 3510–3532 (2013).
10. Garnier–Laplace, J., Colle, C. & Morello, M. *Uranium naturel et environnement*. (IRSN, 2001).
11. Vidaud, C., Bourgeois, D. & Meyer, D. Bone as Target Organ for Metals: The Case of f-Elements. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1161–1175 (2012).
12. Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *J. Chem. Educ.* **45**, 581 (1968).
13. Van Horn, J. D. & Huang, H. Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 765–775 (2006).
14. Bourdon, B. *Méthodes de datation radiométrique*. (2003).
15. Site internet AREVA. Available at: <http://www.areva.com/>. (Accessed: 18th April 2017)
16. Betti, M. Civil use of depleted uranium. *J. Environ. Radioact.* **64**, 113–119 (2003).
17. Bleise, A., Danesi, P. R. & Burkart, W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* **64**, 93–112 (2003).
18. Katz, S. A. The Chemistry and Toxicology of Depleted Uranium. *Toxics* **2**, 50–78 (2014).

19. Souidi, M. *et al.* Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne. *Ann Biol Clin* **67**, 23–38 (2009).
20. Frengstad, B., Midtgård Skrede, A. K., Banks, D., Reidar Krog, J. & Siewers, U. The chemistry of Norwegian groundwaters: III. The distribution of trace elements in 476 crystalline bedrock groundwaters, as analysed by ICP-MS techniques. *Sci. Total Environ.* **246**, 21–40 (2000).
21. Ielsch, G. *et al.* Estimation and mapping of uranium content of geological units in France. *J. Environ. Radioact.* **166**, Part 2, 210–219 (2017).
22. *Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects.* (World Health Organization, 2001).
23. Yamaguchi, N., Kawasaki, A. & Iiyama, I. Distribution of uranium in soil components of agricultural fields after long-term application of phosphate fertilizers. *Sci. Total Environ.* **407**, 1383–1390 (2009).
24. Yamazaki, I. M. & Geraldo, L. P. Uranium content in phosphate fertilizers commercially produced in Brazil. *Appl. Radiat. Isot.* **59**, 133–136 (2003).
25. Chandrajith, R. & Dissanayake, C. B. Phosphate mineral fertilizers, trace metals and human health. *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka* **37**, (2009).
26. Shahandeh, H. & Hossner, L. R. Role of Soil Properties in Phytoaccumulation of Uranium. *Water. Air. Soil Pollut.* **141**, 165–180 (2002).
27. Laurette, J. *et al.* Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: A XAS and TEM study. *Environ. Exp. Bot.* **77**, 87–95 (2012).
28. Caldwell, E. *et al.* Bio-monitoring for uranium using stream-side terrestrial plants and macrophytes. *J. Environ. Monit.* **14**, 968–976 (2012).
29. Favas, P. J. C., Pratas, J., Mitra, S., Sarkar, S. K. & Venkatachalam, P. Biogeochemistry of uranium in the soil-plant and water-plant systems in an old uranium mine. *Sci. Total Environ.* **568**, 350–368 (2016).
30. *Toxicological profile for uranium.* (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2013).
31. Hirose, A. & Fawell, J. *WHO | Uranium in drinking-water.* (WHO, 2012).
32. McDiarmid, M. A. *et al.* Health Effects of Depleted Uranium on Exposed Gulf War Veterans. *Environ. Res.* **82**, 168–180 (2000).
33. Wrenn, M. E., Singh, N. P., Ruth, H., Rallison, M. L. & Burleigh, D. P. Gastrointestinal Absorption of Soluble Uranium from Drinking Water by Man. *Radiat. Prot. Dosimetry* **26**, 119–122 (1989).
34. Tournier, B. B. *et al.* Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicol. Lett.* **190**, 66–73 (2009).
35. Ansoborlo, E. *et al.* Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* **88**, 1605–1618 (2006).

36. Domingo, J. L. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod. Toxicol.* **15**, 603–609 (2001).
37. Gilman, A. P. *et al.* Uranyl Nitrate: 28-Day and 91-Day Toxicity Studies in the Sprague-Dawley Rat. *Toxicol. Sci.* **41**, 117–128 (1998).
38. Kurttio, P. *et al.* Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **47**, 972–982 (2006).
39. Prat, O. *et al.* Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 3941–3946 (2009).
40. Vicente-Vicente, L. *et al.* Nephrotoxicity of Uranium: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Perspectives. *Toxicol. Sci.* **118**, 324–347 (2010).
41. Priest, N. D., Howells, G. R., Green, D. & Haines, J. W. Uranium in Bone: Metabolic and Autoradiographic Studies in the Rat. *Hum. Exp. Toxicol.* **1**, 97–114 (1982).
42. Neuman, W. F. & Neuman, M. W. The deposition of uranium in bone; adsorption studies in vitro. *J. Biol. Chem.* **179**, 325–333 (1949).
43. Bourgeois, D. *et al.* Micro-distribution of uranium in bone after contamination: new insight into its mechanism of accumulation into bone tissue. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6619–6625 (2015).
44. Gritsaenko, T. *et al.* Natural uranium impairs the differentiation and the resorbing function of osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 715–726 (2017).
45. Lemerrier, V. *et al.* Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat. Prot. Dosimetry* **105**, 243–245 (2003).
46. Lestaevel, P. *et al.* The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* **212**, 219–226 (2005).
47. Bensoussan, H. *et al.* Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* **261**, 59–67 (2009).
48. Carrière, M. *et al.* Influence of Uranium Speciation on Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cell Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 446–452 (2004).
49. Thiébault, C. *et al.* Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells. *Toxicol. Sci.* **98**, 479–487 (2007).
50. Prat, O. *et al.* Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *PROTEOMICS* **5**, 297–306 (2005).
51. Milgram, S., Carrière, M., Thiébault, C., Malaval, L. & Gouget, B. Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* **250**, 62–69 (2008).
52. Pierrefite-Carle, V. *et al.* Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch. Toxicol.* **91**, 1903–1914 (2017).

53. Malard, V. *et al.* Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium. *PROTEOMICS* **5**, 4568–4580 (2005).
54. Paredes, E. *et al.* Evidence of isotopic fractionation of natural uranium in cultured human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 14007–14012 (2016).
55. Bresson, C., Ansoborlo, E. & Vidaud, C. Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies. *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 593 (2011).
56. Sutton, M. & Burastero, S. R. Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1468–1480 (2004).
57. Osman, A. A. A., Geipel, G., Barkleit, A. & Bernhard, G. Uranium(VI) Binding Forms in Selected Human Body Fluids: Thermodynamic Calculations versus Spectroscopic Measurements. *Chem. Res. Toxicol.* 150120150528009 (2015). doi:10.1021/tx5004084
58. Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C. & Madic, C. Etude de la spéciation de l'uranium en milieu biologique par Electrophorèse Capillaire et Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle. *Radioprotection* **32**, 645–657 (1997).
59. Vidaud, C. *et al.* Screening of Human Serum Proteins for Uranium Binding. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 946–953 (2005).
60. Vidaud, C. *et al.* Structural Consequences of Binding of UO_2^{2+} to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 2215–2226 (2007).
61. Montavon, G., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Repinc, U. & Morgenstern, A. Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1609–1616 (2009).
62. Ali, M., Kumar, A., Kumar, M. & Pandey, B. N. The interaction of human serum albumin with selected lanthanide and actinide ions: Binding affinities, protein unfolding and conformational changes. *Biochimie* **123**, 117–129 (2016).
63. Chevare, S. & Likhner, D. Complex formation of natural uranium in blood. *Meditinskii Radiol.* **13**, 53–57 (1968).
64. Brugge, D., deLemos, J. L. & Oldmixon, B. Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. *Rev. Environ. Health* **20**, 177–194 (2005).
65. Gueguen, Y. & Rouas, C. Données nouvelles sur la néphrotoxicité de l'uranium. *Radioprotection* **47**, 345–359 (2012).
66. Ansoborlo, É. *et al.* Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chim.* **10**, 1010–1019 (2007).
67. Carrière, M. *et al.* Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 655–662 (2008).

68. Huynh, T.-N. S., Vidaud, C. & Hagège, A. Investigation of uranium interactions with calcium phosphate-binding proteins using ICP/MS and CE-ICP/MS. *Metallomics* **8**, 1185–1192 (2016).
69. Kalinich, J. F. Chapter 4 - Treatment of internal radionuclide contamination. in *Medical consequences of radiological and nuclear weapons* 73–81 (2012).
70. Ohmachi, Y. *et al.* Sodium bicarbonate protects uranium-induced acute nephrotoxicity through uranium-decorporation by urinary alkalinization in rats. *J. Toxicol. Pathol.* (2014).
71. *Fiche Piratome n°1 « Principes de traitements et choix des antidotes ».* (ANSM, 2014).
72. Ansoborlo, É. *et al.* A la recherche de nouvelles therapeutiques. *Biofutur* **23** (2009).
73. Domingo, J. L. *et al.* Comparative effects of the chelators sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate (Tiron) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) on acute uranium nephrotoxicity in rats. *Toxicology* **118**, 49–59 (1997).
74. Migianu-Griffoni, E. *et al.* Design and synthesis of new polyphosphorylated upper-rim modified calix[4]arenes as potential and selective chelating agents of uranyl ion. *Tetrahedron* **65**, 1517–1523 (2009).
75. Leydier, A. *et al.* Sequestering agent for uranyl chelation: new binaphthyl ligands. *Tetrahedron Lett.* **52**, 3973–3977 (2011).
76. Leydier, A. *et al.* EDTA and DTPA modified ligands as sequestering agents for uranyl decorporation. *Tetrahedron* **68**, 1163–1170 (2012).
77. Bergeron, R. J., Wiegand, J. & Singh, S. Desferrithiocin analogue uranium decorporation agents. *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 348–361 (2009).
78. Jacopin, C. *et al.* Investigation of the Interaction between 1-Hydroxyethane-1,1'-diphosphonic Acid (HEDP) and Uranium(VI). *Inorg. Chem.* **42**, 5015–5022 (2003).
79. Sawicki, M. *et al.* Discovery of Powerful Uranyl Ligands from Efficient Synthesis and Screening. *Chem. - Eur. J.* **11**, 3689–3697 (2005).
80. Sawicki, M. *et al.* Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for in vitro and in vivo uranium(VI) chelation. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2768–2777 (2008).
81. Durbin, P., Kullgren, B., Ebbe, S., Xu, J. & Raymond, K. Chelating agents for uranium(VI): 2. Efficacy and toxicity of tetradentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands in mice. *Health Phys.* **78**, (2000).
82. Abergel, R. J. *et al.* Biomimetic Actinide Chelators: An Update on the Preclinical Development of the Orally Active Hydroxypyridonate Decorporation Agents 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2-HOPO). *Health Phys.* **99**, 401–407 (2010).
83. Pible, O., Guilbaud, P., Pellequer, J.-L., Vidaud, C. & Quéméneur, E. Structural insights into protein–uranyl interaction: towards an in silico detection method. *Biochimie* **88**, 1631–1638 (2006).

84. Vidaud, C. & Hagège, A. Déterminer les mécanismes moléculaires conduisant à la toxicité de l'uranium. 34–37 (2012).
85. Pible, O., Vidaud, C., Plantevin, S., Pellequer, J.-L. & Quéméneur, E. Predicting the disruption by UO_2^{2+} of a protein-ligand interaction: UO_2^{2+} Disrupts a Protein- Ca^{2+} -Ligand Interaction. *Protein Sci.* **19**, 2219–2230 (2010).
86. Xu, M., Frelon, S., Simon, O., Lobinski, R. & Mounicou, S. Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium–protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1063–1072 (2014).
87. Bucher, G., Frelon, S., Simon, O., Lobinski, R. & Mounicou, S. Development of non-denaturing off-gel isoelectric focusing for the separation of uranium–protein complexes in fish. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3517–3520 (2014).
88. Szyrwiel, Ł., Liauchuk, V., Chavatte, L. & Lobinski, R. In vitro induction and proteomics characterisation of a uranyl–protein interaction network in bovine serum. *Metallomics* **7**, 1604–1611 (2015).
89. Hagège, A., Huynh, T. N. S. & Hébrant, M. Separative techniques for metalloproteomics require balance between separation and perturbation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **64**, 64–74 (2015).
90. Dedieu, A. *et al.* Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5365–5376 (2009).
91. Averseng, O., Hagège, A., Taran, F. & Vidaud, C. Surface Plasmon Resonance for Rapid Screening of Uranyl Affine Proteins. *Anal. Chem.* **82**, 9797–9802 (2010).
92. Duff, M. R. & Kumar, C. V. Site-Selective Photocleavage of Proteins by Uranyl Ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 137–139 (2006).
93. Basset, C. *et al.* Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1185**, 233–240 (2008).
94. Aisen, P., Leibman, A. & Zweier, J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930–1937 (1978).
95. Yang, N., Zhang, H., Wang, M., Hao, Q. & Sun, H. Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. *Sci. Rep.* **2**, 999 (2012).
96. Wally, J. *et al.* THE CRYSTAL STRUCTURE OF IRON-FREE HUMAN SERUM TRANSFERRIN PROVIDES INSIGHT INTO INTER-LOBE COMMUNICATION AND RECEPTOR BINDING. *J. Biol. Chem.* **281**, 24934–24944 (2006).
97. Sun, H., Li, H. & Sadler, P. J. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chem. Rev.* **99**, 2817–2842 (1999).
98. Dautry-Varsat, A. Receptor-mediated endocytosis: The intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie* **68**, 375–381 (1986).

99. Westenfeld, R. *et al.* Fetuin-A (AHSG) prevents extraosseous calcification induced by uraemia and phosphate challenge in mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 1537–1546 (2007).
100. Jahnen-Dechent, W., Schäfer, C., Ketteler, M. & McKee, M. D. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J. Mol. Med.* **86**, 379–389 (2007).
101. Haglund, Å. C., Ek, B. & Ek, P. Phosphorylation of human plasma α 2-Heremans–Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem. J.* **357**, 437–445 (2001).
102. Huynh, T.-N. S., Bourgeois, D., Basset, C., Vidaud, C. & Hagège, A. Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions: CE and CEC. *ELECTROPHORESIS* **36**, 1374–1382 (2015).
103. Sodek, J., Ganss, B. & McKee, M. D. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **11**, 279–303 (2000).
104. Klänning, E., Christensen, B., Sørensen, E. S., Vorup-Jensen, T. & Jensen, J. K. Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status. *Bone* **66**, 90–95 (2014).
105. Wegner, S. V., Boyaci, H., Chen, H., Jensen, M. P. & He, C. Engineering a uranyl-specific binding protein from NikR. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 2339–2341 (2009).
106. Clainche, L. L. & Vita, C. Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide. *Environ. Chem. Lett.* **4**, 45–49 (2006).
107. Zhou, L. *et al.* A protein engineered to bind uranyl selectively and with femtomolar affinity. *Nat. Chem.* **6**, 236–241 (2014).
108. Odoh, S. O. *et al.* UO_2^{2+} uptake by proteins: understanding the binding features of the super uranyl binding protein and design of a protein with higher affinity. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17484–17494 (2014).
109. Pardoux, R. *et al.* Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS ONE* **7**, e41922 (2012).
110. Michon, J., Frelon, S., Garnier, C. & Coppin, F. Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *J. Fluoresc.* **20**, 581–590 (2010).
111. Safi, S. *et al.* Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem. - Eur. J.* **19**, 11261–11269 (2013).
112. Saunders, M., Wishnia, A. & Kirkwood, J. G. THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTRUM OF RIBONUCLEASE. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3289–3290 (1957).
113. Williamson, M. P., Havel, T. F. & Wüthrich, K. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315 (1985).
114. Schwenke, K. D. K. Wüthrich: NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. XII und 379 Seiten mit zahlreichen Abb. und Tab. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam-Oxford/

- American Elsevier Publishing Comp. New York 1976. Preis: 46,95 US \$; 115 Dfl. *Food Nahr.* **22**, 439–439 (1978).
115. Wüthrich, K. Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **265**, 22059–22062 (1990).
 116. Breukels, V. *et al.* Overview on the Use of NMR to Examine Protein Structure. in *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
 117. Schanda, P., Kupče, Ě. & Brutscher, B. SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-dimensional Deteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds. *J. Biomol. NMR* **33**, 199–211 (2005).
 118. Felli, I. C. & Brutscher, B. Recent Advances in Solution NMR: Fast Methods and Heteronuclear Direct Detection. *ChemPhysChem* **10**, 1356–1368 (2009).
 119. Solyom, Z. *et al.* BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins. *J. Biomol. NMR* **55**, 311–321 (2013).
 120. Malliavin, T. & Dardel, F. Structure des protéines par RMN. (2002).
 121. Calhoun, J. R. *et al.* Solution NMR Structure of a Designed Metalloprotein and Complementary Molecular Dynamics Refinement. *Structure* **16**, 210–215 (2008).
 122. Isvoran, A., Badel, A., Craescu, C. T., Miron, S. & Miteva, M. A. Exploring NMR ensembles of calcium binding proteins: Perspectives to design inhibitors of protein-protein interactions. *BMC Struct. Biol.* **11**, 24 (2011).
 123. Li, H. & Sun, H. NMR Studies of Metalloproteins. in *NMR of Proteins and Small Biomolecules* (ed. Zhu, G.) 69–98 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
 124. De Ricco, R., Potocki, S., Kozlowski, H. & Valensin, D. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. *Coord. Chem. Rev.* **269**, 1–12 (2014).
 125. Huang, X. & Miller, W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**, 337–357 (1991).
 126. Yoshioka, Y. *et al.* The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **261**, 1665–1676 (1986).
 127. Kolodziejczyk, R. *et al.* Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J.* **277**, 1726–1737 (2010).
 128. McGlynn, S. P., Azumi, T. & Kasha, M. External Heavy-Atom Spin—Orbital Coupling Effect. V. Absorption Studies of Triplet States. *J. Chem. Phys.* **40**, 507–515 (1964).
 129. Schanda, P., Meier, B. H. & Ernst, M. Quantitative Analysis of Protein Backbone Dynamics in Microcrystalline Ubiquitin by Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15957–15967 (2010).
 130. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. & Cook, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **194**, 531–544 (1987).

131. Goda, N. *et al.* A Method for Systematic Assessment of Intrinsically Disordered Protein Regions by NMR. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 15743–15760 (2015).
132. Kakalis, L. T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F. & Armitage, I. M. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Lett.* **362**, 55–58 (1995).
133. Li, H. & Otvos, J. D. ¹¹¹Cd NMR Studies of the Domain Specificity of Ag⁺ and Cu⁺ Binding to Metallothionein. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 13929–13936 (1996).
134. Ouyang, H. & Vogel, H. J. Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *Biometals* **11**, 213–222 (1998).
135. Cornilescu, G., Marquardt, J. L., Ottiger, M. & Bax, A. Validation of Protein Structure from Anisotropic Carbonyl Chemical Shifts in a Dilute Liquid Crystalline Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6836–6837 (1998).
136. Smith, T. F. & Waterman, M. S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**, 195–197 (1981).
137. Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252–W258 (2014).
138. Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387–D392 (2009).
139. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201 (2006).
140. Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS* **30**, S162–S173 (2009).
141. Pible, O., Imbert, G. & Pellequer, J.-L. INTERALIGN: interactive alignment editor for distantly related protein sequences. *Bioinformatics* **21**, 3166–3167 (2005).
142. Schanda, P. & Brutscher, B. Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8014–8015 (2005).
143. Huynh, T. N. S. Stratégie analytique combinant électrophorèse capillaire et ICP/MS pour la caractérisation des cibles biologiques de l'uranium. (Université de Montpellier, 2015).
144. Groß, A., Hashimoto, C., Sticht, H. & Eichler, J. Synthetic Peptides as Protein Mimics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, (2016).
145. Ghosh, D. & Pecoraro, V. L. Understanding Metalloprotein Folding Using a de Novo Design Strategy. *Inorg. Chem.* **43**, 7902–7915 (2004).
146. Sénèque, O. *et al.* Novel model peptide for Atx1-like metallochaperones. *Chem. Commun.* 770–771 (2004). doi:10.1039/B315489K

147. Dumy, P. *et al.* A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **36**, 1255–1258 (1995).
148. Mutter, M. *et al.* Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1482–1485 (1996).
149. Bonnet, C. S. *et al.* A Gadolinium-Binding Cyclodecapeptide with a Large High-Field Relaxivity Involving Second-Sphere Water. *Chem. - Eur. J.* **15**, 7083–7093 (2009).
150. Pujol, A. M., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. A Series of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Soluble Chelators that are Highly Selective for Copper(I). *Chem. - Eur. J.* **17**, 4418–4428 (2011).
151. Lebrun, C., Starck, M., Gathu, V., Chenavier, Y. & Delangle, P. Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding. *Chem. - Eur. J.* **20**, 16566–16573 (2014).
152. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer Science & Business Media, 2007).
153. Henchoz, Y. *et al.* Rapid determination of pKa values of 20 amino acids by CZE with UV and capacitively coupled contactless conductivity detections. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1869–1878 (2007).
154. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
155. Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*. (CRC Press, 2000).
156. Pedersen, S. L., Tofteng, A. P., Malik, L. & Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev* **41**, 1826–1844 (2012).
157. Baranowski, M. R. *et al.* Synthesis of Fluorophosphate Nucleotide Analogues and Their Characterization as Tools for ¹⁹F NMR Studies. *J. Org. Chem.* **80**, 3982–3997 (2015).
158. Starck, M. *et al.* Cyclic phosphopeptides to rationalize the role of phosphoamino acids in uranyl binding to biological targets. *Chem. – Eur. J.* n/a-n/a (2017). doi:10.1002/chem.201605481
159. Yang, Y. *Side Reactions in Peptide Synthesis*. (Academic Press, 2015).
160. García-Echeverría, C. Potential pyrophosphate formation upon use of N α-Fmoc-Tyr (PO₃H₂)-OH in solid-phase peptide synthesis. *Lett. Pept. Sci.* **2**, 93–98 (1995).
161. Bannwarth, W., Küng, E. & Vorherr, T. Global phosphorylation of peptides containing oxidation-sensitive amino acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 2141–2146 (1996).
162. Hoffmann, R. *et al.* Chemical phosphorylation of the peptides GGXA (X= S, T, Y): an evaluation of different chemical approaches. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45**, 26–34 (1995).
163. Perich, J. W. Synthesis of phosphopeptides via global phosphorylation on the solid phase: resolution of H-phosphonate formation. *Lett. Pept. Sci.* **5**, 49–55 (1998).

164. Renaudet, O. & Dumy, P. On-bead synthesis and binding assay of chemoselectively template-assembled multivalent neoglycopeptides. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 2628 (2006).
165. Vargeese, C. *et al.* Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4, 5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1046–1050 (1998).
166. Starck, M. *et al.* Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl. *Inorg. Chem.* **54**, 11557–11562 (2015).
167. Cisnetti, F., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. Lanthanide(III) Complexes with Two Hexapeptides Incorporating Unnatural Chelating Amino Acids: Secondary Structure and Stability. *Chem. - Eur. J.* **15**, 7456–7469 (2009).
168. Cisnetti, F., Lebrun, C. & Delangle, P. A lanthanide binding peptide with short chelating side-chains: structural impact of the backbone coordination. *Dalton Trans.* **39**, 3560 (2010).
169. Niedźwiecka, A., Cisnetti, F., Lebrun, C., Gateau, C. & Delangle, P. Lanthanide-binding peptides with two pendant aminodiacetate arms: Impact of the sequence on chelation. *Dalton Trans.* **41**, 3239 (2012).
170. Ancel, L., Niedźwiecka, A., Lebrun, C., Gateau, C. & Delangle, P. Rational design of lanthanide binding peptides. *Comptes Rendus Chim.* **16**, 515–523 (2013).
171. Ancel, L., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. DNA Sensing by a Eu-Binding Peptide Containing a Proflavine Unit. *Inorg. Chem.* **52**, 552–554 (2013).
172. Bonnet, C. S., Devocelle, M. & Gunnlaugsson, T. Luminescent lanthanide-binding peptides: sensitising the excited states of Eu(III) and Tb(III) with a 1,8-naphthalimide-based antenna. *Org Biomol Chem* **10**, 126–133 (2012).
173. Kovacic, R. T., Welch, J. T. & Franklin, S. J. Sequence-Selective DNA Cleavage by a Chimeric Metallopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6656–6662 (2003).
174. Franz, K. J., Nitz, M. & Imperiali, B. Lanthanide-Binding Tags as Versatile Protein Coexpression Probes. *ChemBioChem* **4**, 265–271 (2003).
175. Sculimbrene, B. R. & Imperiali, B. Lanthanide-Binding Tags as Luminescent Probes for Studying Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7346–7352 (2006).
176. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
177. Overvoll, P. A. & Lund, W. Complex formation of uranyl ions with polyaminopolycarboxylic acids. *Anal. Chim. Acta* **143**, 153–161 (1982).
178. Hummel, W., Anderegg, G., Rao, L., Puigdomènech, I. & Tochiyama, O. *Chemical Thermodynamics of Compounds and Complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr With Selected Organic Ligands*. (Elsevier, 2005).
179. Li, H. J. & Crothers, D. M. Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: The kinetics of an intercalation reaction. *J. Mol. Biol.* **39**, 461–477 (1969).

180. Horowitz, E. D. & Hud, N. V. Ethidium and Proflavine Binding to a 2',5'-Linked RNA Duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15380–15381 (2006).
181. Vita, C., Le Clainche, L. & Monjardet, V. Peptides chelatant l'uranium et leurs applications. (2006).
182. Pujol, A. M., Gateau, C., Lebrun, C. & Delangle, P. A Cysteine-Based Tripodal Chelator with a High Affinity and Selectivity for Copper(I). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6928–6929 (2009).
183. Jiang, J. *et al.* Solution Chemistry of Uranyl Ion with Iminodiacetate and Oxydiacetate: A Combined NMR/EXAFS and Potentiometry/Calorimetry Study. *Inorg. Chem.* **42**, 1233–1240 (2003).
184. Varenne, F. *et al.* Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma–mass spectrometry hyphenation for the determination at the nanogram scale of metal affinities and binding constants of phosphorylated ligands. *J. Chromatogr. A* **1229**, 280–287 (2012).
185. Henikoff, S. & Henikoff, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10915–10919 (1992).
186. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).