



Déterminants de l'interaction uranium-protéine et conséquences sur sa toxicité

Introduction

Exposition à l'uranium

Interactions entre métaux et protéines

Partie I

Déterminants de l'interaction protéine-uranium

Phosphorylation – Structure du site

Partie II

Conséquences sur les mécanismes de toxicité

Exploitation de peptides affins et sélectifs

Perspectives

Catherine Berthomieu

CEA-Cadarache

Interactions Protéines Métal

catherine.berthomieu@cea.fr



BIAM-UMR 7265
INSTITUT DE BIOSCIENCES
& BIOTECHNOLOGIES
D'AIX-MARSEILLE



Aix-Marseille
UNIVERSITÉ
Socialement engagée

L'URANIUM : UN ÉMETTEUR INTERNE PRÉSENTANT UNE TOXICITÉ RADIOLOGIQUE ET CHIMIQUE

^{234}U , ^{235}U , ^{238}U émetteurs α

effet radiologique localisé
contamination interne
toxicité radiologique et chimique

Cation métallique UO_2^{2+}

effet chimique – production de ROS
interaction avec des molécules biologiques

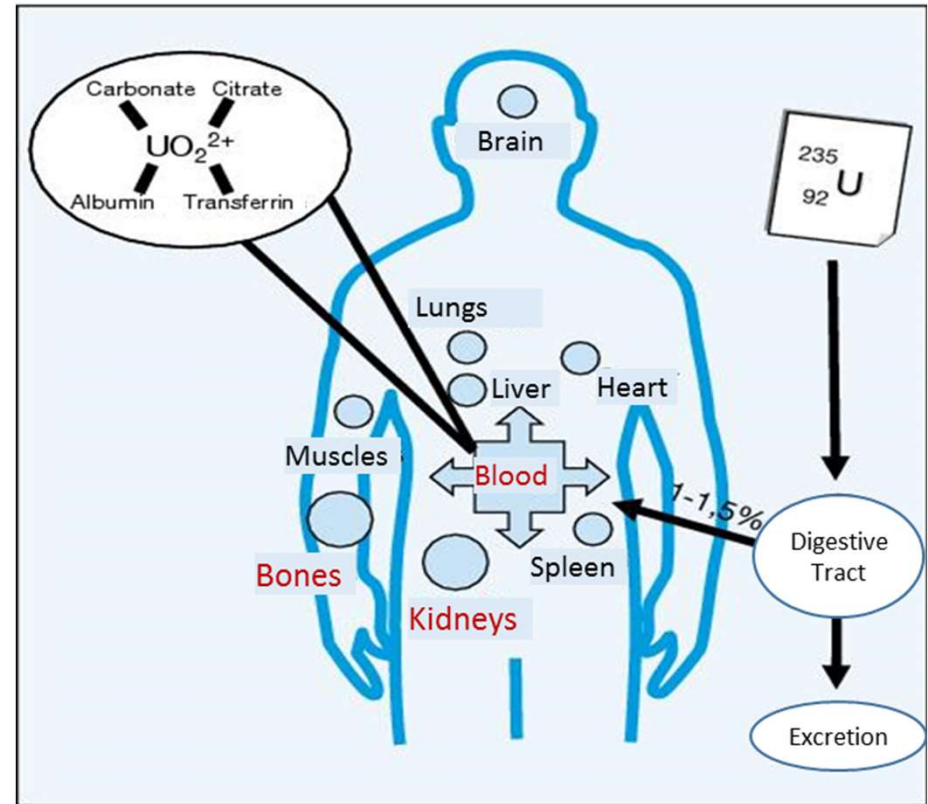
Au niveau « macroscopique » :

Bio-cinétique et organes cibles bien connus

Au niveau moléculaire :

Mécanismes de transport, d'accumulation dans les organes cibles ou de remobilisation de l'uranium encore peu connus

Rôle déterminant des interactions avec les protéines et compétitions avec ligands inorganiques



Une meilleure connaissance de la spéciation de l'uranium *in vivo* est importante pour comprendre les mécanismes de transport, accumulation et développer des contre-mesures efficaces

INTERACTIONS ENTRE MÉTAUX ET PROTÉINES

- Plus d'un tiers des protéines de structure connue possèdent un site métallique dans:
des sites catalytiques ou des sites structuraux
- Les paramètres importants qui déterminent ces interactions sont:
 - la charge, le rayon ionique
 - le nombre de coordination / de ligands
 - les propriétés d'interactions (Pearson's Hard & Soft Acid & Base theory)

Na, K, Mg, **Ca**,
Zn, Cu, Fe,
Co, Mn, W, Mo



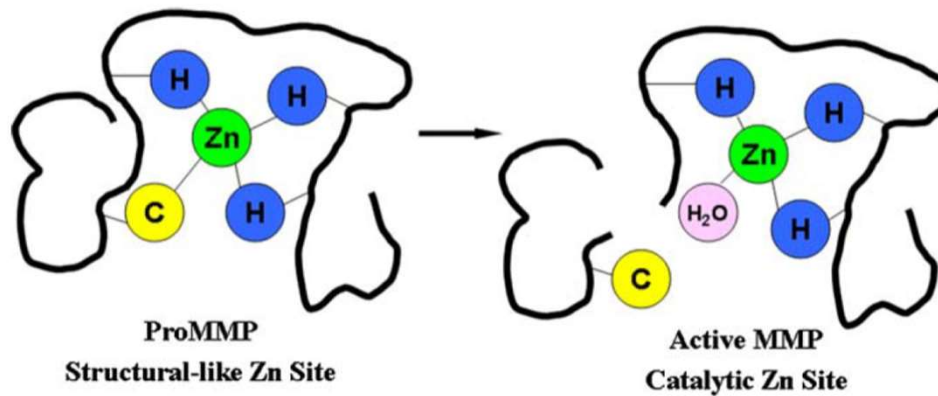
Hard acids	- Intermediary -	Soft acids
Li ⁺ , Na ⁺ , K⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca²⁺ , Sr ²⁺ , Al ³⁺ , Ga ³⁺ , In ³⁺ , Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Fe³⁺ , Ir ³⁺ , La ³⁺ , Th⁴⁺ , UO₂²⁺	Fe²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu²⁺ , Zn²⁺	Cu⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Hg ⁺ , Cs ⁺ , Hg ²⁺ , Pd ²⁺ , Cd ²⁺ , Pt ²⁺
Hard bases		Soft bases

INTERACTIONS ENTRE MÉTAUX ET PROTÉINES

- Un petit nombre de métaux essentiels assure des fonctions variées :

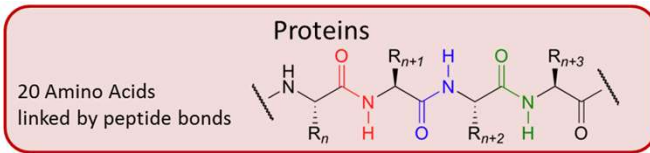
les protéines régulent finement les propriétés des sites métalliques

Biometals (2009) 22:141–148



- L'affinité de l'interaction est un paramètre très important pour comprendre la présence de compétition entre cations métalliques

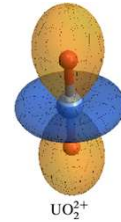
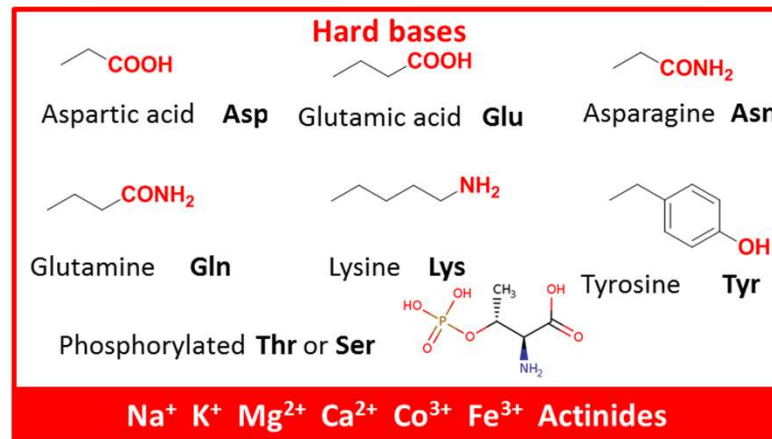
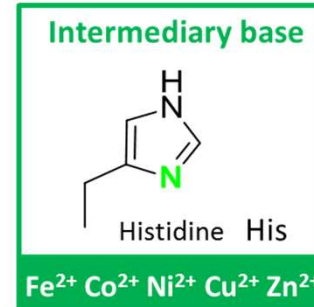
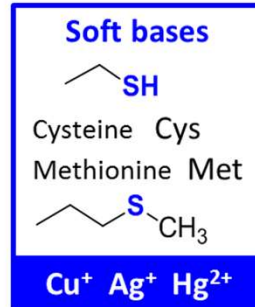
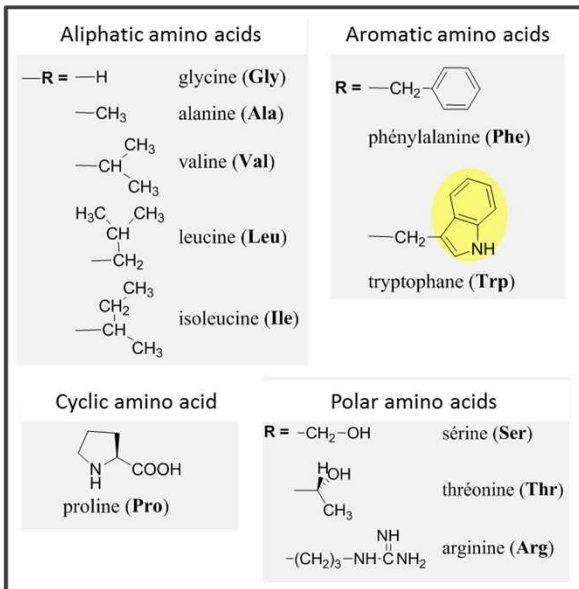
INTERACTIONS ENTRE MÉTAUX ET PROTÉINES



Amino acid side chains

Non Metal binding side chains

Metal-binding side chains



Le cation dur UO₂²⁺
peut interagir avec les groupes

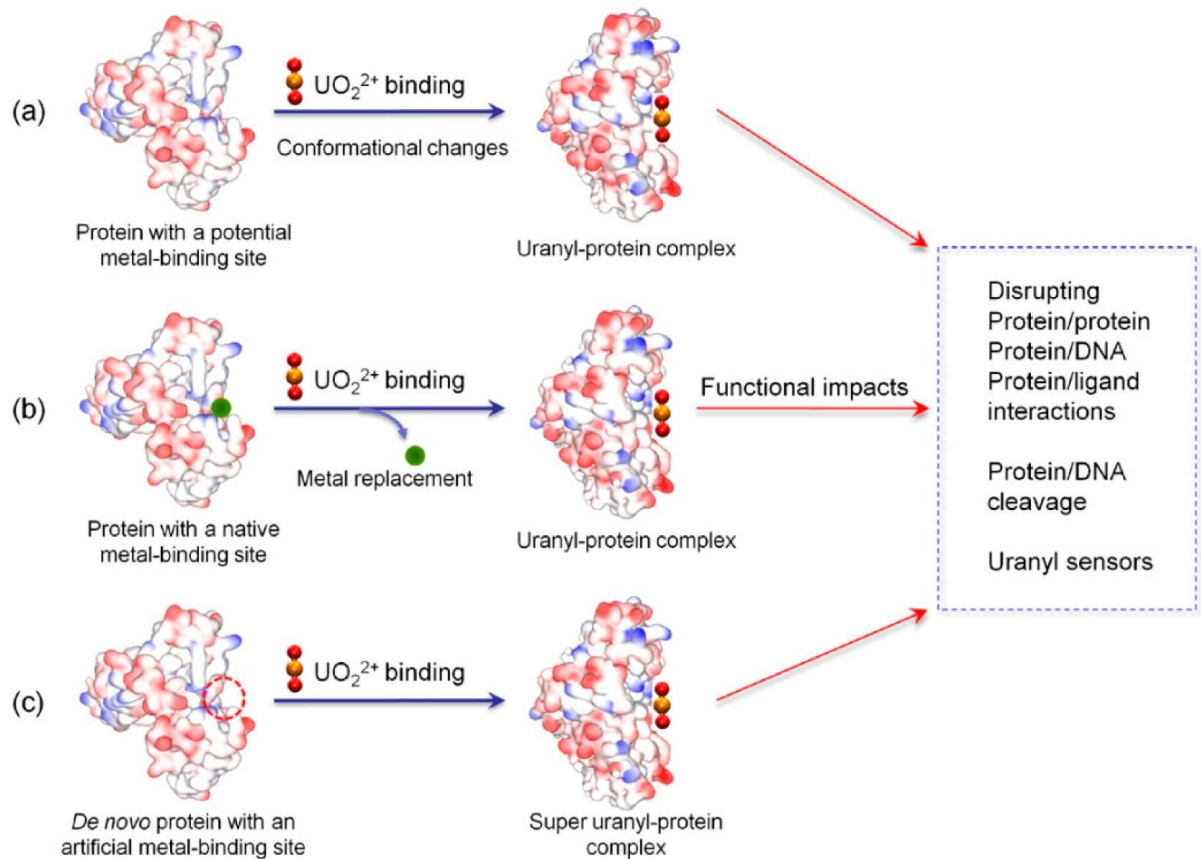
- COO⁻
- OPO₃²⁻
- C=O
- OH

Interférence possible avec
les cations essentiels

Ca²⁺, Fe³⁺

Comportement similaire
anticipé pour Pu/Th, Ln

MECANISMES POSSIBLES DE L'IMPACT DE L'URANYLE SUR LES PROTÉINES

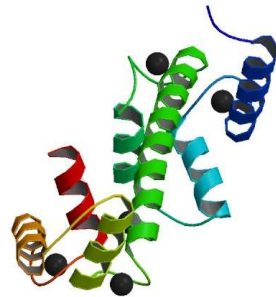
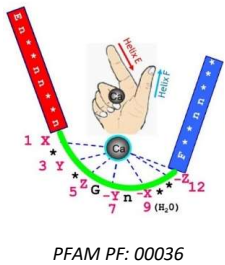


Ying-Wu Lin 2020 Biomolecules
doi.org/10.3390/biom10030457

Voir aussi
van Horn et al. 2006,
Coord Chem Rev 250, 765
Pible et al. 2006 Biochimie 88, 1631

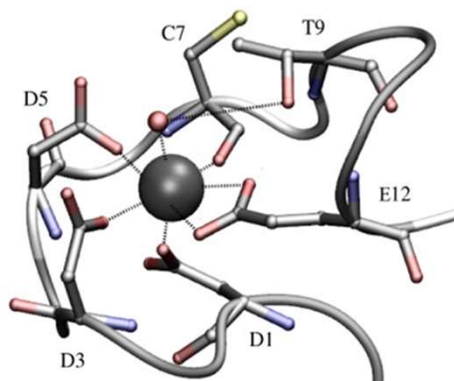
DÉTERMINANTS DE L'INTERACTION URANYLE PROTÉINE

Point de départ : motif de fixation du Ca^{2+} -binding le plus répandu chez les eucaryotes

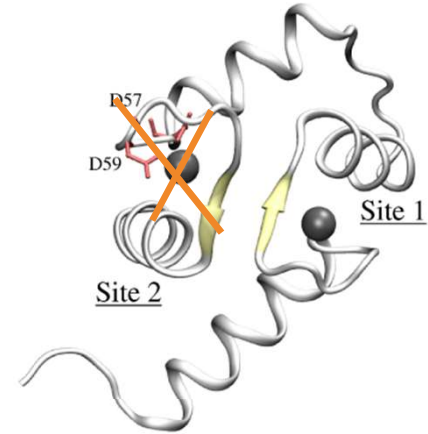


Calmodulin

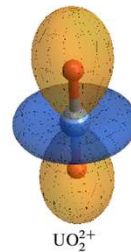
Ca^{2+} : 7 ligands



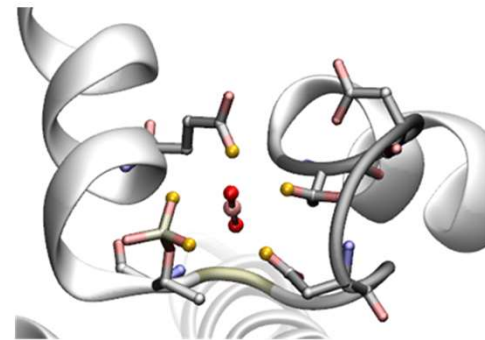
Ingénierie du domaine N-terminal



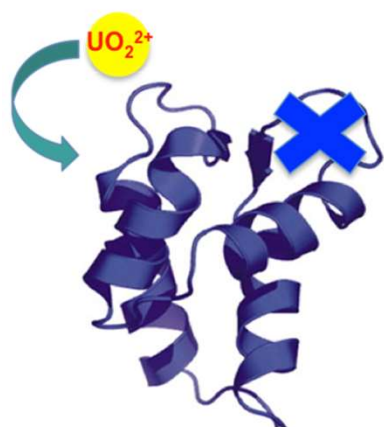
UO_2^{2+} : 5 à 6 ligands dans le plan équatorial



DKDGDGCITTKE

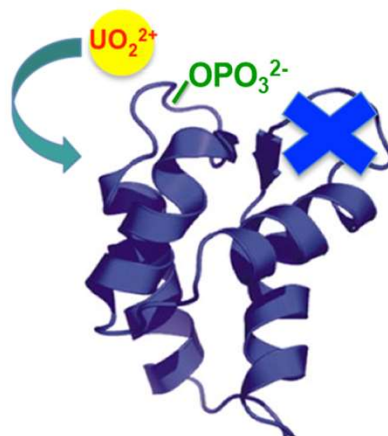


PROPRIÉTÉS D'INTERACTION CALMODULINE - URANIUM



Fixation d'un seul
ion métallique

vs.



Effet de la
phosphorylation



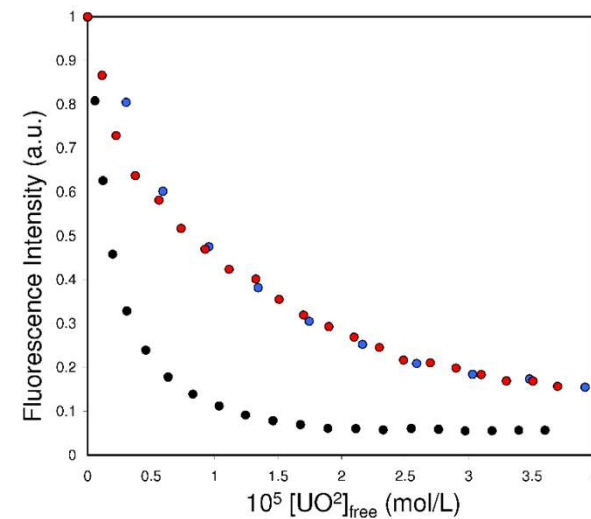
$K_d(\text{Site I}) = 32 \text{ nM}$

$K_d(\text{Site II}) = 270 \text{ nM}$

$K_d_{\text{Calcium}} \geq 10 \text{ }\mu\text{M}$

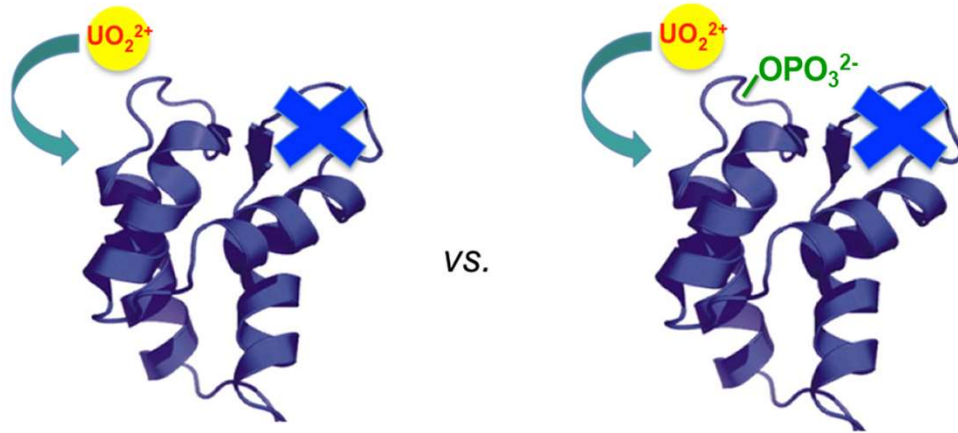
$K_d(\text{Site I}) = 320 \text{ pM}$

$\log(K) = 9,49$



Pardoux et al. 2012 PlosOne 7(8) e41922
Sauge-Merle et al. 2017 Chemistry Eur. J. 23, 15505 – 15517

PROPRIÉTÉS D'INTERACTION CALMODULINE - URANIUM



vs.

Fixation d'un seul
ion métallique

Effet de la
phosphorylation

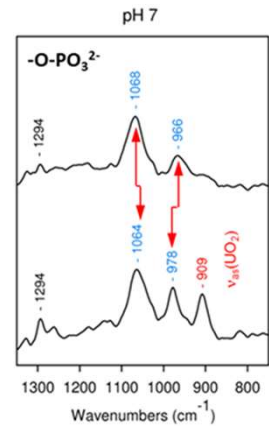
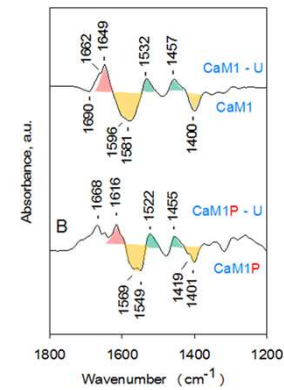
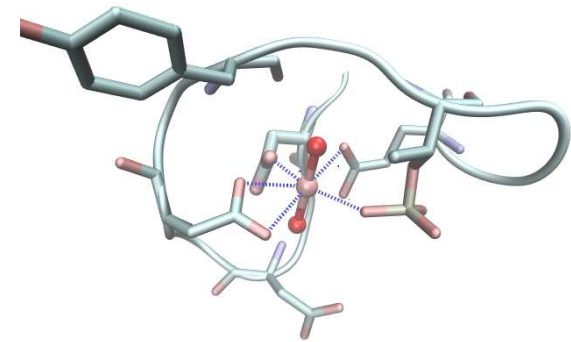
$K_d(\text{Site I}) = 32 \text{ nM}$

$K_d(\text{Site II}) = 270 \text{ nM}$

$K_d_{\text{Calcium}} \geq 10 \mu\text{M}$

$K_d(\text{Site I}) = 320 \text{ pM}$

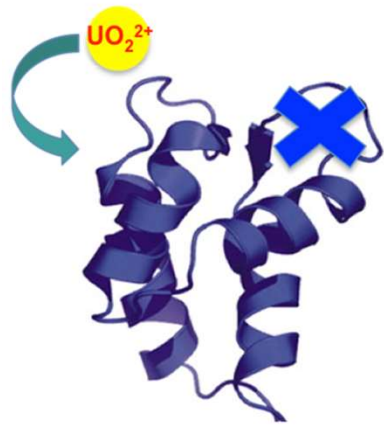
$\log(K) = 9,49$



Pardoux et al. 2012 PlosOne 7(8) e41922

Sauge-Merle et al. 2017 Chemistry Eur. J. 23, 15505 – 15517

PROPRIÉTÉS D'INTERACTION CALMODULINE - URANIUM

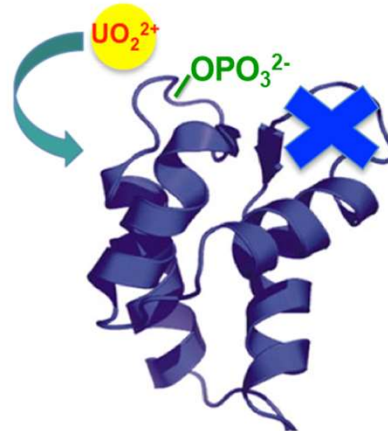


Fixation d'un seul
ion métallique

$K_d(\text{Site I}) = 32 \text{ nM}$
 $K_d(\text{Site II}) = 270 \text{ nM}$

$K_d_{\text{Calcium}} \geq 10 \mu\text{M}$

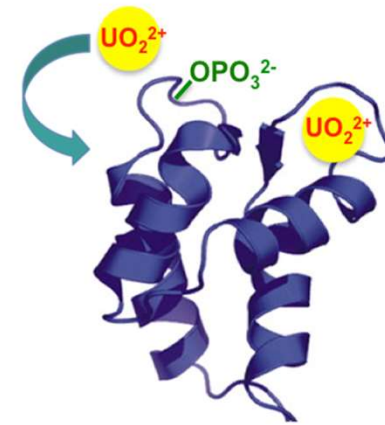
vs.



Effet de la
phosphorylation

$K_d(\text{Site I}) = 320 \text{ pM}$

vs.

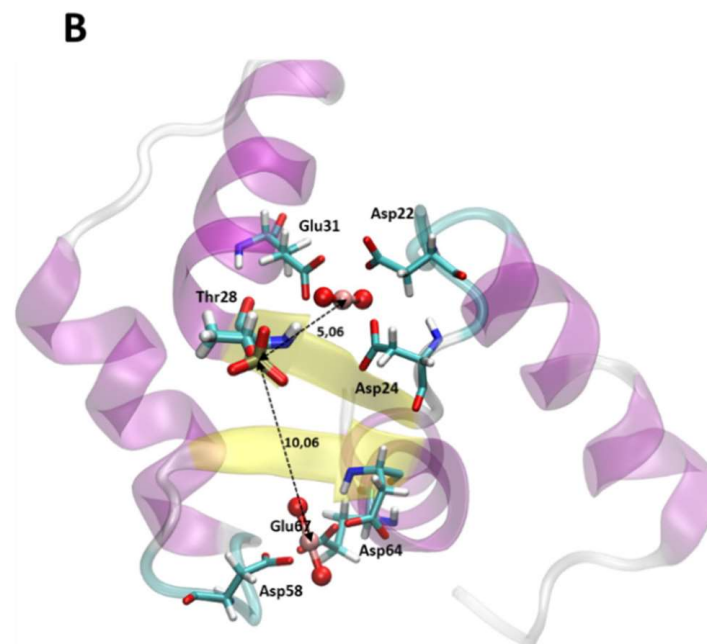
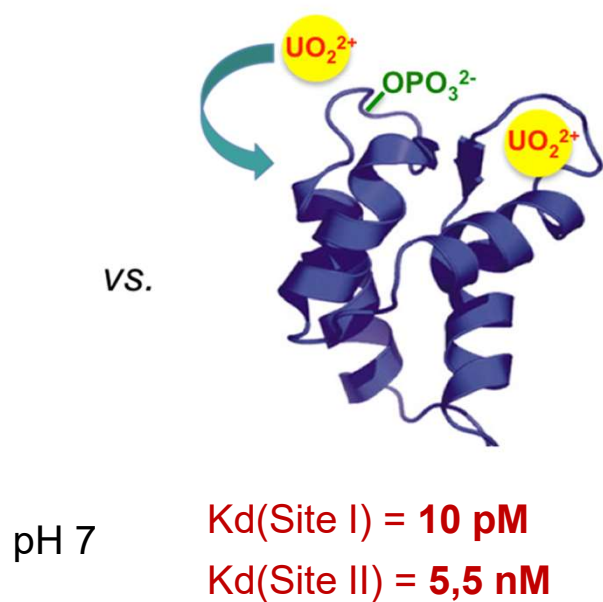


Effet de la
phosphorylation
+ Effet allostérique

$K_d(\text{Site I}) = 10 \text{ pM}$
 $K_d(\text{Site II}) = 5,5 \text{ nM}$



EFFET DIRECT VS EFFET “STRUCTURAL” DU GROUPEMENT PHOSPHORYLE SUR L’AFFINITÉ POUR L’URANIUM



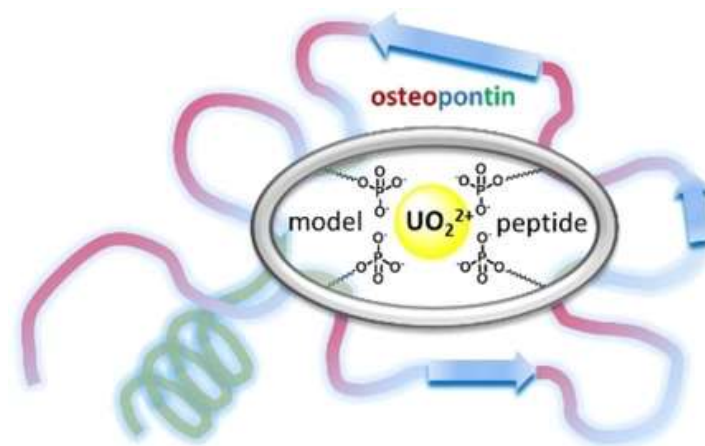
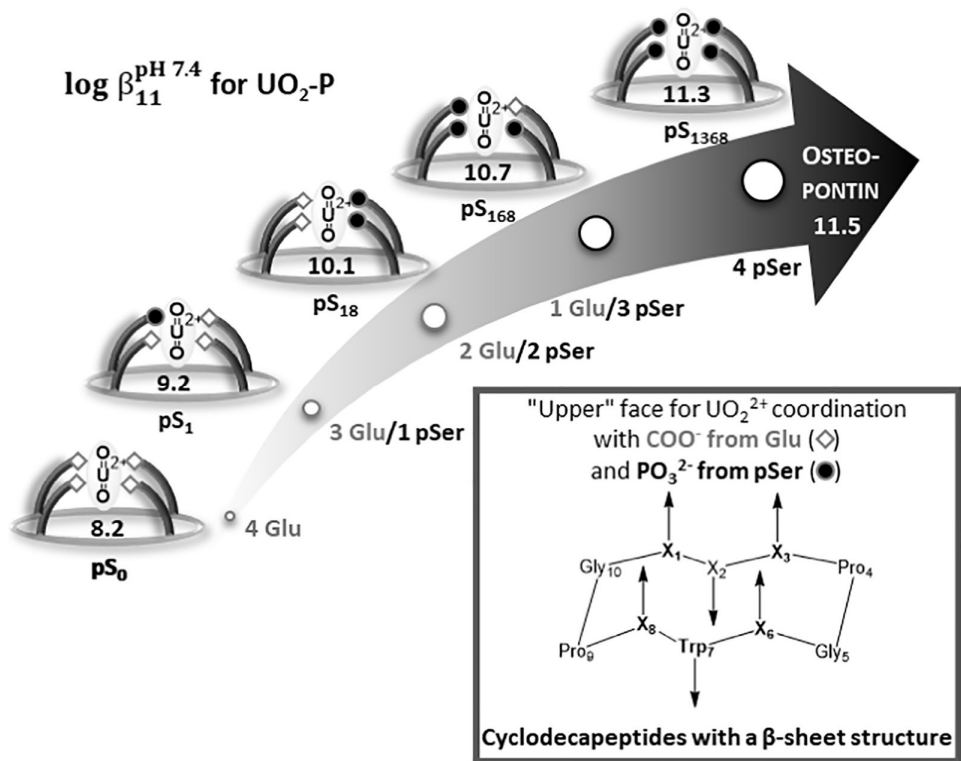
Effet « structural » sur les sites I et II par renforcement du feuillet β inter-sites.

Effet direct sur le Site I ? (XAS indique que oui, la Dyn Mol en solution donne une distance de 5 Å)



P. Delangle

EFFET DE LA PHOSPHORYLATION SUR L’AFFINITÉ POUR L’URANYLE DE PEPTIDES CYCLIQUES



A proposed model for osteopontin

Laporte et al. 2019 *Chem Eur J* 25, 8570 – 8578
 Garai & Delangle 2020 *J Inorg Biochem* 203, 110936

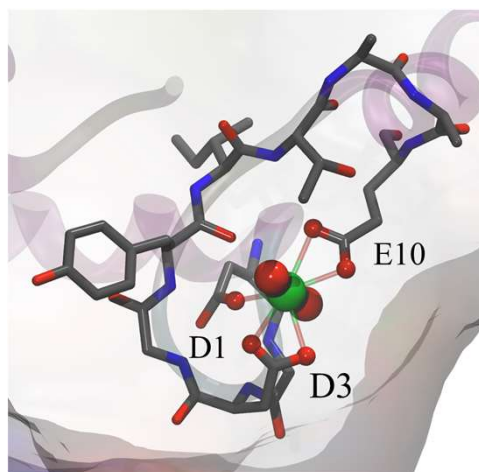


EFFET DE LA STRUCTURE DE LA BOUCLE DE FIXATION SUR L'AFFINITÉ POUR L'URANIUM



DKDGDGYITTKK
Site 1

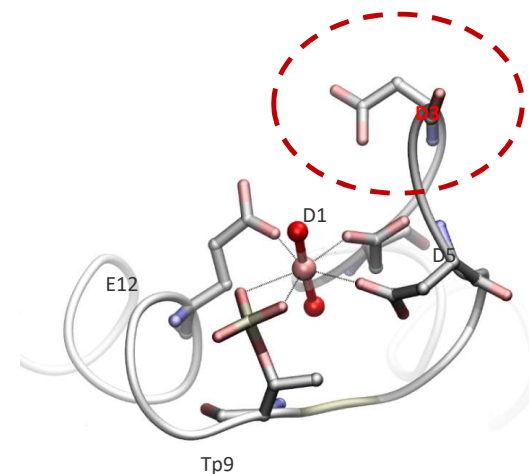
$$K_{d_{\text{pH}7}}(\text{UO}_2^{2+}) \approx 9,7 \text{ nM}$$



...--DGDGYITAAE...

$$K_{d_{\text{pH}7}}(\text{UO}_2^{2+}) \approx 280 \text{ pM} \quad \log(K) = 9.55$$

$$K_{d_{10 \text{ mM CaCl}_2}} = 1,5 \text{ nM}$$

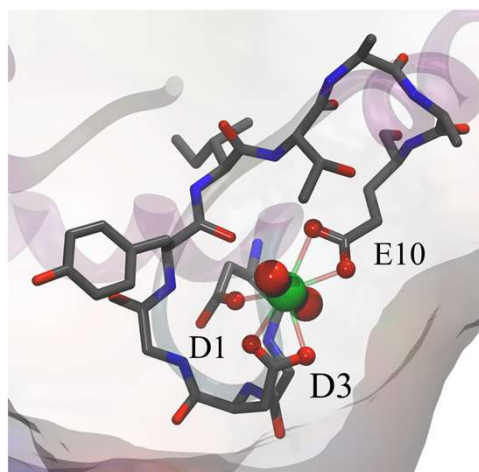


EFFET DE LA STRUCTURE DE LA BOUCLE DE FIXATION SUR L'AFFINITÉ POUR L'URANIUM



DKDGDGYITTKE
Site 1

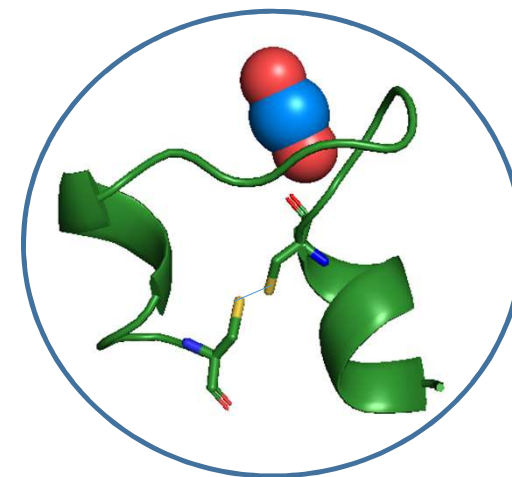
$K_{d_{pH7}}(UO_2^{2+}) \approx 9,7 \text{ nM}$



...--DGDGYITAAE...
77 acides aminés

$K_{d_{pH7}}(UO_2^{2+}) \approx 280 \text{ pM}$

$K_{d_{10 \text{ mM CaCl}_2}} = 1,5 \text{ nM}$



...-DGDGYITAAE-...
Peptide de 22 Acides aminés
cyclisé (Cys)**S--S**(Cys)

$K_{d_{pH7}}(UO_2^{2+}) \approx 210 \text{ pM}$
en présence de 10 mM $CaCl_2$

100 mg U/g de matrice ¹⁴

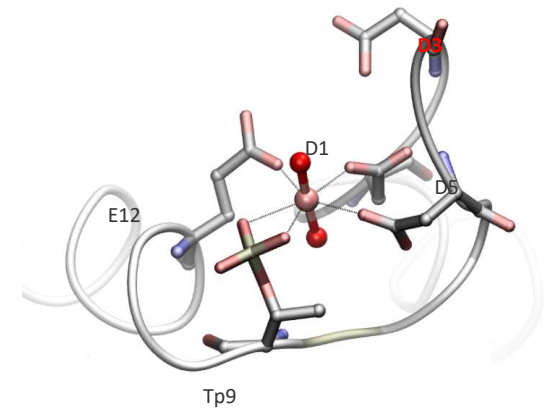
DÉTERMINANTS DE L'INTERACTION URANYLE PROTÉINE

Affinité plus forte pour l'uranyle que le calcium - compétition

L'ajout de ligands phosphoryle augmente l'affinité pour l'uranyle

Un effet structural aussi important que l'ajout d'un ligand fort phosphoryle

La sphère de coordination de l'uranyle joue un rôle majeur dans l'affinité





F. Brulfert
IPN Orsay

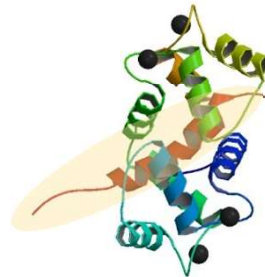
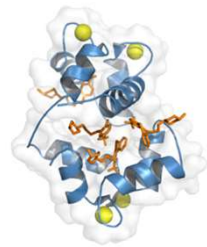


E. Simoni
IPN Orsay

EFFET DE LA FIXATION D'URANIUM SUR LA FONCTION DE LA CALMODULINE



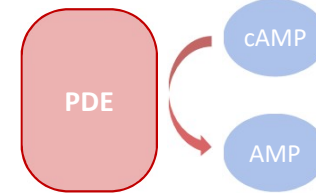
Changement de conformation après fixation du Ca^{2+}



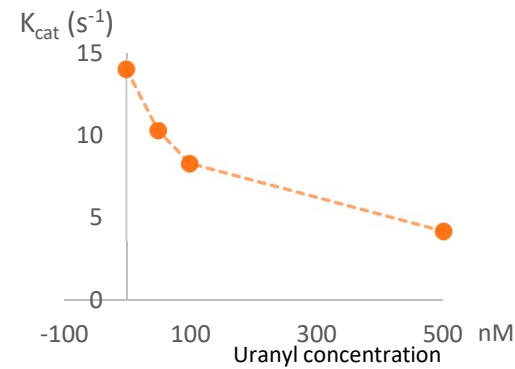
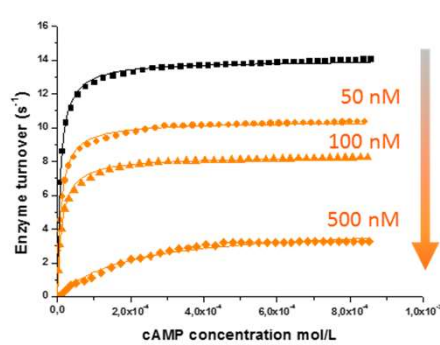
Régulation de la fonction des protéines par interaction Protéine - protéine



Voie de signalisation calcique

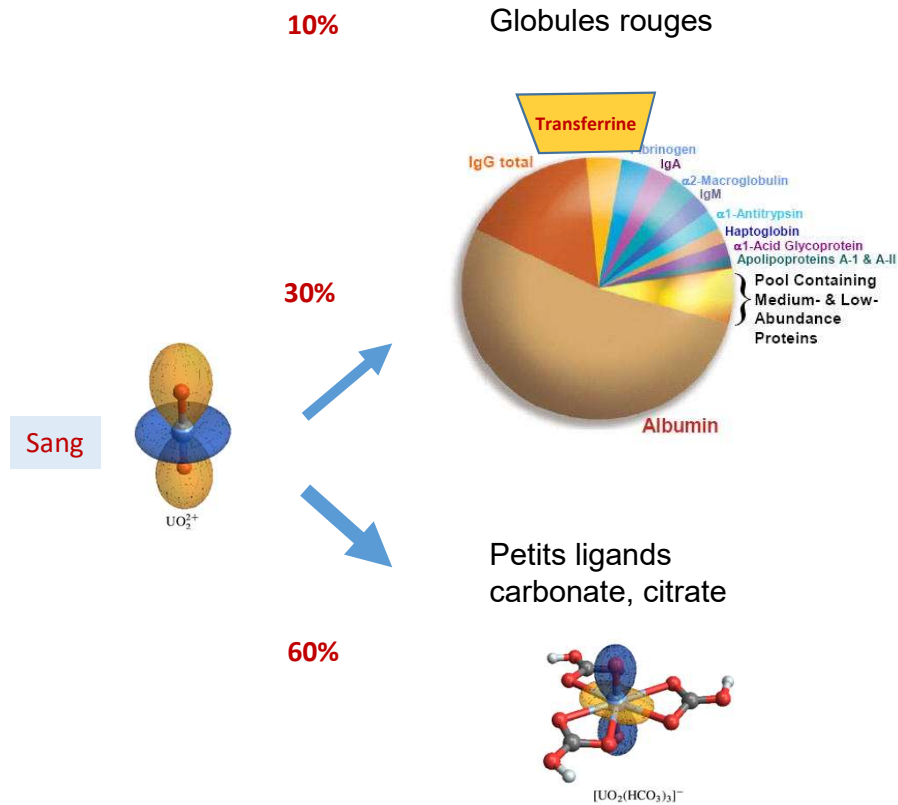


Régulation du fonctionnement de la phosphodiesterase



Diminution de l'efficacité de l'activité phosphodiesterase à faible concentration d'uranium

DISTRIBUTION DE L'URANIUM DANS LE PLASMA SANGUIN



Albumine

Guzman Barron et al. 1948 *J. Gen. Physiol.* 32(2) 163-178

Transferrine

Scapolan et al. 1998 *Radiat Protect. Dosim.* 79, 505

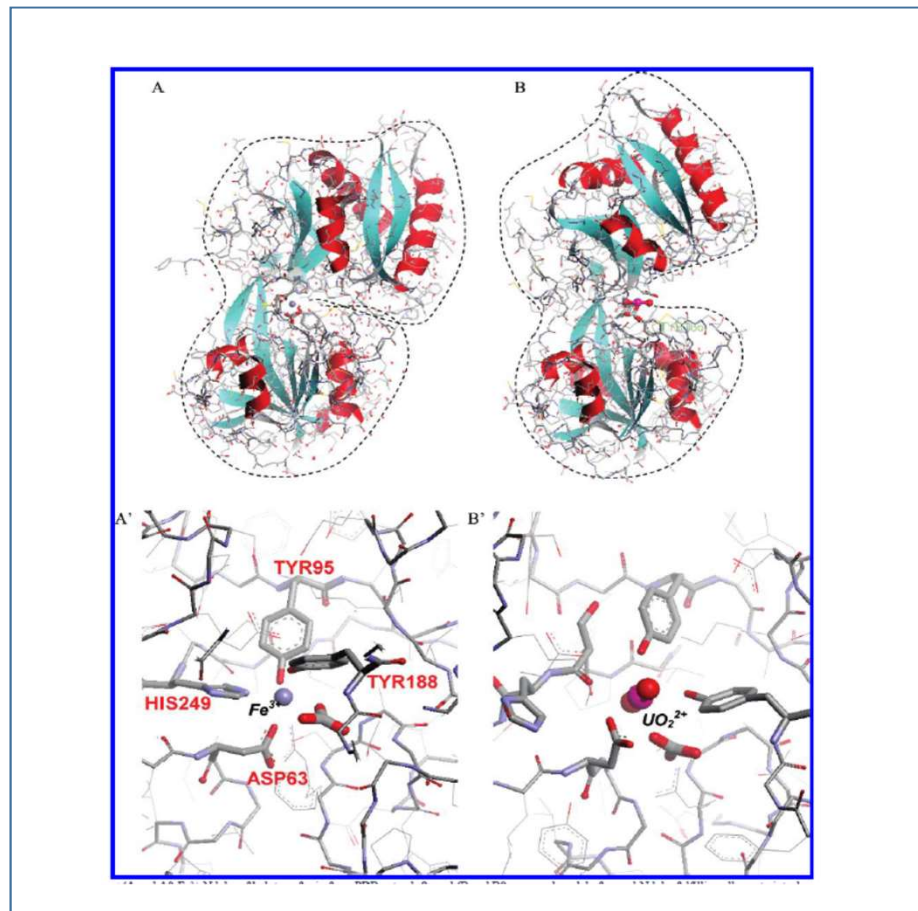
Albumine & Transferrine

Montavon et al. 2006 *J Inorg Biochem* 106, 1609

Michon et al. 2010 *J Fluoresc.* 20, 581

Stevens et al. *Radiat. Res.* 83 (1980) 109-126

DISTRIBUTION DE L'URANIUM DANS LE PLASMA SANGUIN



Albumine

Guzman Barron et al. 1948 *J. Gen. Physiol.* 32(2)
163-178

Transferrine

Scapolan et al. 1998 *Radiat Protect. Dosim.* 79,
505

Albumine & Transferrine

Montavon et al. 2006 *J Inorg Biochem* 106, 1609

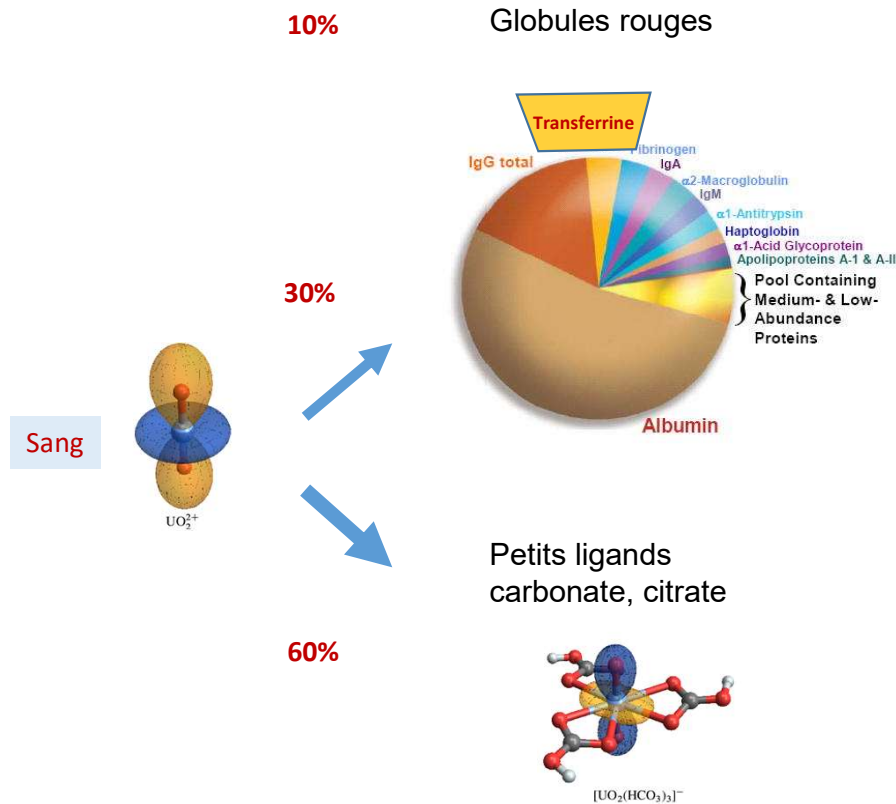
Michon et al. 2010 *J Fluoresc.* 20, 581

Transferrine oui mais

Vidaud et al. 2007 *Biochemistry* 46, 2215

.... Pas de reconnaissance par le récepteur

DISTRIBUTION DE L'URANIUM DANS LE PLASMA SANGUIN



Stevens et al. Radiat. Res. 83 (1980) 109-126

Albumine

Guzman Barron et al. 1948 J. Gen. Physiol. 32(2) 163-178

Transferrine

Scapolan et al. 1998 Radiat Protect. Dosim. 79, 505

Albumine & Transferrine

Montavon et al. 2006 J Inorg Biochem 106, 1609

Michon et al. 2010 J Fluoresc. 20, 581

Transferrine oui mais

Vidaud et al. 2007 Biochemistry 46, 2215

....pas de reconnaissance par le récepteur

Autres protéines ?

Basset et al. 2013 Chem Res Toxicol.

Averseng et al. 2010 Anal. Chem. 82, 9797

Vidaud et al. 2005 Chem Res Toxicol.



DISTRIBUTION DE L'URANIUM DANS LE PLASMA SANGUIN... REVISITÉE

**Chemical
Research in
Toxicology**

Article
pubs.acs.org/crt

C. Vidaud

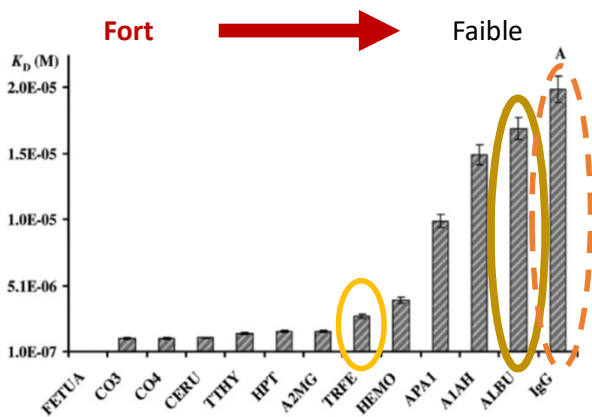
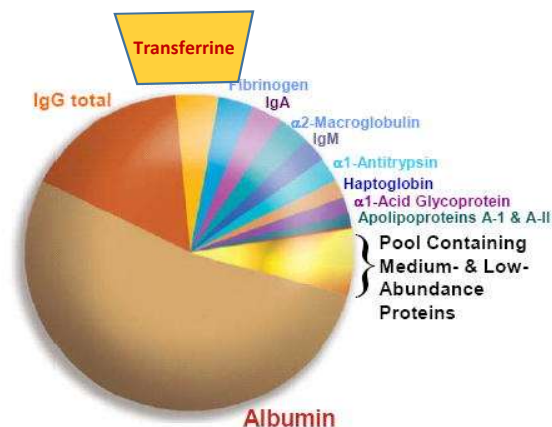
Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target?

Christian Basset,[†] Olivier Averseng,[†] Pierre-Jean Ferron,[†] Nicolas Richaud,[†] Agnès Hagège,^{†,§} Olivier Pible,[‡] and Claude Vidaud^{*,†}

[†]CEA/DSV/iBEB/SBTN, Laboratoire d'Etude des Protéines Cibles, BP 17171 30 207 Bagnols sur Cèze Cédex, France

[‡]CEA/DSV/iBEB/SBTN, Laboratoire d'Etude des Systèmes Perturbés, BP 17171 30 207 Bagnols sur Cèze Cédex, France

[§]CNRS UMR 7265, CEA/DSV/iBEB, 13108 St. Paul Les Durance, France



Affinité de différentes protéines du sérum sanguin



Modèle de biodistribution dans le sérum tenant compte de la concentration et de l'affinité relative des protéines



DISTRIBUTION DE L'URANIUM DANS LE PLASMA SANGUIN... REVISITÉE

**Chemical
Research in
Toxicology**

Article

pubs.acs.org/crt

C. Vidaud

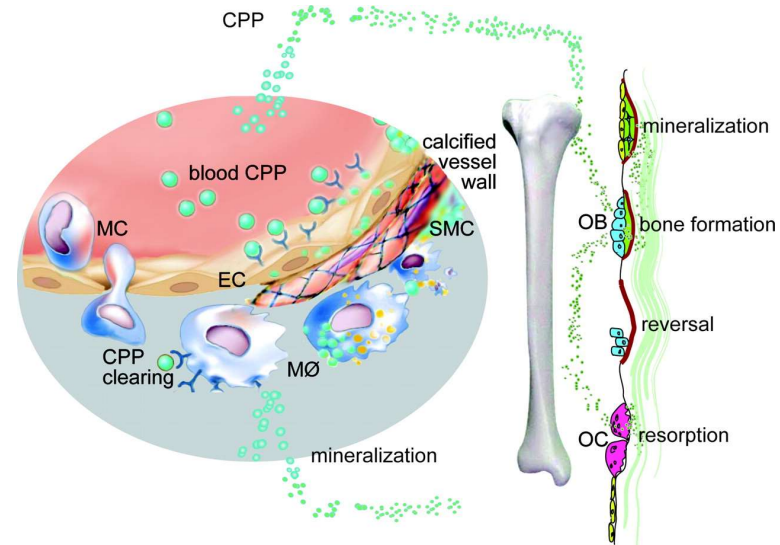
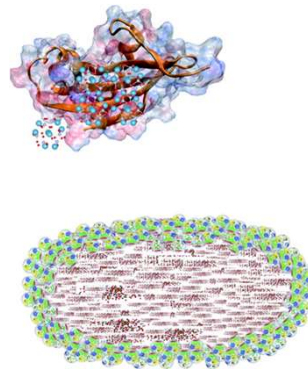
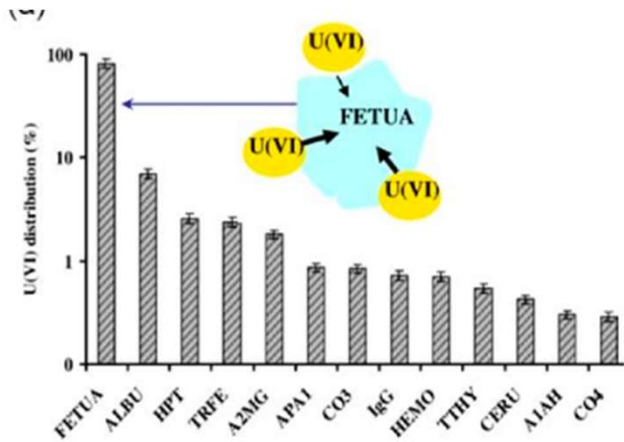
Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target?

Christian Basset,[†] Olivier Averseng,[†] Pierre-Jean Ferron,[†] Nicolas Richaud,[†] Agnès Hagège,^{†,§} Olivier Pible,[‡] and Claude Vidaud^{*,†}

[†]CEA/DSV/iBEB/SBTN, Laboratoire d'Etude des Protéines Cibles, BP 17171 30 207 Bagnols sur Cèze Cédex, France

[‡]CEA/DSV/iBEB/SBTN, Laboratoire d'Etude des Systèmes Perturbés, BP 17171 30 207 Bagnols sur Cèze Cédex, France

[§]CNRS UMR 7265, CEA/DSV/iBEB, 13108 St. Paul Les Durance, France



Jahnen-Dechent et al. 2011 Circ Res. 108:1494-1509

EFFET DE LA FIXATION D'URANIUM SUR LES PROTÉINES

Calmoduline : modification de la structure du site et perturbation des interactions formées avec les protéines cibles - perturbation de la signalisation calcique

Distribution de l'uranyle dans les protéines du sérum sanguin:
objectif majeur pour mieux comprendre les mécanismes de son accumulation dans l'os

D'autres exemples... identification comme cible de l'uranium de 7 des 10 protéines impliquées dans la glycolyse chez des modèles de cellules neurales dopaminergiques.

Archives of Toxicology (2019) 93:2141–2154
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02497-4>

INORGANIC COMPOUNDS

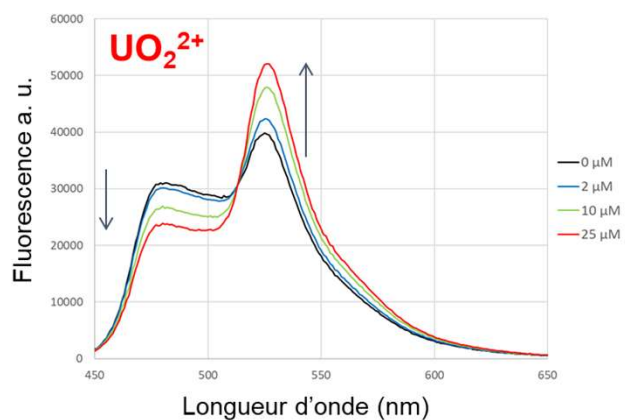
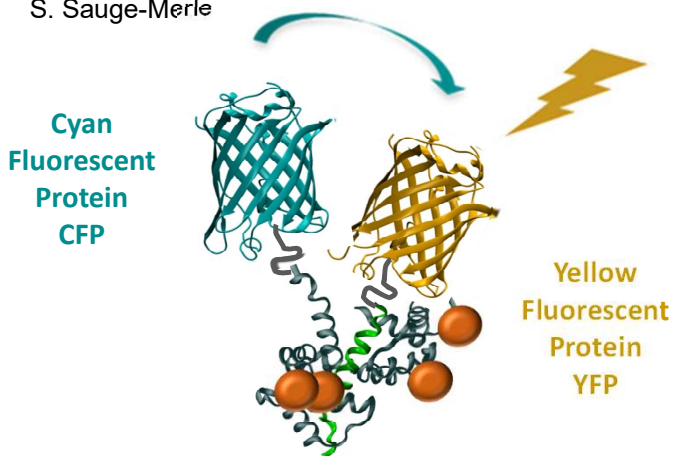
Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells

Claude Vidaud¹ · Mélanie Robert¹ · Eduardo Paredes² · Richard Ortega^{3,4} · Emilie Avazeri¹ · Lunyong⁵ · Jean-Marie Guigonis⁵ · Carole Bresson² · Véronique Malard⁶

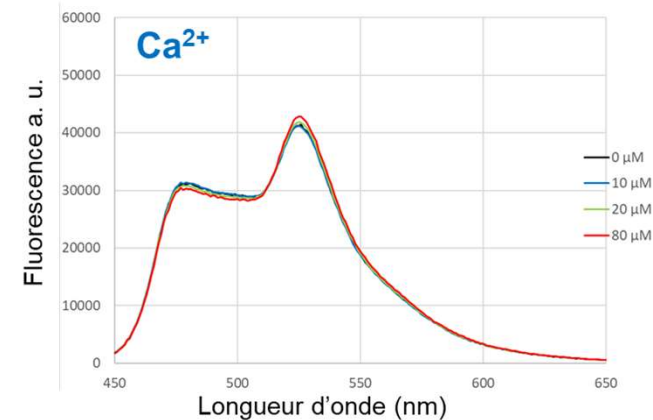


S. Sauge-Merle

EXPLOITATION DE LA CALMODULINE MODIFIÉE POUR LA DÉTECTION DE LA FRACTION BIODISPONIBLE DE L'URANIUM



Réponse à l'uranium



Selectivité vis-à-vis de Ca, K, Na, Mg, Fe

Sauge-Merle et al. ms soumis à Talanta

Pardoux et al. WO/2014/155356

Vers le développement d'un biosenseur d'uranyle exprimé dans des organismes



Remerciements

- LIPM – DSV / CEA Cadarache

BECCIA Maria-Rosa ICN Univ. Nice
PARDOUX Romain
BEHRENDORF Morgane
BREMOND Nicolas
BATTESTI Christine
LEMAIRE David
SAUGE-MERLE Sandrine
PIETTE Laurie
CHAPON Virginie
BERTHOMIEU Catherine

- Pascale DELANGLE** (IRIG / CEA Grenoble)
- Philippe GUILBAUD** (DMRC ISEC - DES / CEA Marcoule)
- Serge CROUZY** (GMCT, IRIG CEA Grenoble)
- Pier Lorenzo SOLARI** (Synchrotron SOLEIL)
- Mohamed MERROUN** (Université de Grenade, Espagne)
- Hélène JAVOT** (LBDP – DSV / CEA Cadarache)
- Fabienne MEROLA** (LCP-BIO – Université Paris Sud)
- Jean AUPIAIS** (DAM/DIF, CEA)
- Marguerite MONFORT** (DAM/DIF, CEA)



NEEDS Ressources / PoDIUm



BIAM-UMR 7265
INSTITUT DE BIOSCIENCES
& BIOTECHNOLOGIES
D'AIX-MARSEILLE



Aix-Marseille
université
Socialement engagée



Merci pour votre attention



BIAM-UMR 7265
INSTITUT DE BIOSCIENCES
& BIOTECHNOLOGIES
D'AIX-MARSEILLE



Aix-Marseille
université
Socialement engagée