

LA CHIMIE BIO-INORGANIQUE AU SERVICE DES INTERACTIONS METAUX- VIVANT

Pascale DELANGLE

Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS (UMR 5819), France



Présentation

1989 - 1993 : Filière sciences de la matière option chimie à l'ENS Lyon
Agrégation de sciences physiques option chimie

1996 : Thèse en chimie supramoléculaire – ENS Lyon – Récepteurs phosphorés d'ions métalliques

Physico-Chimiste

1997 : Chercheure au **CEA Grenoble** – Reconnaissance des ions métalliques

- 1997 – 2002 : Séparation lanthanides/actinides dans le cadre du retraitement du combustible nucléaire usé
- 2002 – 2019 : Métaux dans le vivant
Développement de peptides liant les métaux pour des applications en biologie

**Expertise en
chimie des métaux**

Chimie-Biologie

**Acquisition de
connaissance en
biologie**

Présentation



Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé

Physique

Chimie

Biologie

Unité Mixte de Recherche (UMR 5819)



Instituts de Physique
et de Chimie



Direction de la Recherche
Fondamentale



Pôle CBS et PEM

Introduction : la chimie bio-inorganique

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?



Complexes inorganiques en lien avec la biologie

Introduction : la chimie bio-inorganique

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

*Des métaux très nombreux et
aux propriétés très variées...*

The periodic table is color-coded by groups, with a legend at the bottom:

- Alkali Metal** (Red)
- Alkaline Earth** (Orange)
- Transition Metal** (Yellow)
- Basic Metal** (Green)
- Semimetal** (Light Blue)
- Nonmetal** (Blue)
- Halogen** (Purple)
- Noble Gas** (Dark Purple)
- Lanthanide** (Light Green)
- Actinide** (Dark Green)

The table includes elements from Hydrogen (1) to Oganesson (118), with the Lanthanide and Actinide series shown below the main body.

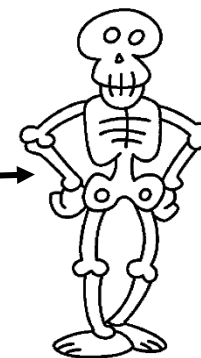
Introduction : la chimie bio-inorganique

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux physiologiques

*Composition pour une
personne
de ~ 70 kg*

Sodium (Na ⁺)	105 g
Potassium (K ⁺)	140 g
Calcium (Ca²⁺)	1050 g
Vanadium	0,02 g
Manganèse	0,02 g
Fer	4,2 g
Cuivre	0,11 g
Zinc	2,3 g
...	



Biominéralisation des os
et des dents
Hydroxyapatites



Introduction : la chimie bio-inorganique

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

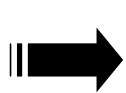
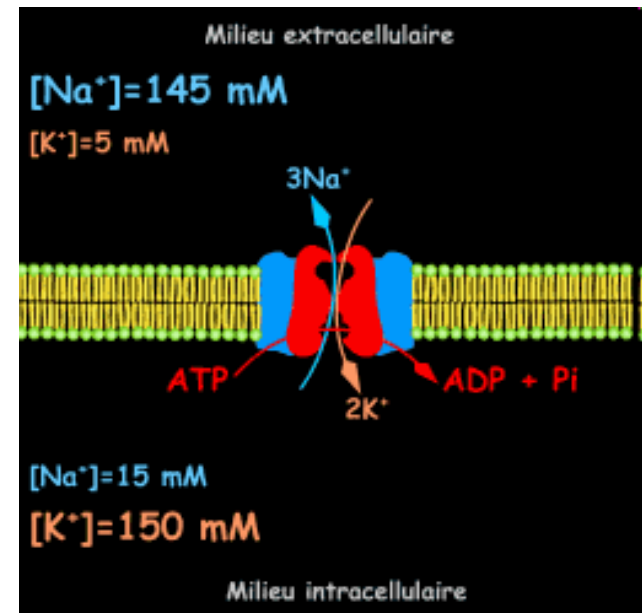
Métaux physiologiques

Na^+ K^+ Mg^{2+} Ca^{2+}

Respect de l'équilibre de charge entre

le milieu extracellulaire

le milieu intracellulaire



Régulation du pH (transfert de H⁺)

Contraction musculaire (Ca^{2+} , Na^+ et K^+)

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

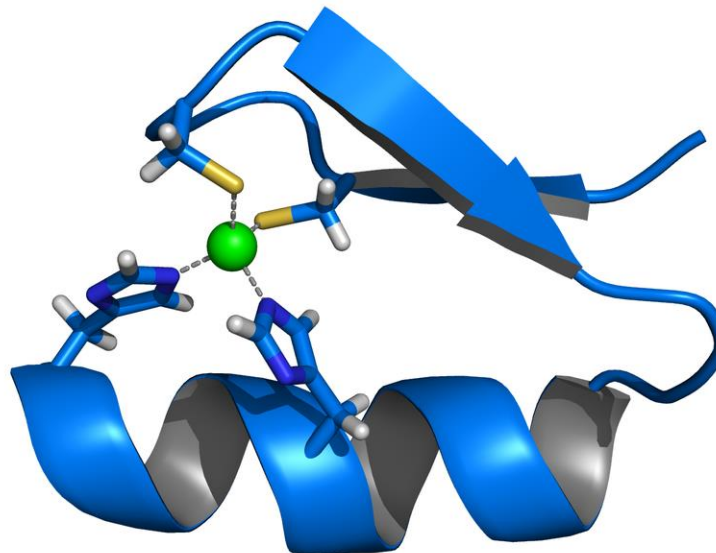
Métaux physiologiques



Rôle structural dans les protéines à doigt de zinc
($\approx 10\%$ de toutes les protéines humaines)

Feuillet β

Hélice α



⇒ Interaction
avec ADN...

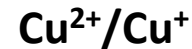
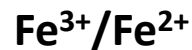


Activation de
processus
biologiques

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux physiologiques “rédox”

Oscillation entre deux états rédox
⇒ centres actifs dans les métallo-enzymes



⇒ Réactivité

Introduction : la chimie bio-inorganique

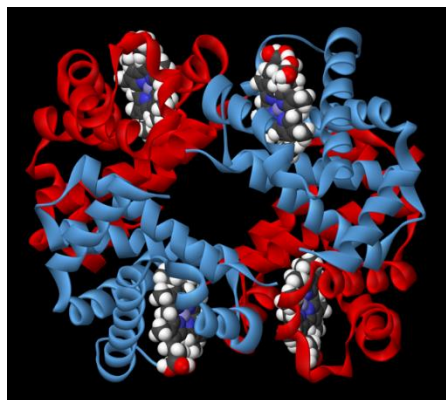
Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux physiologiques

“rédox”

$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

hémoglobine

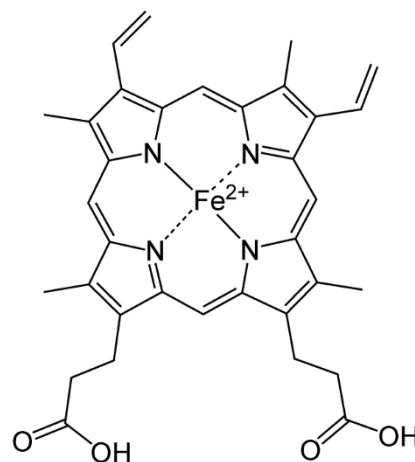


$PM \sim 65000$

4 chaînes
polypeptidiques

+

4 groupes
hèmes



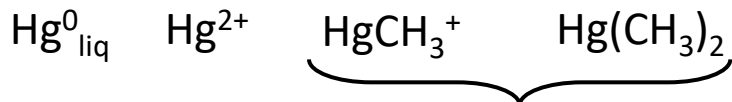
⇒ Transport de
l'oxygène

Introduction : la chimie bio-inorganique

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux toxiques

Mercure (Hg) $\Rightarrow$ hydrargisme



Organomercures =
Formes très toxiques
(plus lipophiles)

$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ utilisé pour traiter les peaux des
chapeaux

$\Rightarrow$ chapelier fou de Lewis Carroll



Minamata : Rejet de méthylmercure au
Japon en 1956

Plomb (Pb) $\Rightarrow$ saturnisme

Tuyauteries de distribution de l'eau potable

Uranium (U) $\Rightarrow$ roches granitiques
 $\Rightarrow$ industrie nucléaire



Plutonium (Pu) $\Rightarrow$ industrie nucléaire

Etc...

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux médicaments

Lithium (Li)

⇒ Antidépresseur

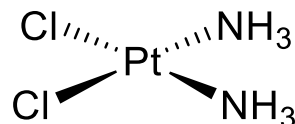
Argent (Ag)

⇒ Antimicrobien
Antifongique

Platine (Pt)

⇒ Anticancéreux

1978 aux États-Unis et en 1983 en France



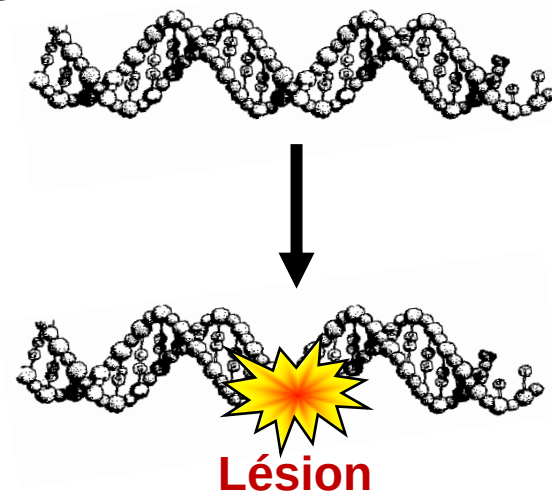
Le Cis-Pt se lie à l'ADN

Recherche d'agents
anticancéreux plus
sélectifs et
n'induisant pas de
résistance

Résistance!!

Mort de la cellule cancéreuse

Réparation



Introduction : la chimie bio-inorganique

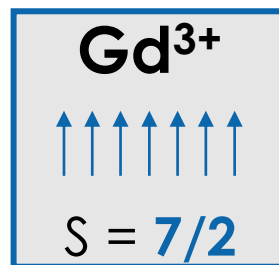
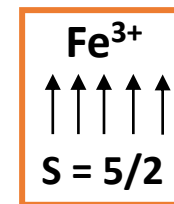
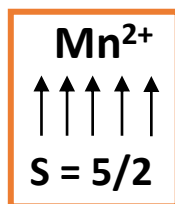
Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux médicaments

Gadolinium (Gd) $\Rightarrow$ Agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Perturbateur du signal **magnétique**

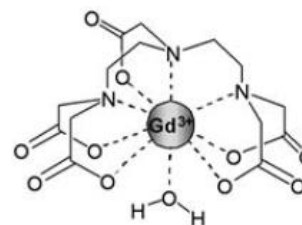
Composés paramagnétiques



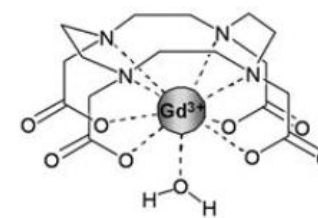
L'ion Gd³⁺
est toxique



Chélates de Gd³⁺
très stables



GdDTPA(H₂O)²⁻

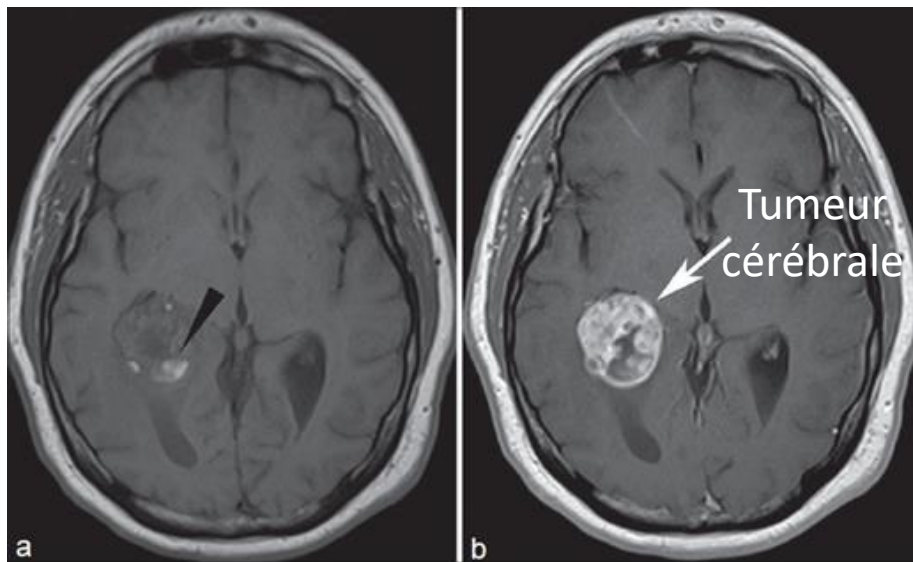


GdDOTA(H₂O)⁻

Quel rôle pour les métaux dans le vivant?

Métaux médicaments

Gadolinium (Gd) $\Rightarrow$ Agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)



Sans AC

Avec AC



Recherche de
nouveaux agents non
toxiques, plus
efficaces, ciblés

Introduction : la chimie bio-inorganique

Modéliser les protéines

Comprendre le rôle des métaux dans le vivant (interactions, réactivité)

Sondes à base de métaux

i.e. complexes de Gd^{3+} pour l'IRM
Diagnostic médical

Chimie Bio-inorganique ?

Comprendre et combattre la toxicité

Agents décorporants des métaux pour la détoxification

Complexes bio-inspirés

Activation de petites molécules (i.e. pour la conversion du CO_2)



Complexes inorganiques en lien avec la biologie

Introduction : la chimie bio-inorganique

Discipline à
l'interface
Chimie - Biologie

**Comportement des
métaux dans le
vivant** (physiologiques,
toxiques, médicaments)

**Chimie
Bio-inorganique
?**

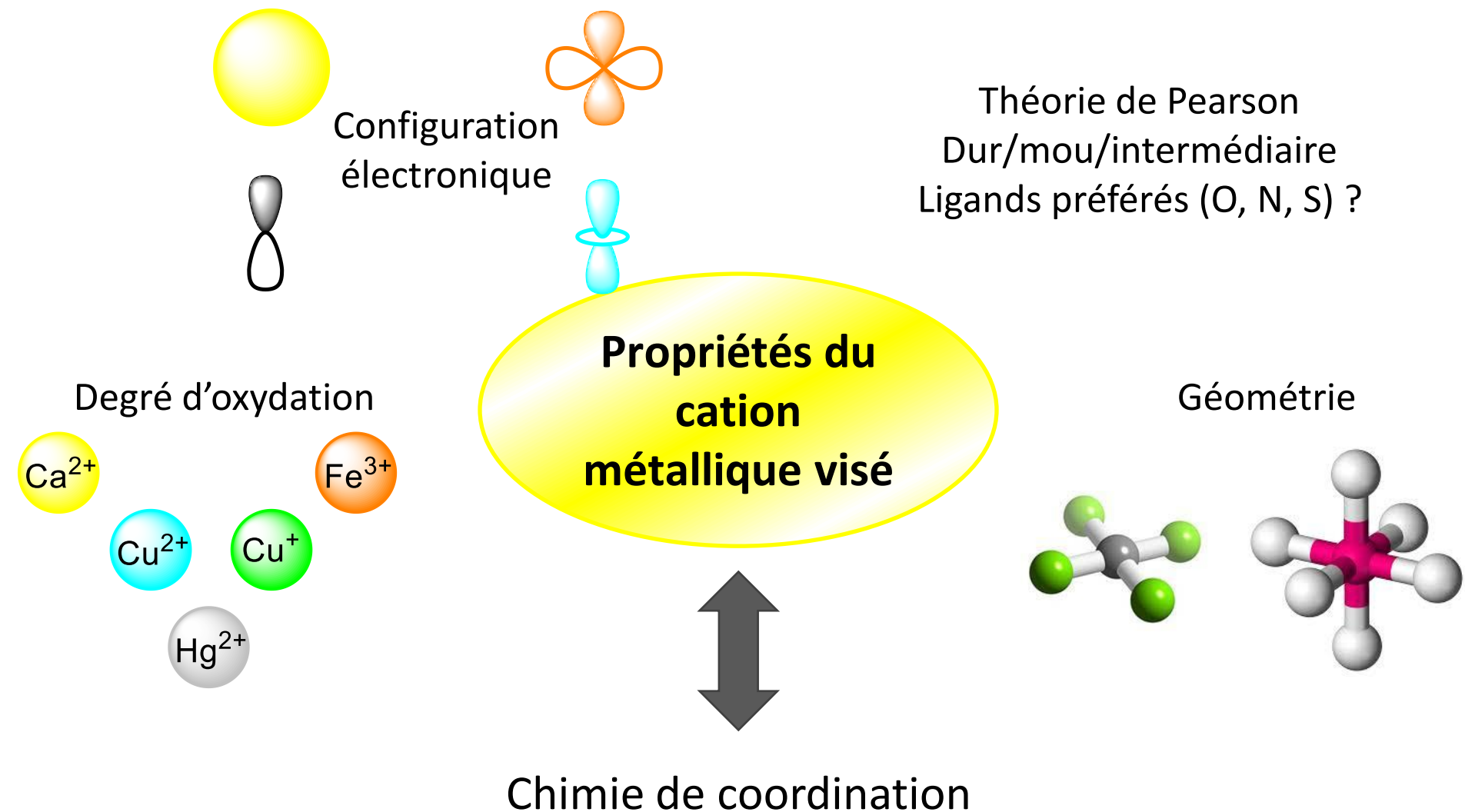
Spéciation
Forme du métal dans
les conditions visées
(en biologie ou
applications)

**Le vivant
comme
source d'inspiration**

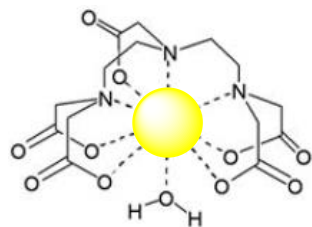


Complexes inorganiques en lien avec la biologie

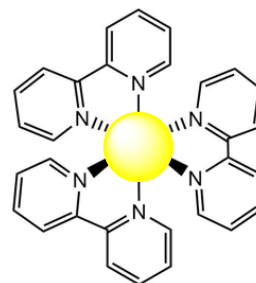
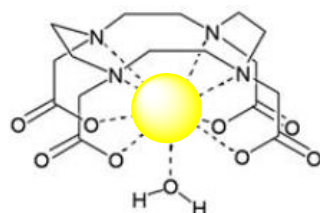
Introduction : la chimie bio-inorganique



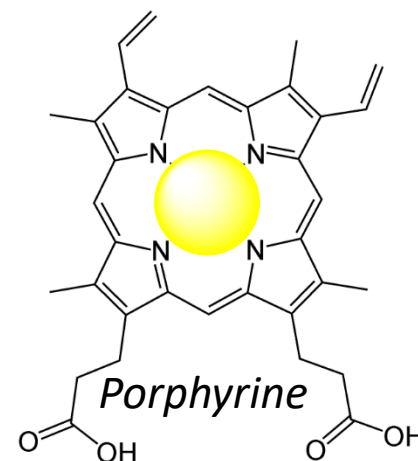
Introduction : la chimie bio-inorganique



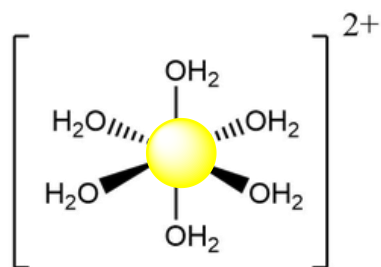
Polyaminocarboxylates



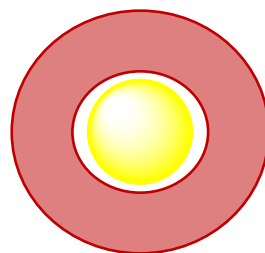
Bipyridine



Porphyrine



Eau



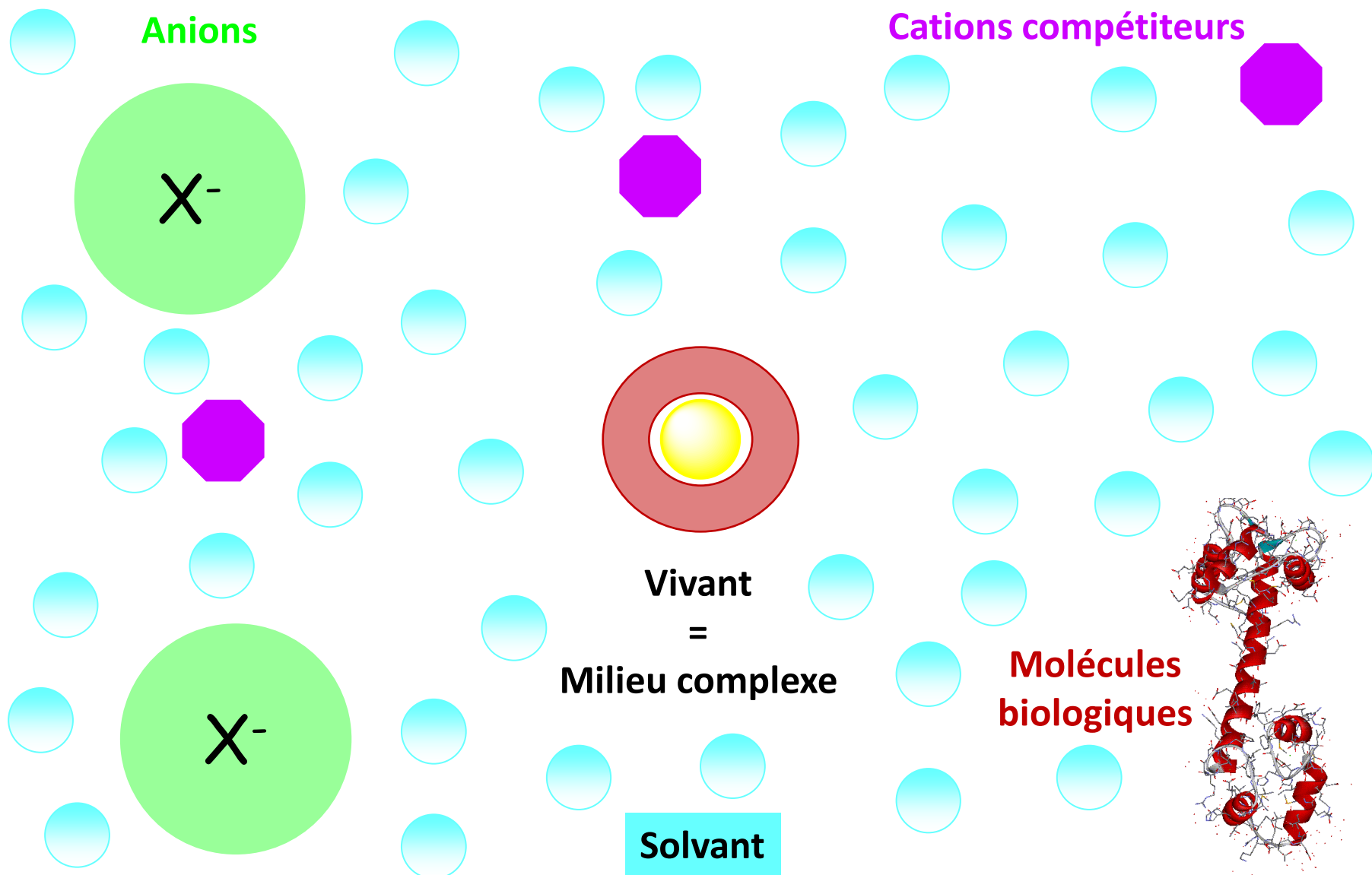
Complexe métallique

Ligand = molécule interagissant avec l'ion métallique



Chimie de coordination

Introduction : la chimie bio-inorganique



Grandes lignes de la conférence

⇒ Introduction : la chimie bio-inorganique

⇒ **Approches « peptides »**

- Protéines et peptides naturels
- Bio-mimétisme
- Pré-organisation

⇒ **Toxicité de l'uranium et protéines cibles**

- Compréhension de la toxicité chimique
- Identification des sites de liaison dans le vivant

⇒ **Chélation du cuivre et maladie de Wilson**

- Mimer les sites à cuivre
- Concevoir des chélateurs pour traiter la maladie de Wilson

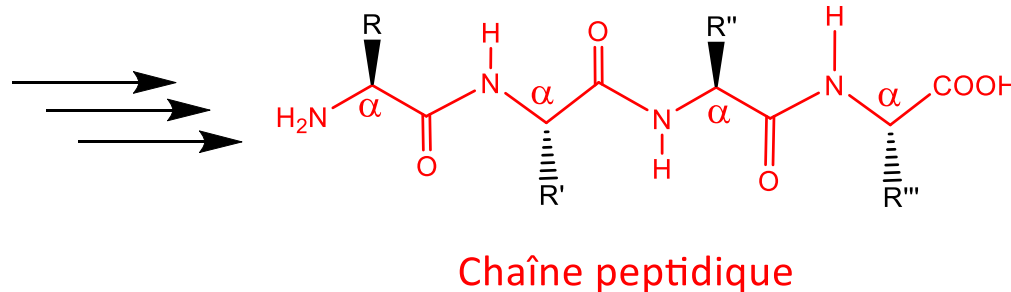
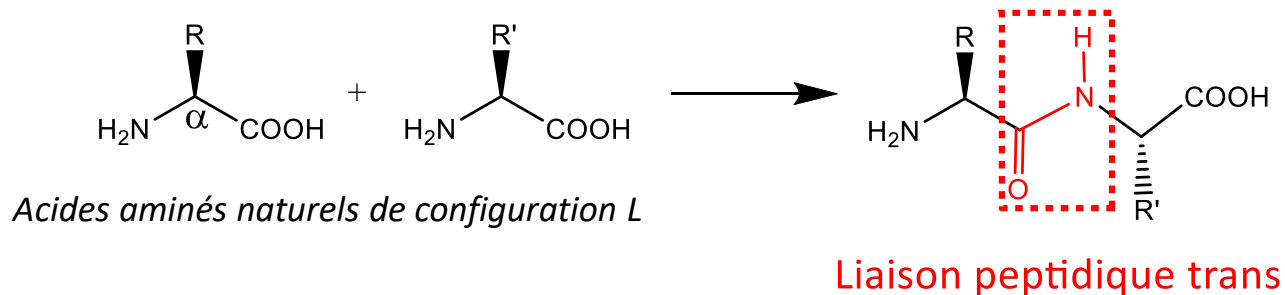
Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Macromolécule biologique constituée d'une ou plusieurs chaînes
polypeptidiques

=

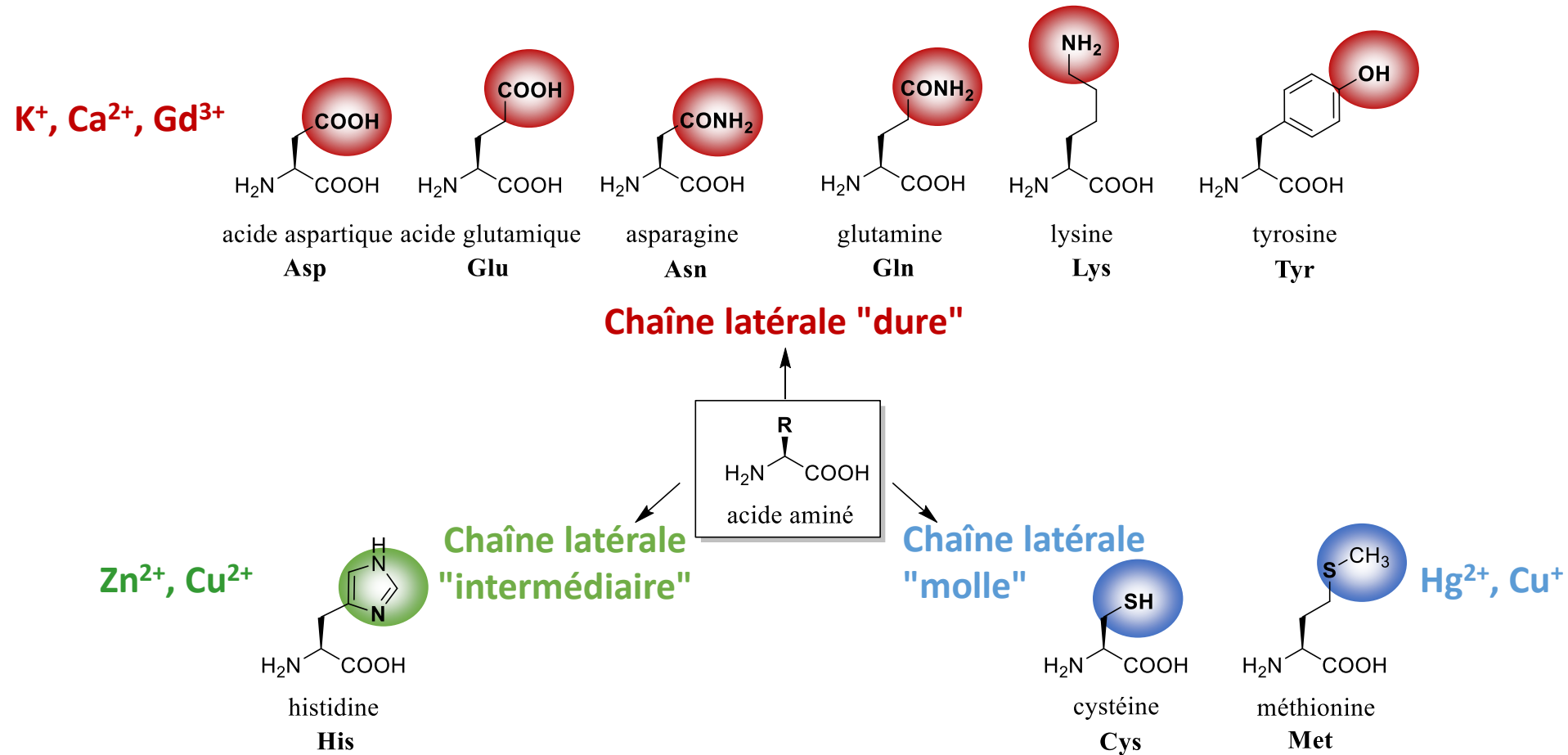
Acides aminés liés entre eux par des **liaisons peptidiques**



Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Les briques élémentaires sont les acides aminés

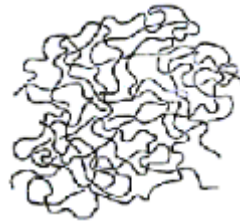


Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Eléments de structure dans les protéines

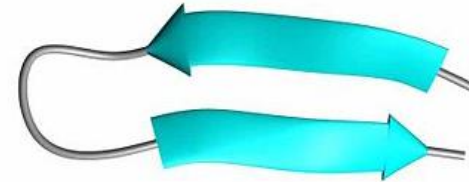
Pelotes statistiques



Hélices



Feuillet β



Organisation spatiale de la protéine

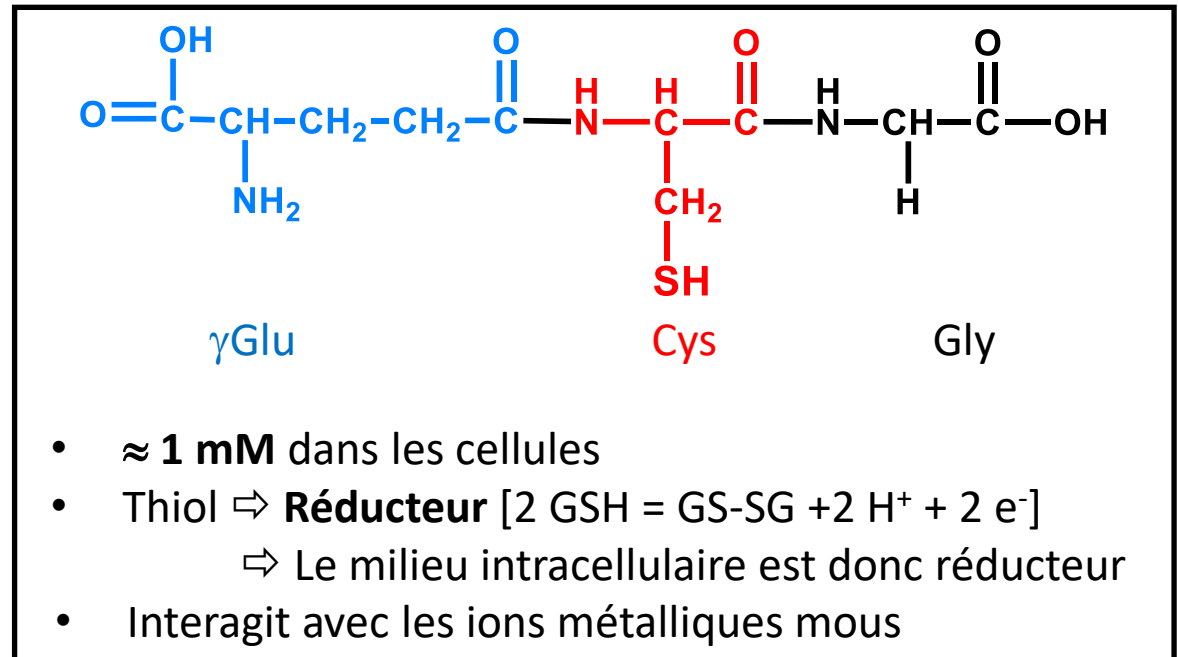
Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Protéines de plus petite taille

Existe-t-il des peptides naturels jouant un rôle biologique ?

Glutathion (GSH)
Tripeptide γ GluCysGly



Le glutathion est un constituant essentiel des cellules ("tampon rédox")

Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Protéines de plus petite taille

Existe-t-il des peptides naturels jouant un rôle biologique ?

Peptide Amyloïde bêta ($A\beta$)

40 – 42 acides aminés

Produit dans le cerveau

Dépôt de plaques amyloïdes

⇒ Signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer

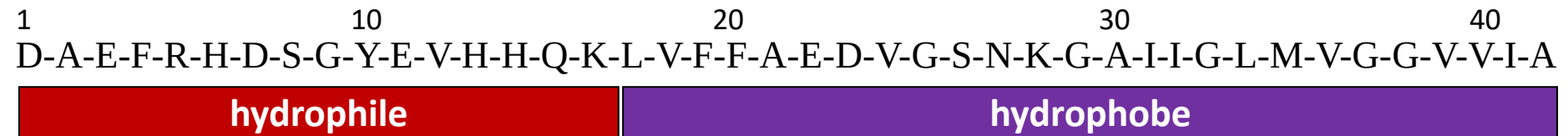
Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Protéines de plus petite taille

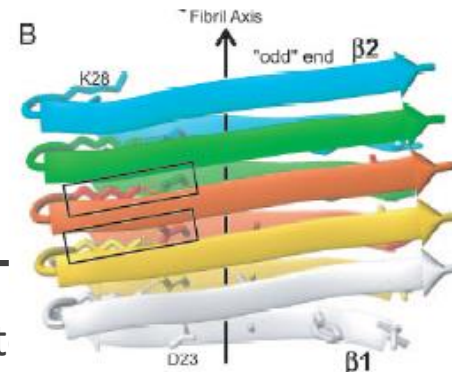
Existe-t-il des peptides naturels jouant un rôle biologique ?

Peptide Amyloïde bêta ($A\beta$)



$A\beta_{1-16}$ = Peptide soluble qui interagit avec les ions métalliques
 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{+}

Séquence hydrophobe = responsable de l'agrégation



Structures en feuillets β

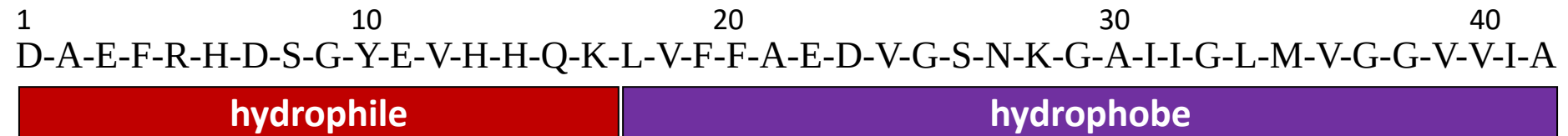
Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Protéines de plus petite taille

Existe-t-il des peptides naturels jouant un rôle biologique ?

Peptide Amyloïde bêta (A β)



Nombreux débats sur
le rôle et la toxicité
du peptide A β .
Ses interactions avec
les métaux...

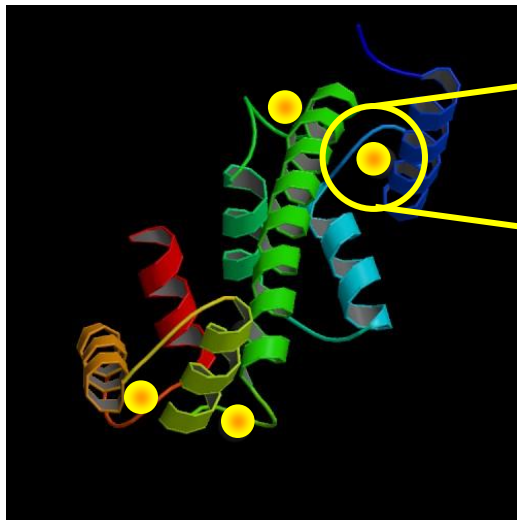
Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Mimes de protéines



Séquences linéaires extraites des protéines



Zoom sur la **boucle de liaison** du Ca^{2+} dans la calmoduline

- ⇒ Extraction d'une **séquence de la protéine**
- ⇒ **Pas/peu de structure secondaire**
- ⇒ Ne mime pas toutes les interactions si sites distants
- ⇒ **Coût entropique** élevée dû à la réorganisation de la chaîne peptidique lors de la complexation
- ⇒ **Complexes peu stables** à pH physiologique

Approches « peptides »

Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Mimes de protéines



Séquences "préorganisées" conçues *de novo*

- ⇒ Ne sont pas extraites de la séquence de la protéine
- ⇒ Design permettant la **pré-orientation des chaînes latérales des acides aminés vers l'ion métallique**
- ⇒ **Mime la forme liée de l'ion** avec des acides aminés bien choisis
- ⇒ **Plus grande affinité** pour les ions métalliques si le design est bien pensé et adapté aux propriétés de coordination de l'ion

"Peptide Design"

Approches « peptides »

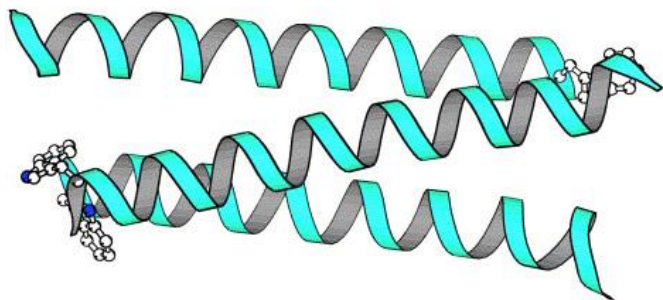
Protéines = Ligands biologiques privilégiés des ions métalliques

Peptides = Mimes de protéines



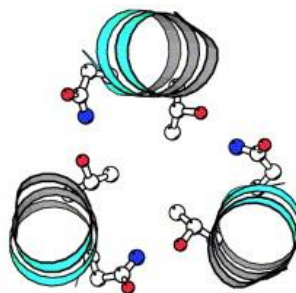
Séquences "pré-organisées" conçues *de novo*

Exploiter des structures particulières...

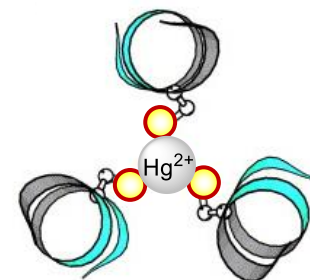


Faisceau de triple hélice peptidique
Maintenu par des interactions
faibles

Pecoraro et al.



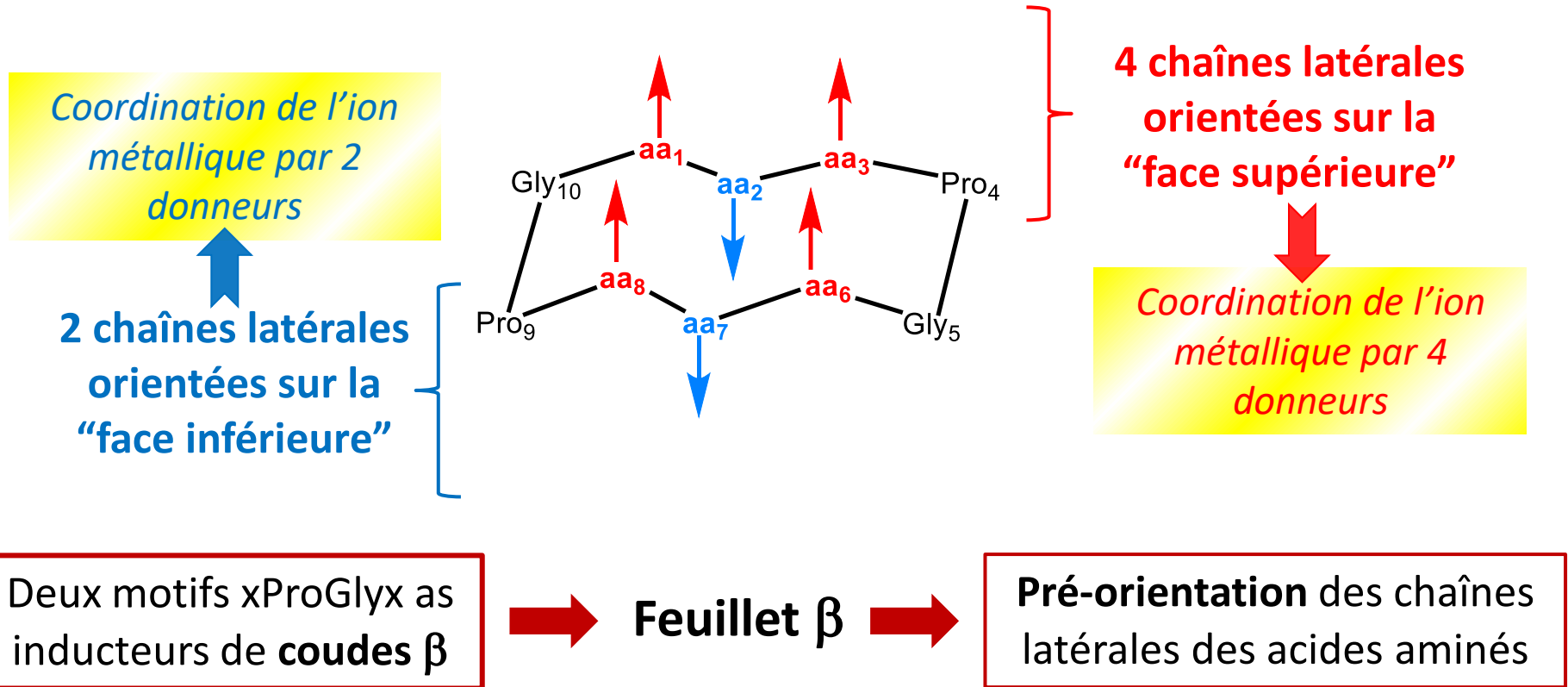
Insertion d'une cystéine
par chaîne peptidique
● = S



... pour stabiliser
des modes de
coordination
inhabituelle
i.e. HgS_3

Approches « peptides »

1^{ère} approche au SyMMES : plateforme peptidique pré-organisée



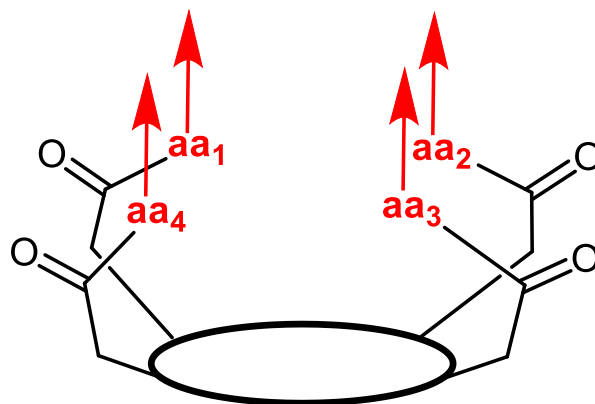
Peluso, ChemBioChem, 2001
Boturyn, J. Pept. Sci., 2008

Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2011
Delangle, Dalton Trans., 2012

Approches « peptides »

2^{ème} approche au SyMMES : pseudopeptides

2-4 chaînes latérales
orientées vers l'ion
métallique



*Couplage peptidique
entre les acides aminés
et la plate-forme
chimique*

**Plate-forme chimique pour
ancrer les acides aminés**



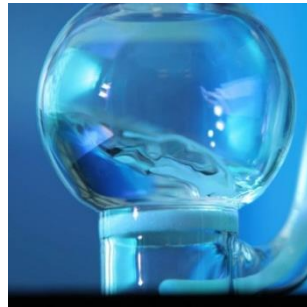
*Modulation du nombre de
donneurs potentiels*

Vahrenkamp, Inorg. Chem. 2002

Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2009
Delange, Dalton Trans., 2012

Méthodologie

- **Synthèse** de ligands de type peptides **solubles dans l'eau**
 - Synthèse peptidique
 - Purification par HPLC
- **Spéciation** des complexes métalliques
 - Quelles sont les espèces formées?
 - Constantes thermodynamiques d'équilibre
 - Spéciation à pH physiologique
 - pH-métrie
 - UV/Fluo/CD
 - Dosages
- **Caractérisation** des espèces métalliques
 - Structure du peptide
 - Sphère de coordination du métal
 - RMN en solution
 - Spectroscopie d'Absorption X
 - XANES - EXAFS



Eau
pH physiologique (pH $\approx$ 7)
NaCl 0,16 mol.L⁻¹

Approches « peptides »

Deux exemples de métaux très différents étudiés au SyMMES

Cuivre

Métal essentiel



Toxique si
dérégulé

Uranium

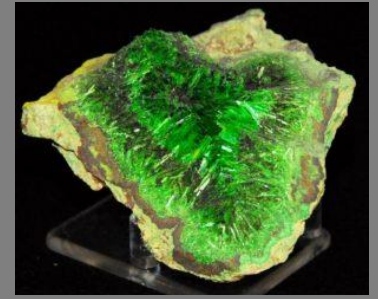
Actinide



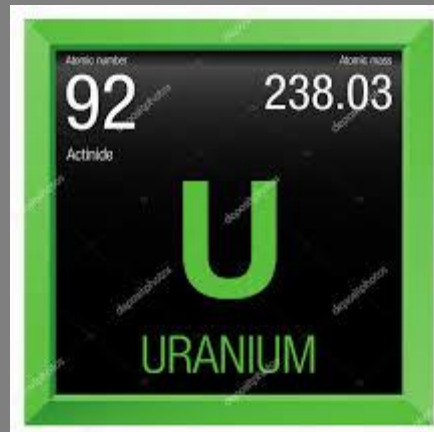
Toxicité chimique et
radiologique

Quelles sont les formes pertinentes
de ces métaux *in vivo* ?

Comment prendre en considération leurs propriétés de coordination ?



Toxicité de l'uranium et protéines cibles



Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Uranium = métal lourd
Elément naturel de plus haut
numéro atomique

The periodic table displays elements from Hydrogen (1) to Oganesson (118). Uranium (92) is highlighted in green and labeled with its atomic number 92. The table is color-coded by groups: Alkali Metals (red), Alkaline Earths (orange), Transition Metals (yellow), Basic Metals (green), Semimetals (light blue), Nonmetals (blue), Halogens (purple), Noble Gases (dark purple), Lanthanides (light green), and Actinides (dark green). The Lanthanide and Actinide series are shown below the main table.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VII B	VIII	VIII	VIII	IB	IIB	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	VIIIA
1 H Hydrogen 1.008																	2 He Helium 4.003
3 Li Lithium 6.941	4 Be Beryllium 9.012											5 B Boron 10.811	6 C Carbon 12.011	7 N Nitrogen 14.007	8 O Oxygen 15.999	9 F Fluorine 18.998	10 Ne Neon 20.180
11 Na Sodium 22.990	12 Mg Magnesium 24.305											13 Al Aluminum 26.982	14 Si Silicon 28.086	15 P Phosphorus 30.974	16 S Sulfur 32.066	17 Cl Chlorine 35.453	18 Ar Argon 39.948
19 K Potassium 39.098	20 Ca Calcium 40.078	21 Sc Scandium 44.956	22 Ti Titanium 47.88	23 V Vanadium 50.942	24 Cr Chromium 51.996	25 Mn Manganese 54.938	26 Fe Iron 55.933	27 Co Cobalt 58.933	28 Ni Nickel 58.693	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.39	31 Ga Gallium 69.732	32 Ge Germanium 72.61	33 As Arsenic 74.922	34 Se Selenium 78.972	35 Br Bromine 79.904	36 Kr Krypton 84.80
37 Rb Rubidium 84.468	38 Sr Strontium 87.62	39 Y Yttrium 88.906	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.906	42 Mo Molybdenum 95.95	43 Tc Technetium 98.907	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.906	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.868	48 Cd Cadmium 112.411	49 In Indium 114.818	50 Sn Tin 118.71	51 Sb Antimony 121.760	52 Te Tellurium 127.6	53 I Iodine 126.904	54 Xe Xenon 131.29
55 Cs Cesium 132.905	56 Ba Barium 137.327	57-71 Lanthanide Series	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.948	74 W Tungsten 183.85	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.22	78 Pt Platinum 195.08	79 Au Gold 196.967	80 Hg Mercury 200.59	81 Tl Thallium 204.383	82 Pb Lead 207.2	83 Bi Bismuth 208.980	84 Po Polonium [209]	85 At Astatine [210]	86 Rn Radon [222]
87 Fr Francium [223]	88 Ra Radium [226]	89-103 Actinide Series	104 Rf Rutherfordium [261]	105 Db Dubnium [262]	106 Sg Seaborgium [266]	107 Bh Bohrium [264]	108 Hs Hassium [269]	109 Mt Meitnerium [268]	110 Ds Darmstadtium [271]	111 Rg Roentgenium [272]	112 Cn Copernicium [277]	113 Uut Ununtrium [278]	114 Fl Flerovium [289]	115 Uup Ununpentium [288]	116 Lv Livermorium [293]	117 Uus Ununseptium [294]	118 Uuo Ununoctium [294]

Lanthanide Series

57 La Lanthanum 138.906	58 Ce Cerium 140.115	59 Pr Praseodymium 140.908	60 Nd Neodymium 144.913	61 Pm Promethium [145]	62 Sm Samarium 150.36	63 Eu Europium 151.966	64 Gd Gadolinium 157.25	65 Tb Terbium 158.925	66 Dy Dysprosium 162.50	67 Ho Holmium 164.930	68 Er Erbium 167.26	69 Tm Thulium 168.934	70 Yb Ytterbium 173.04	71 Lu Lutetium 174.967
----------------------------------	-------------------------------	-------------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Actinide Series

89 Ac Actinium 227.028	90 Th Thorium 232.038	91 Pa Protactinium 231.036	92 U Uranium 238.03	93 Np Neptunium 237.048	94 Pu Plutonium 244.064	95 Am Americium 243.061	96 Cm Curium 247.070	97 Bk Berkelium 247.070	98 Cf Californium 251.080	99 Es Einsteinium [252]	100 Fm Fermium 257.095	101 Md Mendelevium 258.1	102 No Nobelium 259.101	103 Lr Lawrencium [262]
---------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------	------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	-------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Legend:

- Alkali Metal
- Alkaline Earth
- Transition Metal
- Basic Metal
- Semimetal
- Nonmetal
- Halogen
- Noble Gas
- Lanthanide
- Actinide

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Energie nucléaire → actinides (U, Pu, Np, Am)

→ Toxicité **Radiologique** et chimique



*Sources de contamination à l'uranium naturel
(faiblement radioactif)*

Mines d'uranium à ciel ouvert
Uranium appauvri pour les applications militaires
Utilisation extensive des engrais phosphatés



**Exposition chronique
à des doses faibles
d'uranium naturel**

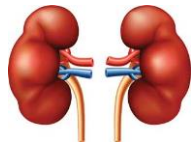


**Toxicité chimique
de l'U ?**

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

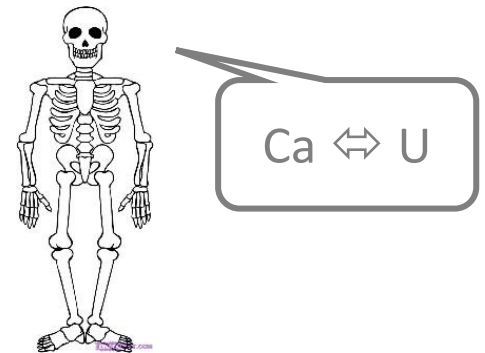
Intoxication à l'uranium → **La 1^{ère} cible est le sang**

→ Reins



Néphrotoxicité

→ Squelette osseux



Accumulation sur le long terme

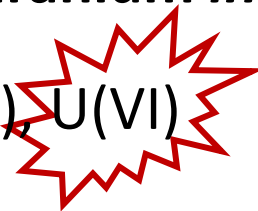
- ⇒ Perturbation de l'homéostasie des os
- ⇒ Fragilisation des os

A l'échelle moléculaire ?

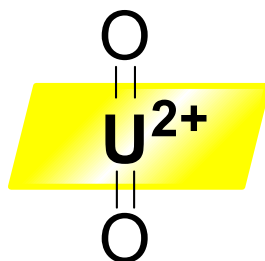
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Quelle est la forme de l'uranium *in vivo* ?

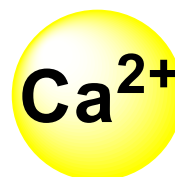
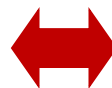
U(III), U(IV), U(V), U(VI)



U^{VI} dans le
cation uranyle



Cation Dur



Interactions fortes avec
des atomes d'oxygènes
préférentiellement
chargés négativement

Coordination dans le
plan équatorial

≠

Coordination
isotrope

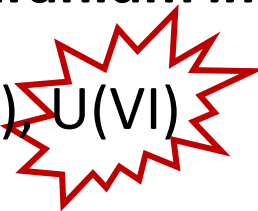
UO_2^{2+} possède des propriétés de coordination très spécifiques (2 groupes oxo)

⇒ Coordination dans le plan équatorial par 4-6 donneurs

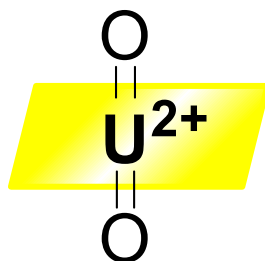
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Quelle est la forme de l'uranium *in vivo* ?

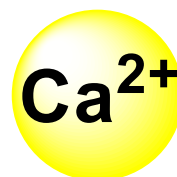
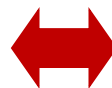
U(III), U(IV), U(V), U(VI)



U^{VI} dans le
cation uranyle

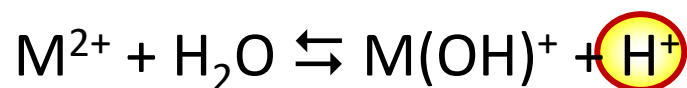


Cation Dur



Interactions fortes avec
des atomes d'oxygènes
préférentiellement
chargés négativement

Autre différence importante = hydrolyse à des pH très faibles



Acidité du cation métallique

pH > 3-4

pH > 11

L'hydrolyse de l'uranyle joue un rôle clé à pH physiologique

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Uranium *in vivo*

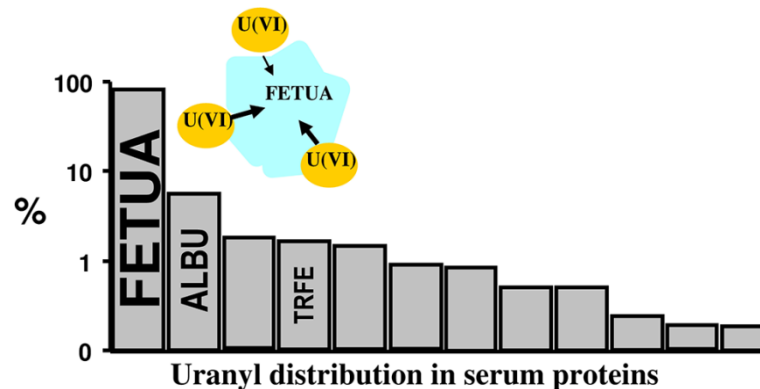
Dans le sang, UO_2^{2+} est lié aux protéines plasmatiques :

⇒ Albumine, Transferrine, **Féтуine**

↓
La plus abondante

↓
Fixe Fe^{3+}

Protéine impliquée dans la **minéralisation des os**
Peu abondante mais très forte affinité pour UO_2^{2+}



Arveseng, Anal. Chem., 2010

Basset, Chem. Res. Toxicol., 2012

Kazanecki, J. Cell. Biochem., 2007

Vidaud, Chem. Res. Toxicol., 2005

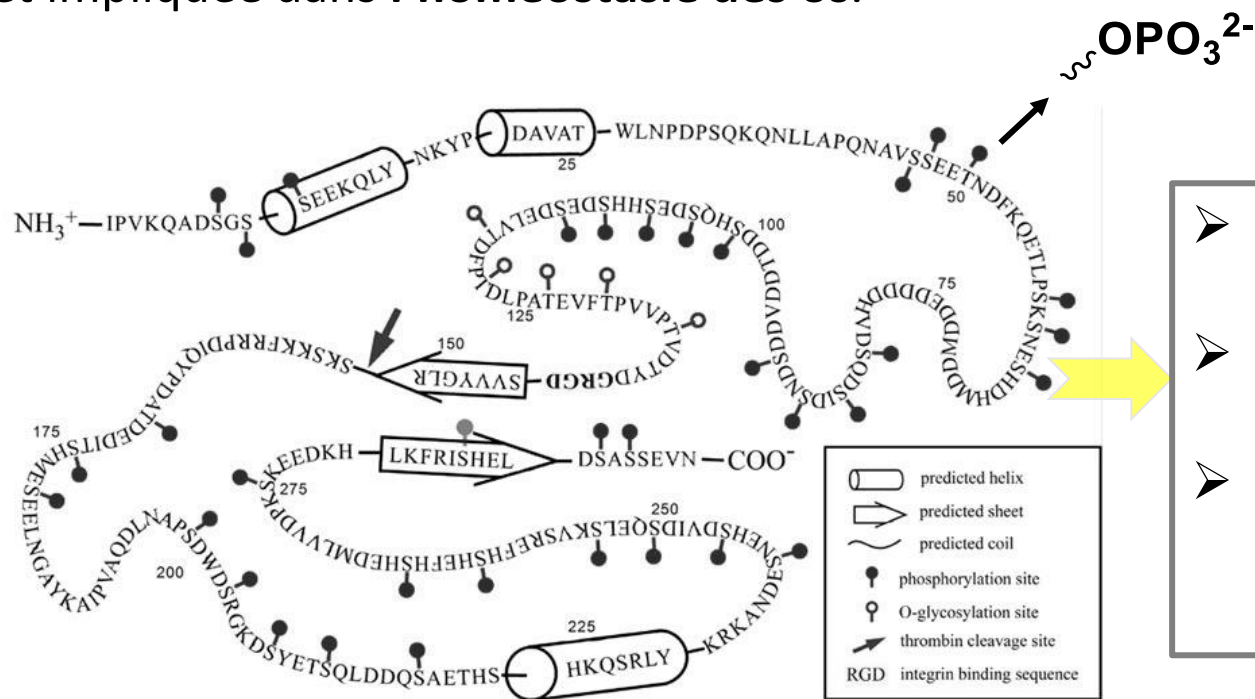
Vidaud, Chem. Res. Toxicol., 2013

Qi, Metallomics, 2014

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Uranium *in vivo*

⇒ **Ostéopontine** : protéine hyperphosphorylée exprimée dans les cellules osseuses et impliquée dans l'homéostasie des os.



- Forte affinité pour l'uranyle
- Liée aux phosphorylations
- Cette protéine déstructurée acquiert une structure lors de la liaison de l'uranyle

Arveseng, Anal. Chem., 2010

Basset, Chem. Res. Toxicol., 2012

Kazanecki, J. Cell. Biochem., 2007

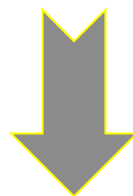
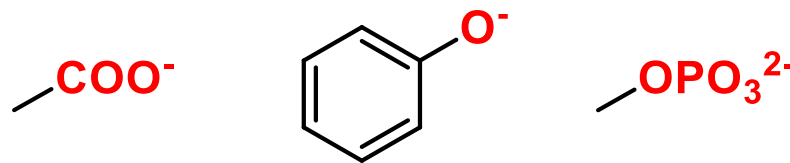
Vidaud, Chem. Res. Toxicol., 2005

Vidaud, Chem. Res. Toxicol., 2013

Qi, *Metallomics*, 2014

Les sites de liaison de l'uranyle dans les protéines sont inconnus !

Asp – Glu – Tyr – pSer – pThr

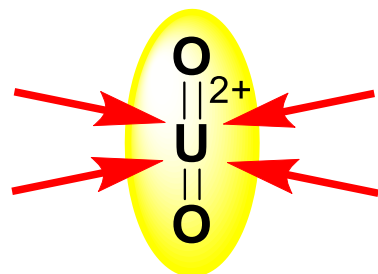


Absence de structure de complexes d'uranyle sur les protéines entières

⇒ Proposition de **modèles simples** des protéines cibles pour caractériser les sites de liaison de UO_2^{2+}

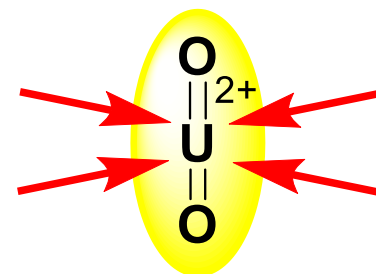
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Peptides Biomimétiques liant l'uranyle

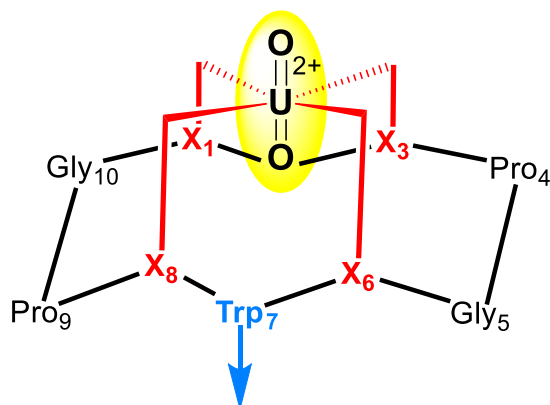


Séquences "pré-organisées" conçues *de novo*

Et adaptées à la coordination de l'uranyle dans le plan équatorial



1^{ère} approche : plateforme peptidique pré-organisée



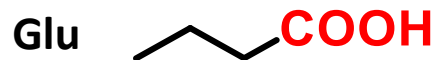
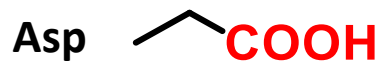
➡ *Quels acides aminés en position 1, 3, 6 et 8 pour coordonner l'uranyle ?*

➡ *Insertion d'un tryptophane en position 7 (acide aminé fluorescent permettant de détecter la formation des complexes)*

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

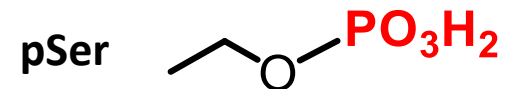
➡ *Quels acides aminés en position 1, 3, 6 et 8 pour coordonner l'uranyle ?*

Acides aminés acides



Carboxylates
(COO⁻)

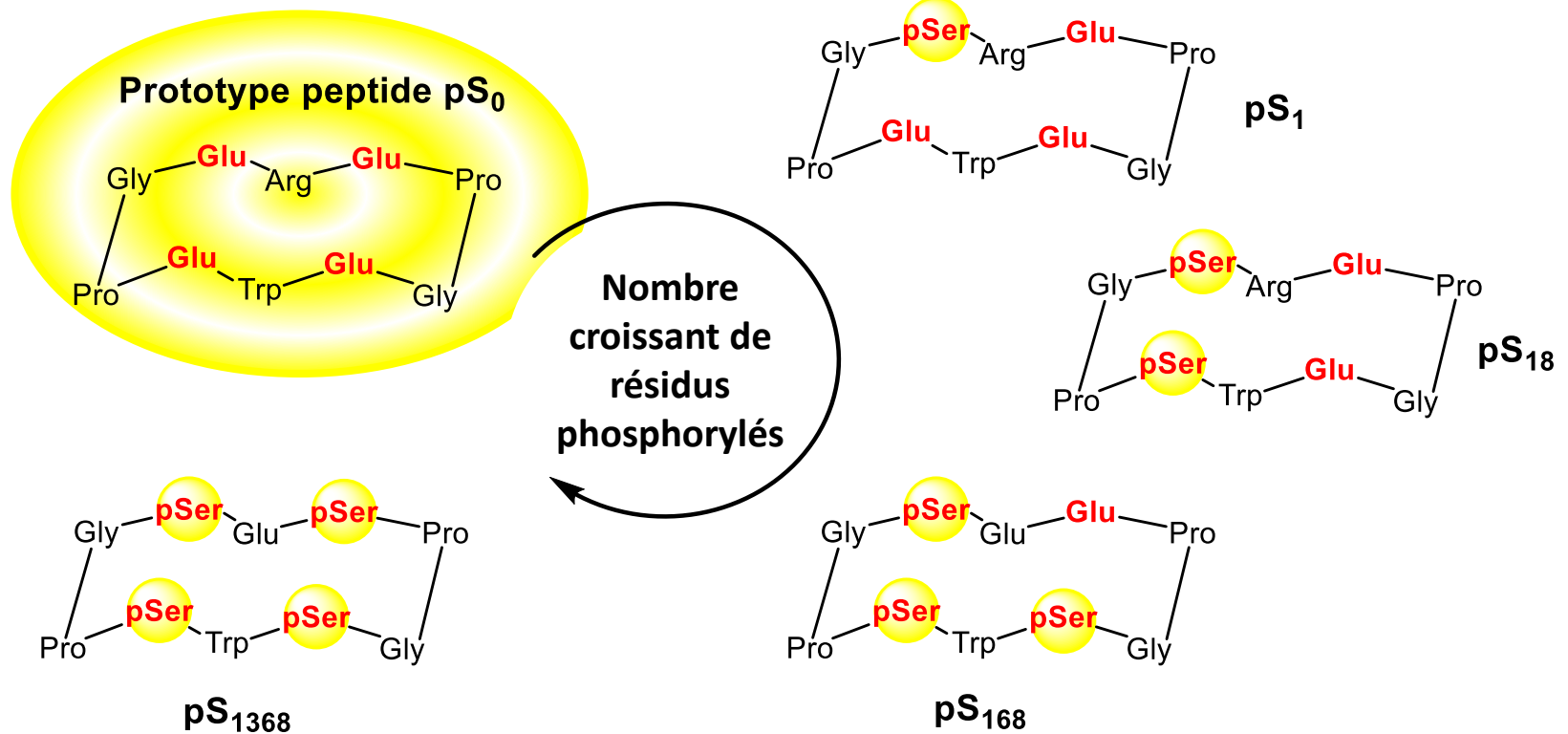
Acides aminés phosphorylés



Phosphates
(PO₃²⁻)

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Est-ce que la coordination a bien lieu par les
4 chaînes latérales dans le **plan équatorial** de
l'uranyle ?



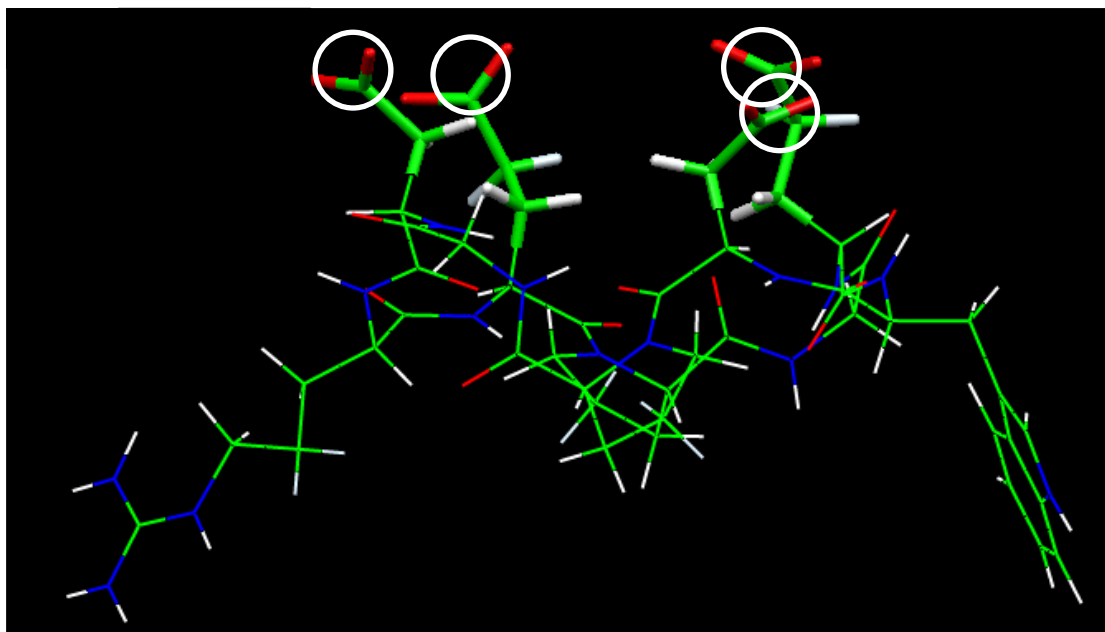
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

1^{ère} étape : validation de la plate-forme pour la coordination de l'uranyle
La structure est-elle adaptée à UO_2^{2+} ?

⇒ Structure déterminée par **RMN en solution** dans l'eau

Structure de plus basse énergie obtenue à partir des contraintes RMN

Malgré une certaine flexibilité, les 4 chaînes latérales de la “face supérieure” sont correctement orientées pour la complexation de l'ion métallique



Bonnet, Fries, Crouzy, Sénèque, Cisnetti, Boturyn, Dumy, Delangle, *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 7083-93

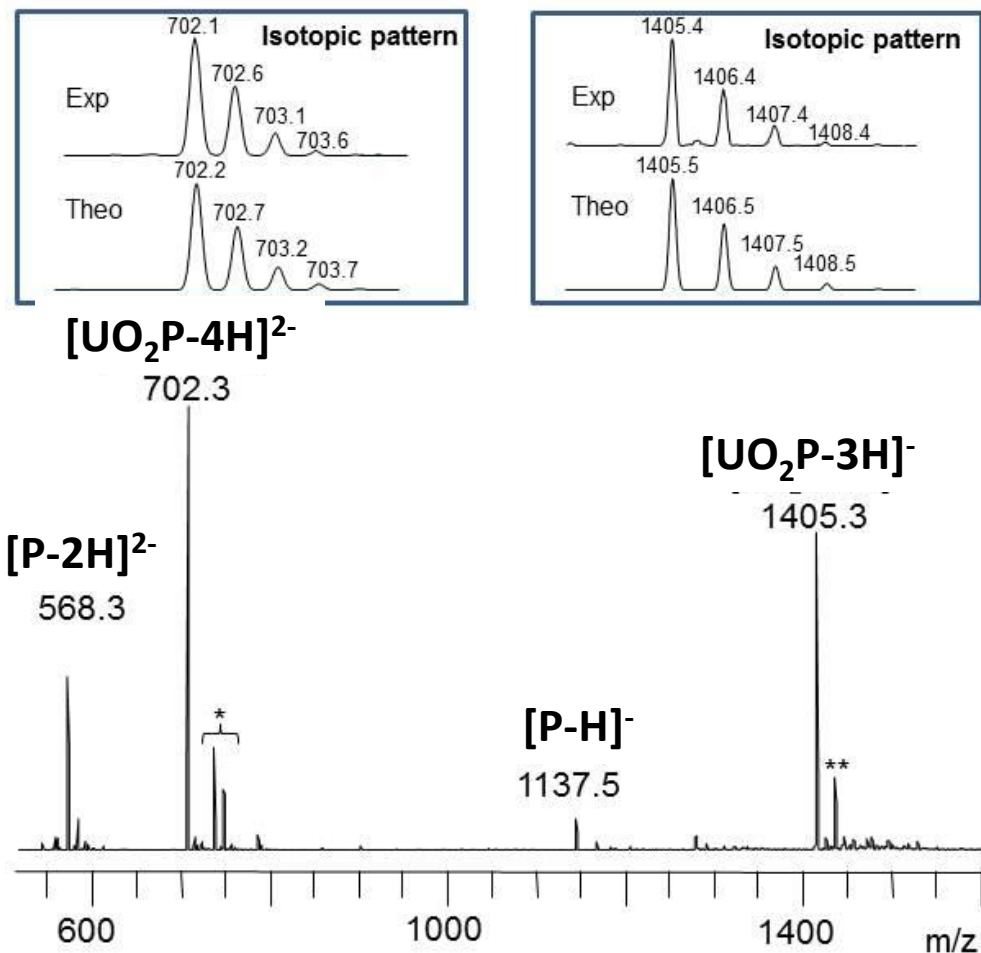
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Complexation de l' UO_2^{2+} : analyse par ESI-MS

ESI-MS : spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray

Détection du rapport m/z des ions formés dans la source

Formation du complexe $\text{UO}_2\text{-P}$ attendu

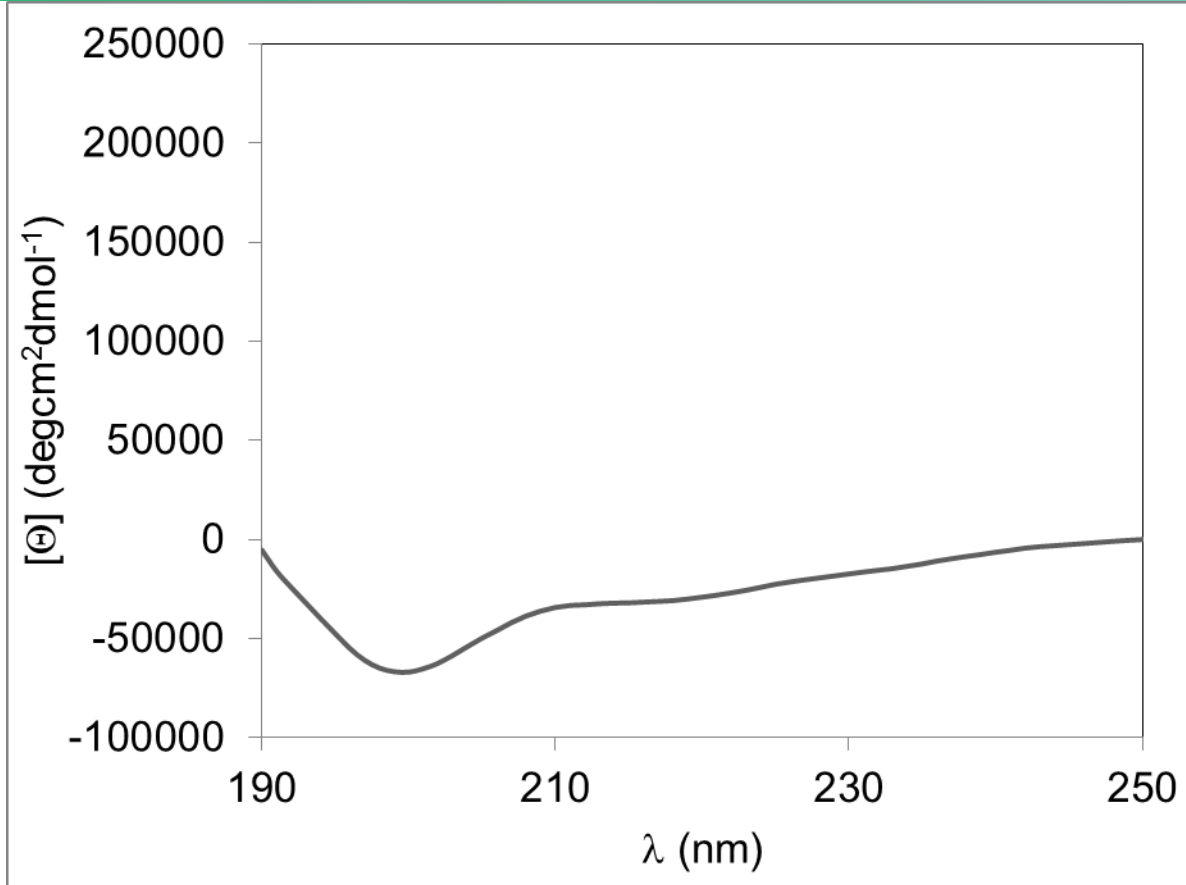


Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Analyse par Dichroïsme Circulaire (CD)

Absorption de molécules chirales en lumière polarisée

⇒ Sensible à la structure secondaire du peptide



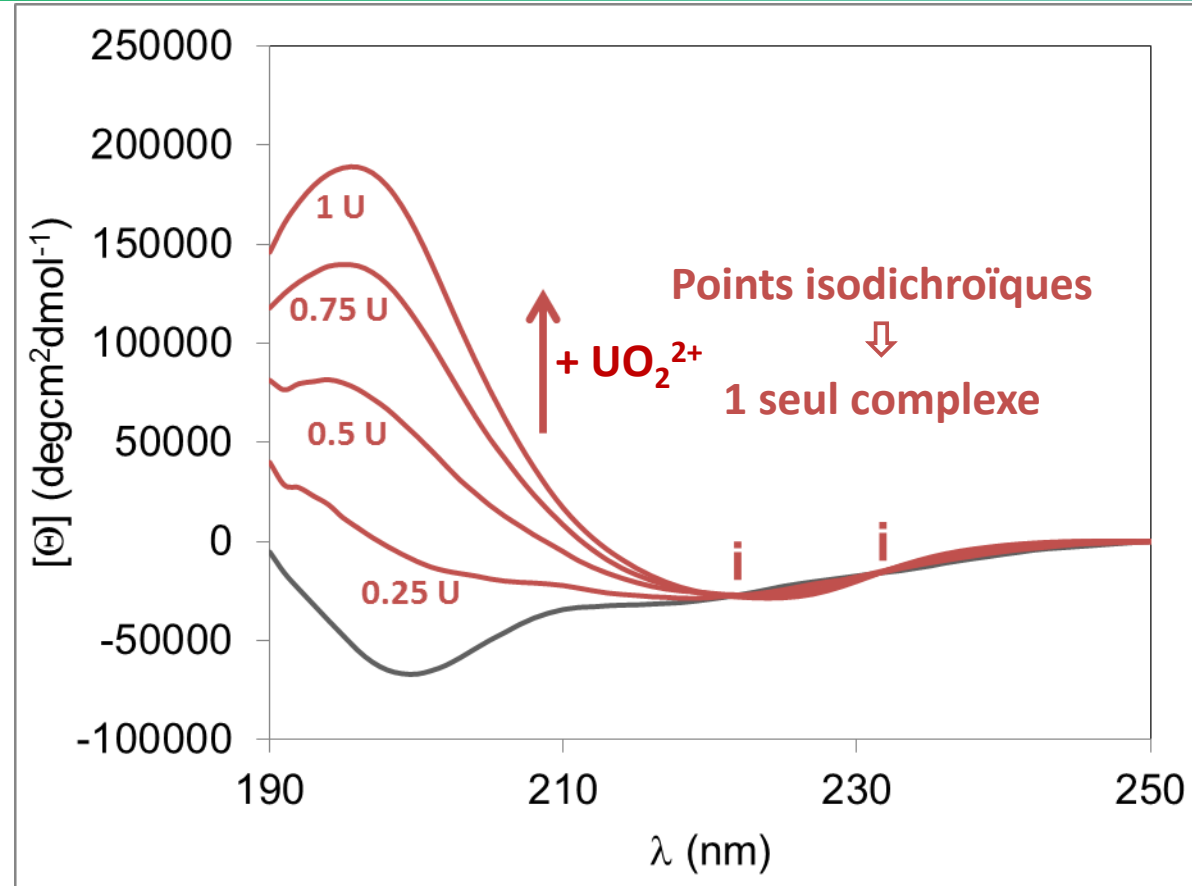
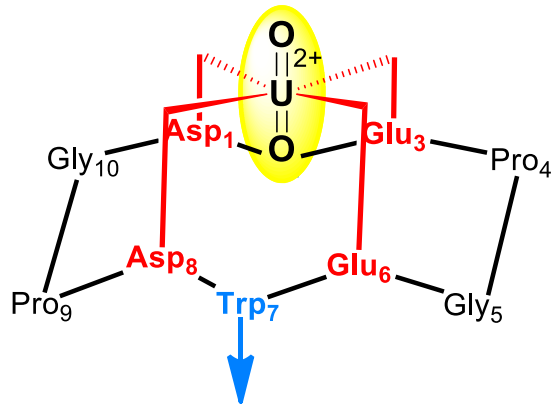
pH6 ⇒ Absence de structure

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Analyse par Dichroïsme Circulaire (CD)

Absorption de molécules chirales en lumière polarisée

⇒ Sensible à la structure secondaire du peptide



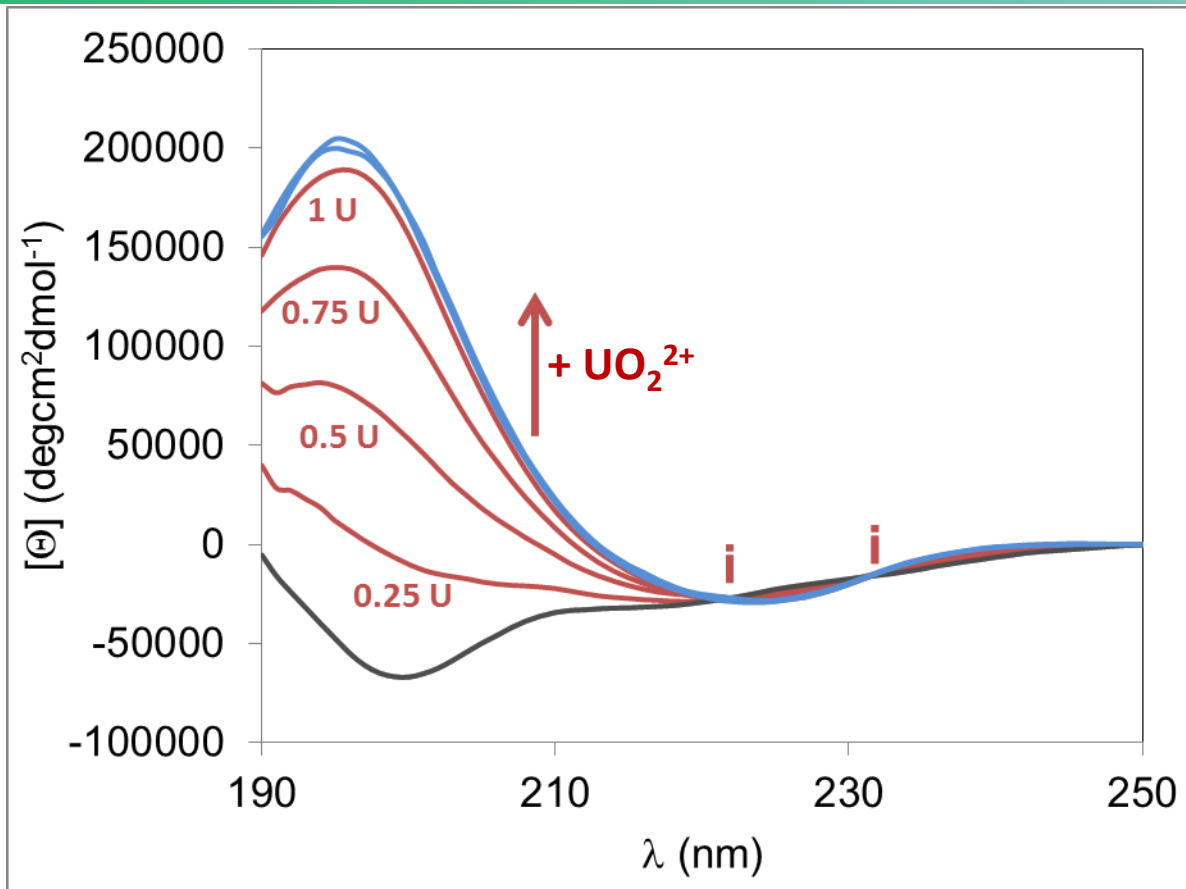
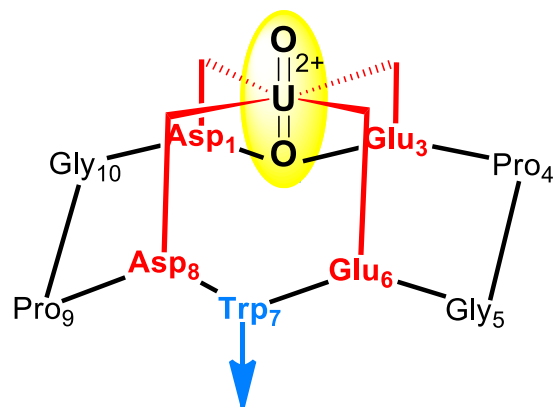
pH6 ⇒ Absence de structure
Formation du Feuille β dans le complexe

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Analyse par Dichroïsme Circulaire (CD)

Absorption de molécules chirales en lumière polarisée

⇒ Sensible à la structure secondaire du peptide



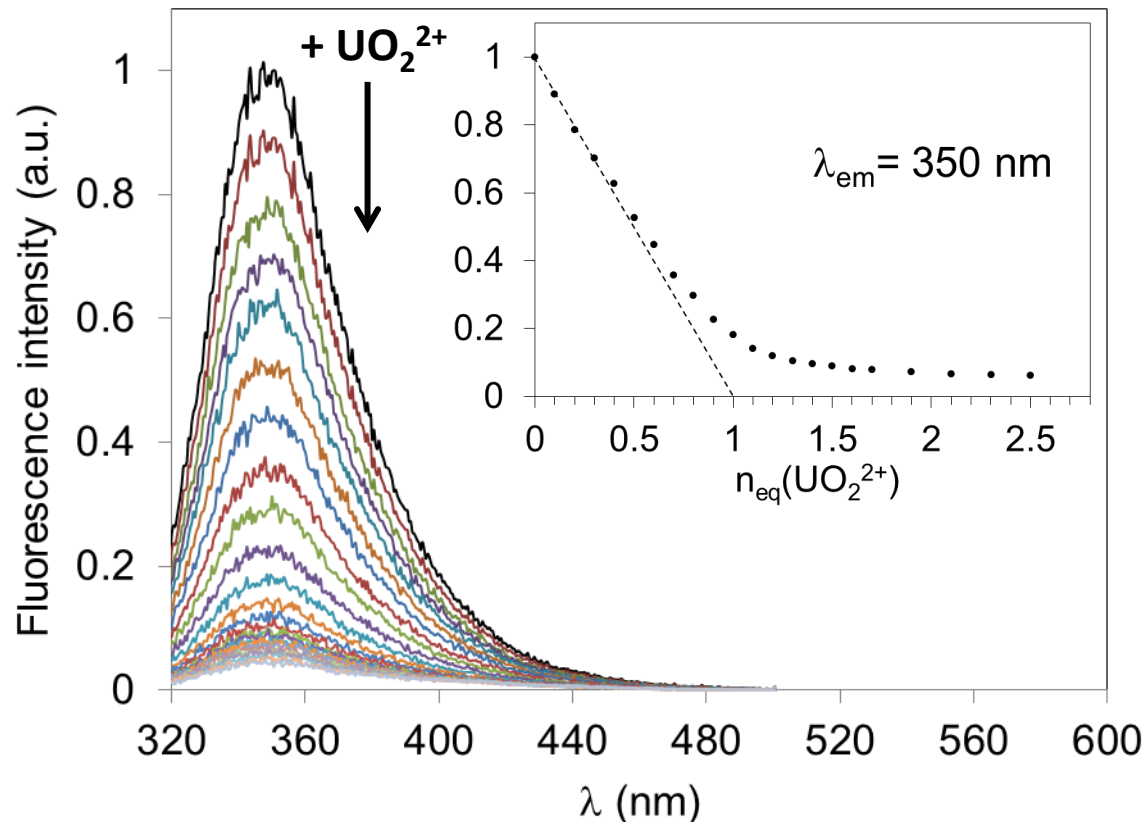
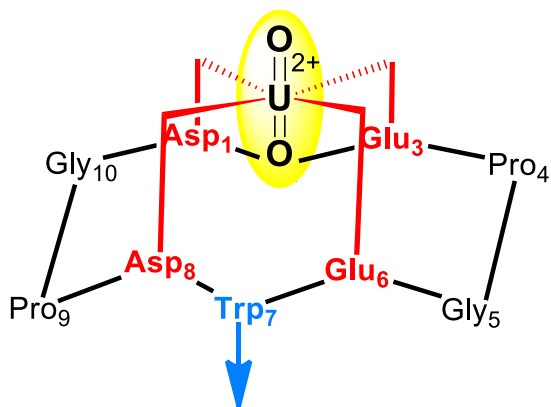
pH6 ⇒ Absence de structure

Formation du feuillet β dans le complexe

Pas d'évolution en excès de métal ⇒ pas de polymétalliques

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Analyse par fluorescence



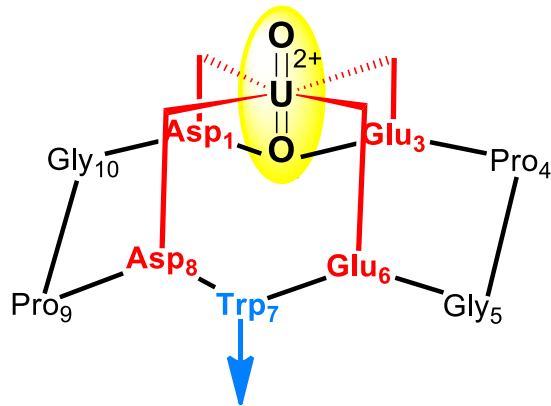
Extinction totale de fluorescence lors de la formation des complexes

Rupture à 1 équivalent d'uranyle $\Rightarrow$ Complexe 1:1

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

☺ Formation exclusive d'un complexe 1:1 avec l' UO_2^{2+}

? Les 4 chaînes latérales sont-elles coordonnées ?



☺ Pas de précipitation à pH 6 – 7.4

? Le feuillet n'est-il pas trop rigide ?

☺ Le complexe a une structure en feuillet β

? Quelle séquence à la plus forte affinité ? Asp vs Glu?

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Détermination des constantes d'équilibre à pH physiologique



pH = 6 – 7.4

- L'extinction de fluorescence du tryptophane est sensible à la formation des complexes d'uranyle
 $\approx \text{UO}_2\text{P} / \text{P}$
- Introduction des espèces identifiées par des méthodes complémentaires dans l'analyse numérique.

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Principales conclusions sur les complexes UO_2^{2+} -pS₀

$K^{\text{pH } 6}$ des complexes 1:1 dans l'eau à pH 6
(MES 20 mM, NaCl 0.1 M, 298 K)

Peptide	Séquence	$K^{\text{pH } 6}$
Linéaire EEEE	Ac- E RE P GE W E P G-NH ₂	$< 10^7$
EEEE	c(E RE P GE W E P G)	$10^{8.2}$
DEED	c(D RE P GE W D PG)	$10^{8.1}$
EESE	c(E RE P GS W E P G)	$< 10^7$
QEEE	c(Q R EPGE W E P G)	$< 10^7$

Les peptides cycliques contrôlent la coordination de l'uranyle dans des complexes 1:1
Affinité plus élevée qu'avec des peptides linéaires

Peptides cycliques tétra-acides :
 $K^{\text{pH } 6} \approx 10^8$

La suppression d'un résidu acide conduit à une baisse significative de l'affinité

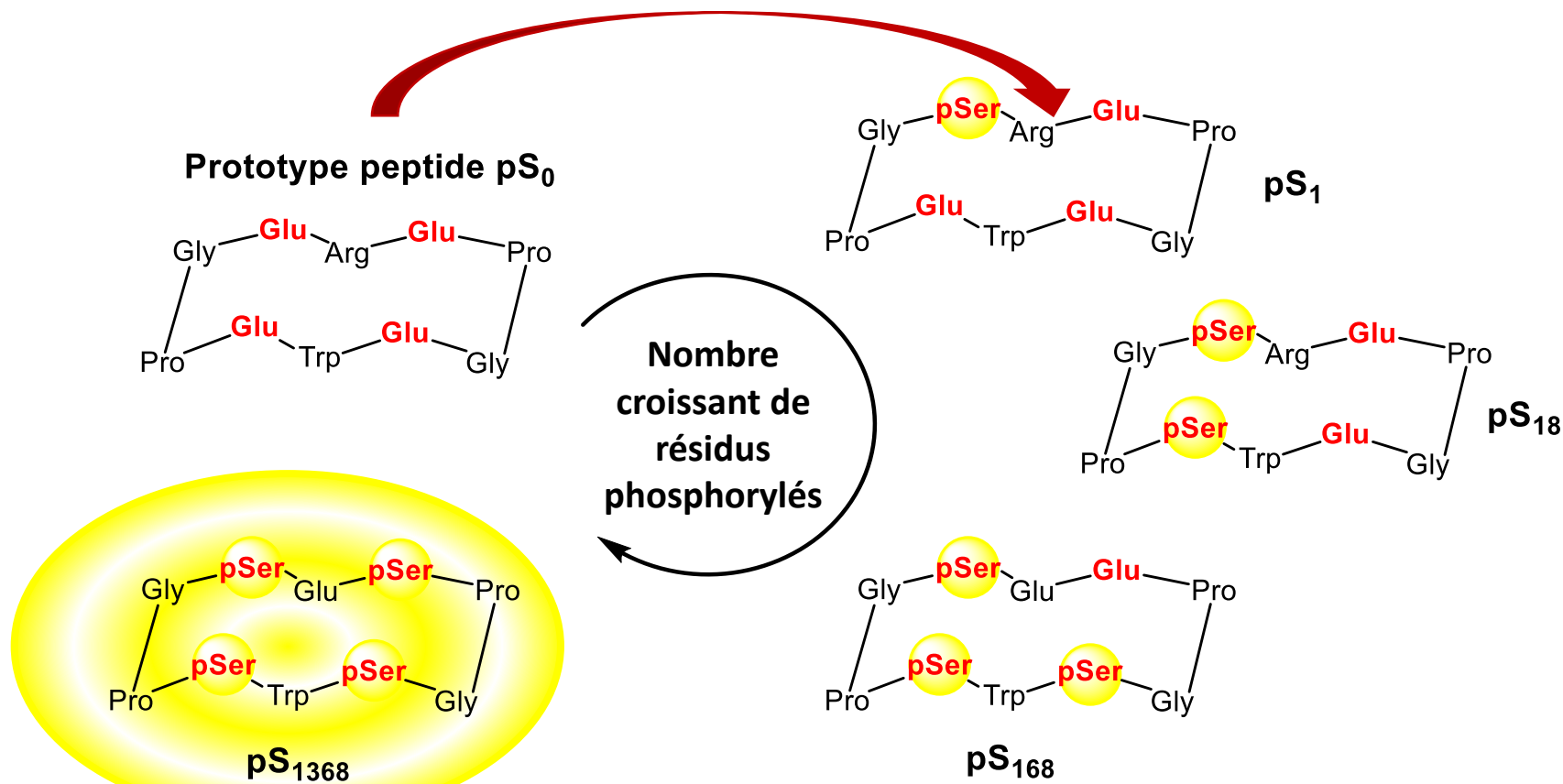
Ces peptides conçus *de novo* avec une structure en feuillet β orientent 4 chaînes latérales oxygénées dans le plan équatorial de l' UO_2^{2+}

Lebrun, Starck, Gathu, Chenavier, Delangle, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 16566-73

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Effet des acides aminés phosphorylés

Le remplacement d'un glutamate par une sérine phosphorylée augmente l'affinité de 1,5 ordres de grandeurs

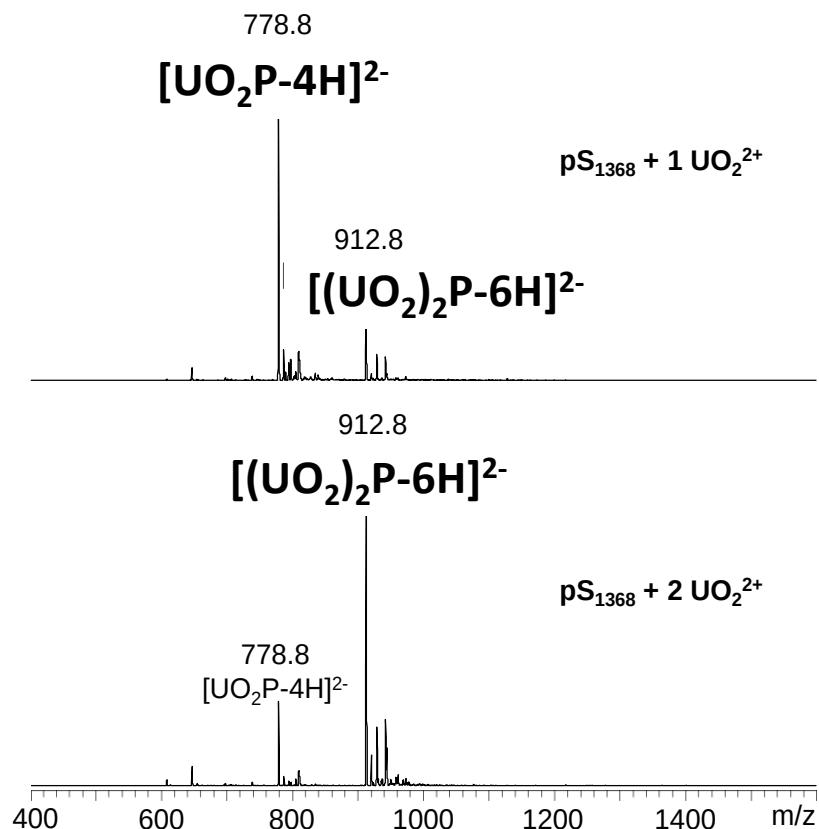


Starck, Laporte, Oros, Sisommay, Gathu, Solari, Creff, Roques, Den Auwer, Lebrun, Delangle, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 5281-90

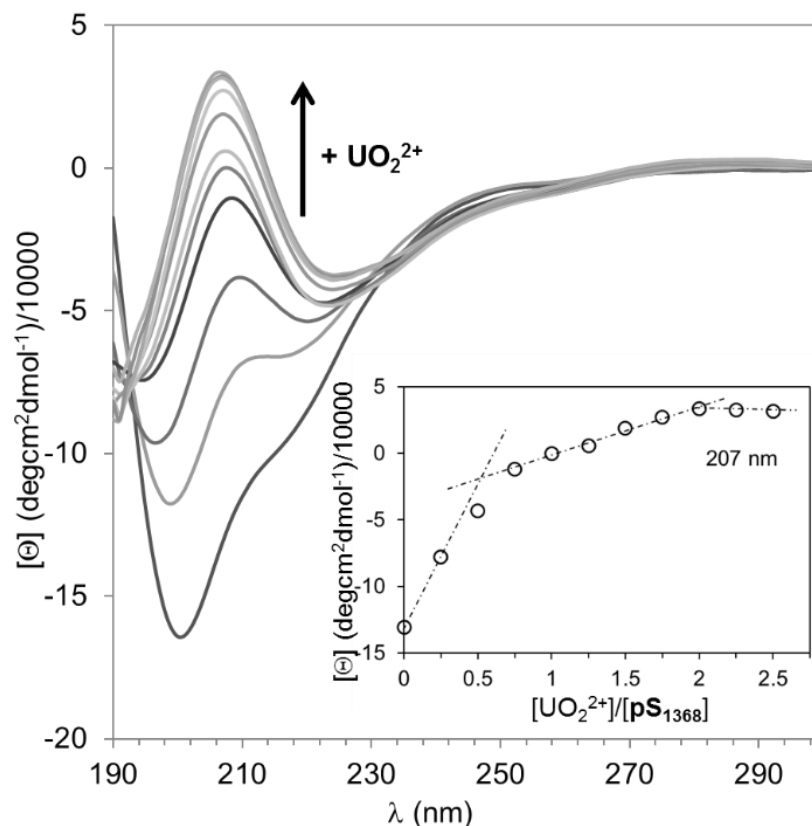
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Complexes d'uranyle avec le peptide cyclique tétraphosphorylé

ESI-MS



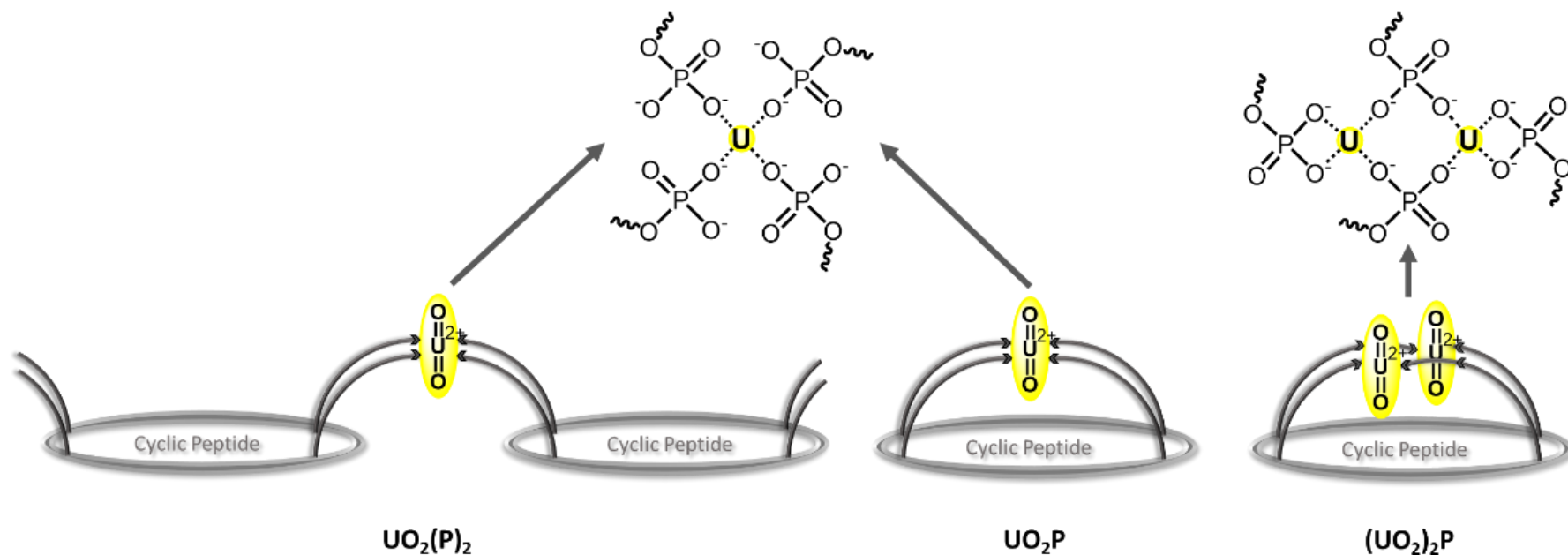
Dichroïsme circulaire



Comportement plus compliqué $\Rightarrow$ Plusieurs complexes d' UO₂²⁺

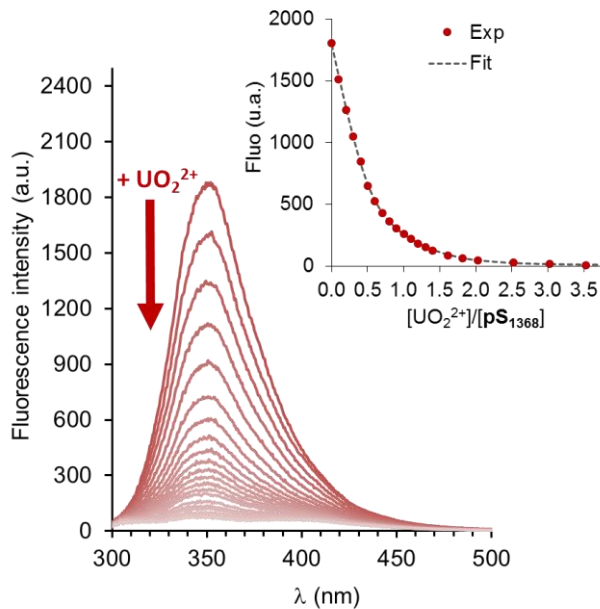
Toxicité de l'uranium et protéines cibles

Complexes d'uranyle avec le peptide cyclique tétraphosphorylé



Représentation schématique des complexes d'uranyle formés
avec pS_{1368}

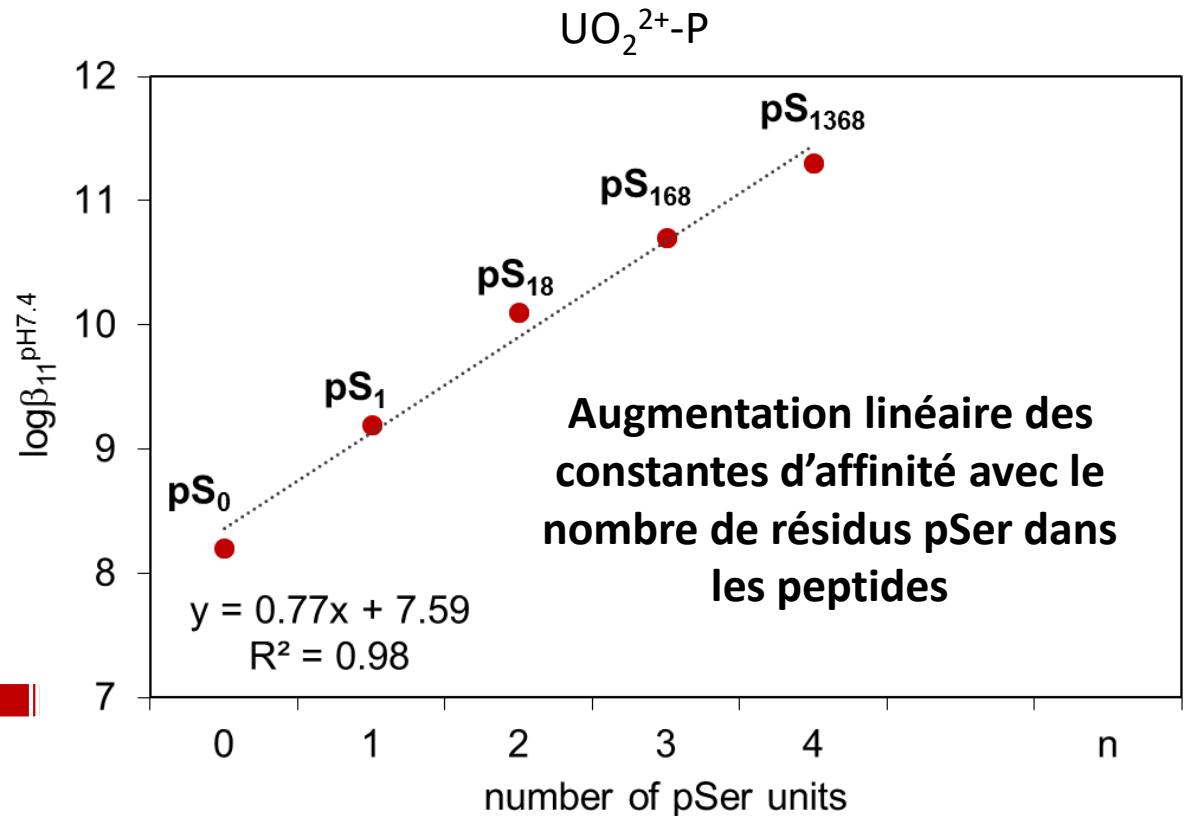
Toxicité de l'uranium et protéines cibles



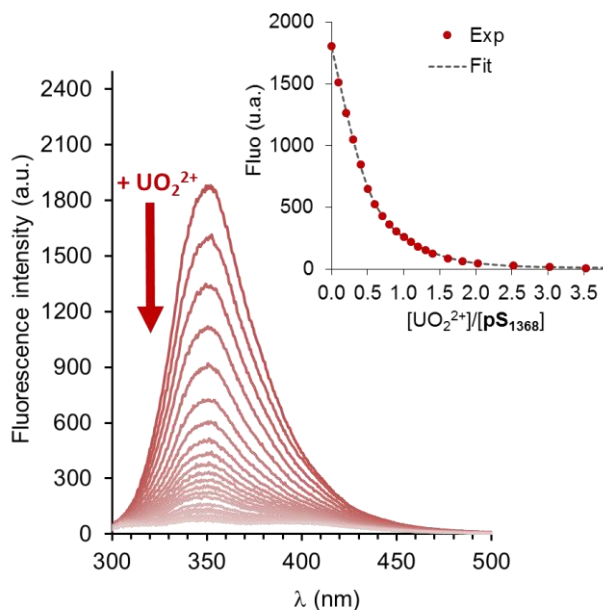
La liaison des phosphates est plus forte que la répulsion électrostatique produite dans la sphère de coordination



Détermination des constantes à pH 7.4

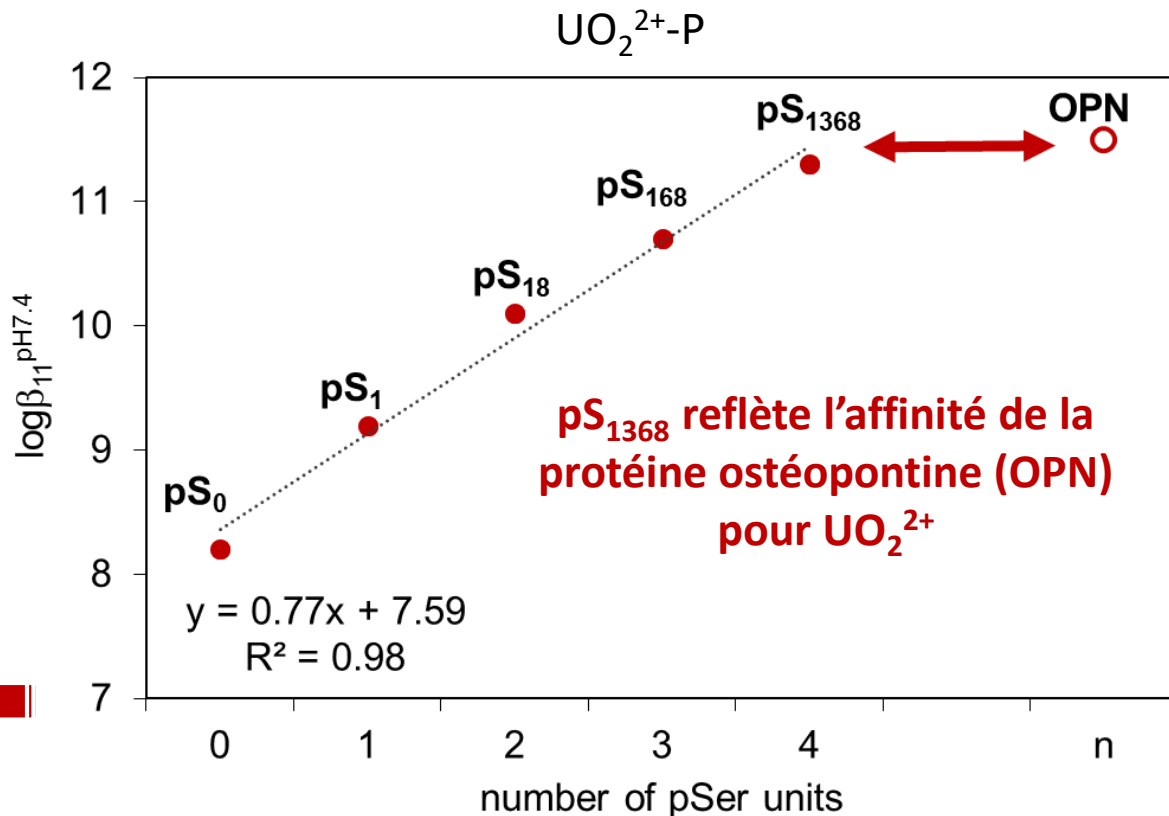


Toxicité de l'uranium et protéines cibles



**pS₁₃₆₈ est proposé
comme modèle du site
de coordination de
plus grande affinité de
l'ostéopontine**

Détermination des constantes à pH 7.4

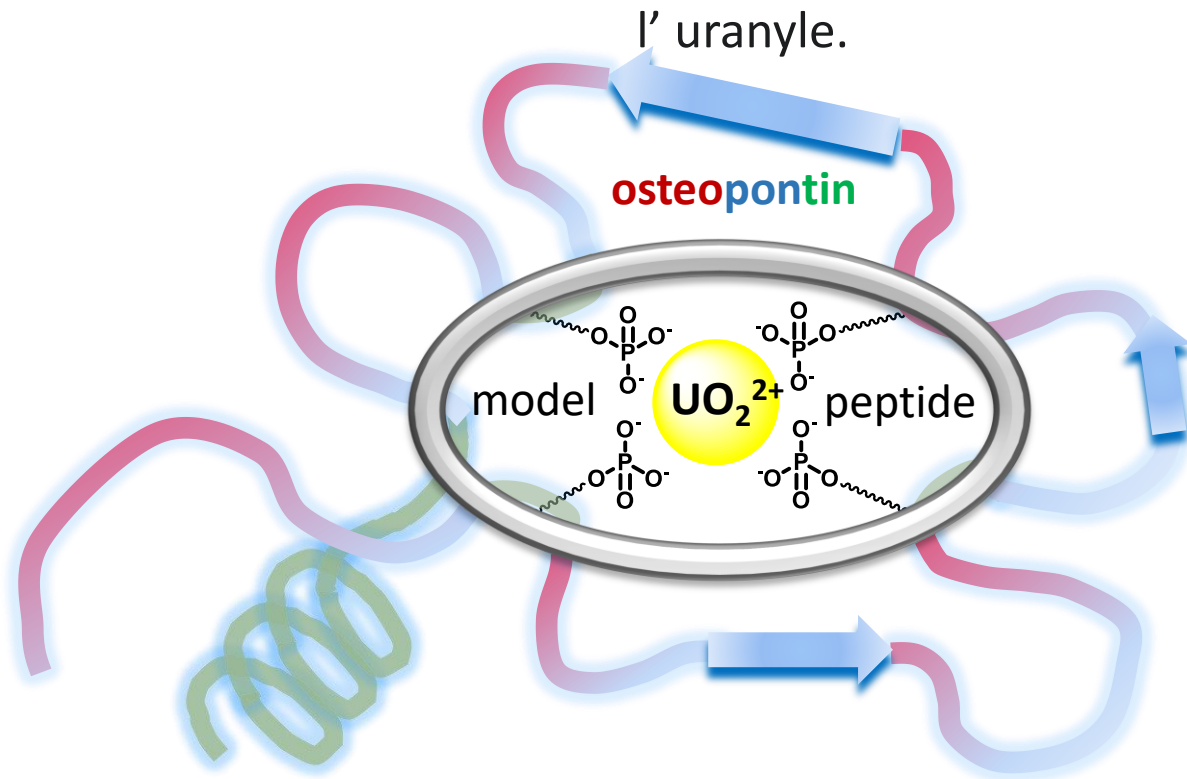


Laporte, Lebrun, Vidaud, Delangle, Chem. Eur. J. **2019**, 8570-8578

Huynh, Vidaud, Hagege, Metallomics, **2016**, 8, 1185-92

Toxicité de l'uranium et protéines cibles

- ⇒ Cette protéine intrinsèquement désordonnée peut en effet **s'enrouler autour du métal** pour amener quatre groupes phosphates dans la sphère de coordination de l'uranyle.



- ⇒ **Des sites de liaison de l'uranyle hyperphosphorylés** sont proposés comme cible dans les phosphoprotéines comme l'ostéopontine.

Laporte, Lebrun, Vidaud, Delangle, Chem. Eur. J. **2019**, 8570-8578

Toxicité de l'uranium et protéines cibles



Sites riches en Phosphate



Sites riches en Carboxylate

Peptide/Protein	pS ₀	pS ₁₆₈	pS ₁₃₆₈	OPN
logK (UO ₂ ²⁺)	8.1	10.7	11.3	11.5
logK (Ca ²⁺)	3.7	3	2	7.5
Sélectivité	4.4	7.7	9.3	4

Forte sélectivité pour UO₂²⁺ par rapport au cation endogène Ca²⁺, à des concentrations physiologiques => Complexation de l'UO₂²⁺ en présence de protéines

Laporte, Lebrun, Vidaud, Delangle, Chem. Eur. J. **2019**, 8570-8578

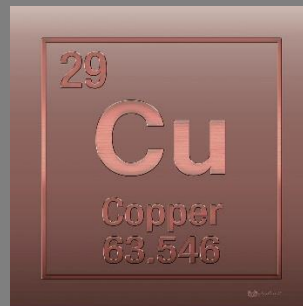
Bonnet, Fries, Crouzy, Sénèque, Cisnetti, Boturn, Dumy, Delangle, Chem. Eur. J., **2009**, 15, 7083-93

Kläning, Christensen, Sorensen, Vorup-Jensen, Jensen, Bone, **2014**, 66, 90-95

Huynh, Vidaud, Hagege, Metallomics, **2016**, 8, 1185-92



Chélation du cuivre et maladie de Wilson



Chélation du cuivre et maladie de Wilson

*Cuivre = métal essentiel du
bloc d*

The periodic table is color-coded by groups: Alkali Metals (red), Alkaline Earths (orange), Transition Metals (yellow), Basic Metals (green), Semimetals (light blue), Nonmetals (blue), Halogens (purple), Noble Gases (dark purple), Lanthanides (light green), and Actinides (dark green). The d-block is highlighted in yellow, and the p-block is highlighted in blue. The s-block is highlighted in red and orange. The f-block is highlighted in green. The legend at the bottom identifies the color-coded blocks.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VII B	VIII	VIII	VIII	IB	IIB	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	VIIIA
1 H Hydrogen 1.008	2 He Helium 4.003																
3 Li Lithium 6.941	4 Be Beryllium 9.012											5 B Boron 10.811	6 C Carbon 12.011	7 N Nitrogen 14.007	8 O Oxygen 15.999	9 F Fluorine 18.998	10 Ne Neon 20.180
11 Na Sodium 22.990	12 Mg Magnesium 24.305											13 Al Aluminum 26.982	14 Si Silicon 28.086	15 P Phosphorus 30.974	16 S Sulfur 32.066	17 Cl Chlorine 35.453	18 Ar Argon 39.948
19 K Potassium 39.098	20 Ca Calcium 40.078	21 Sc Scandium 44.956	22 Ti Titanium 47.88	23 V Vanadium 50.942	24 Cr Chromium 51.996	25 Mn Manganese 54.938	26 Fe Iron 55.933	27 Co Cobalt 58.933	28 Ni Nickel 58.693	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.39	31 Ga Gallium 69.723	32 Ge Germanium 72.61	33 As Arsenic 74.922	34 Se Selenium 78.972	35 Br Bromine 79.904	36 Kr Krypton 84.80
37 Rb Rubidium 84.468	38 Sr Strontium 87.62	39 Y Yttrium 88.906	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.906	42 Mo Molybdenum 95.95	43 Tc Technetium 98.907	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.906	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.868	48 Cd Cadmium 112.411	49 In Indium 114.818	50 Sn Tin 118.71	51 Sb Antimony 121.760	52 Te Tellurium 127.6	53 I Iodine 126.904	54 Xe Xenon 131.29
55 Cs Cesium 132.905	56 Ba Barium 137.327	57-71 Lanthanide Series	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.948	74 W Tungsten 183.85	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.22	78 Pt Platinum 195.08	79 Au Gold 196.967	80 Hg Mercury 200.59	81 Tl Thallium 204.383	82 Pb Lead 207.2	83 Bi Bismuth 208.980	84 Po Polonium [209]	85 At Astatine [210]	86 Rn Radon [222]
87 Fr Francium [223]	88 Ra Radium [226]	89-103 Actinide Series	104 Rf Rutherfordium [261]	105 Db Dubnium [262]	106 Sg Seaborgium [266]	107 Bh Bohrium [264]	108 Hs Hassium [269]	109 Mt Meitnerium [268]	110 Ds Darmstadtium [271]	111 Rg Roentgenium [272]	112 Cn Copernicium [277]	113 Uut Ununtrium [284]	114 Fl Flerovium [289]	115 Uup Ununpentium [288]	116 Lv Livermorium [293]	117 Uus Ununseptium [294]	118 Uuo Ununoctium [294]
		57 La Lanthanum 138.906	58 Ce Cerium 140.115	59 Pr Praseodymium 140.908	60 Nd Neodymium 144.913	61 Pm Promethium 144.913	62 Sm Samarium 150.36	63 Eu Europium 151.966	64 Gd Gadolinium 157.25	65 Tb Terbium 158.925	66 Dy Dysprosium 162.50	67 Ho Holmium 164.930	68 Er Erbium 167.26	69 Tm Thulium 168.934	70 Yb Ytterbium 173.04	71 Lu Lutetium 174.967	
		89 Ac Actinium 227.028	90 Th Thorium 232.038	91 Pa Protactinium 231.036	92 U Uranium 238.03	93 Np Neptunium 237.048	94 Pu Plutonium 244.064	95 Am Americium 243.061	96 Cm Curium 247.070	97 Bk Berkelium 247.070	98 Cf Californium 251.080	99 Es Einsteinium [254]	100 Fm Fermium 257.095	101 Md Mendelevium 258.1	102 No Nobelium 259.101	103 Lr Lawrencium [262]	

Legend:

- Alkali Metal
- Alkaline Earth
- Transition Metal
- Basic Metal
- Semimetal
- Nonmetal
- Halogen
- Noble Gas
- Lanthanide
- Actinide

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Le cuivre dans le vivant



Chimie rédox Cu(I)/Cu(II)



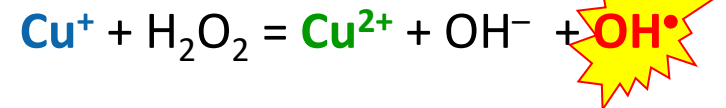
Un élément trace essentiel

- cofacteur dans de nombreuses enzymes
- impliqué dans de nombreux processus vitaux



Il devient **toxique**

- en excès
- réaction de type Fenton

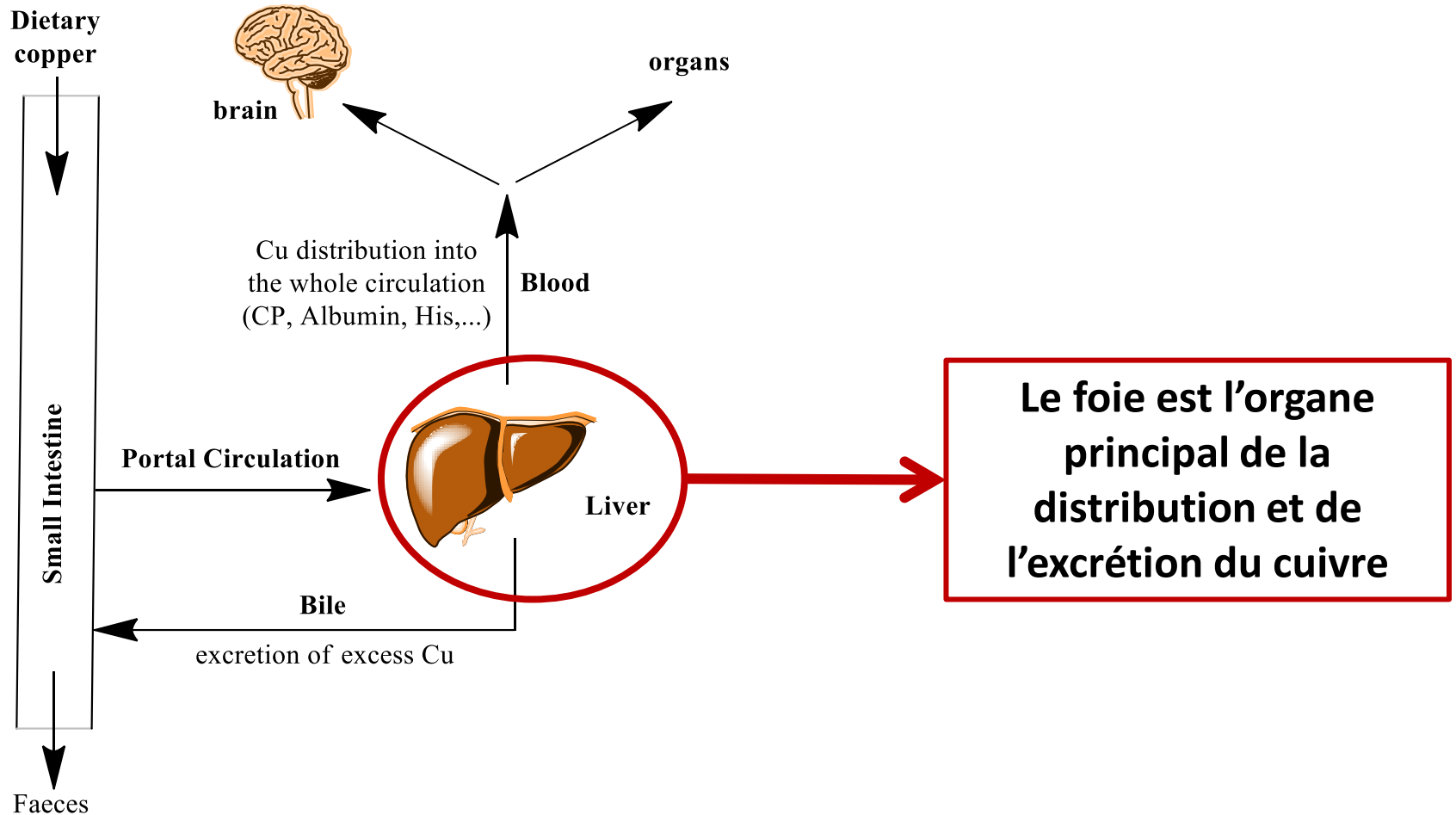


Oxydation
des protéines,
lipides,...

La concentration intracellulaire de cuivre est finement régulée *in vivo*

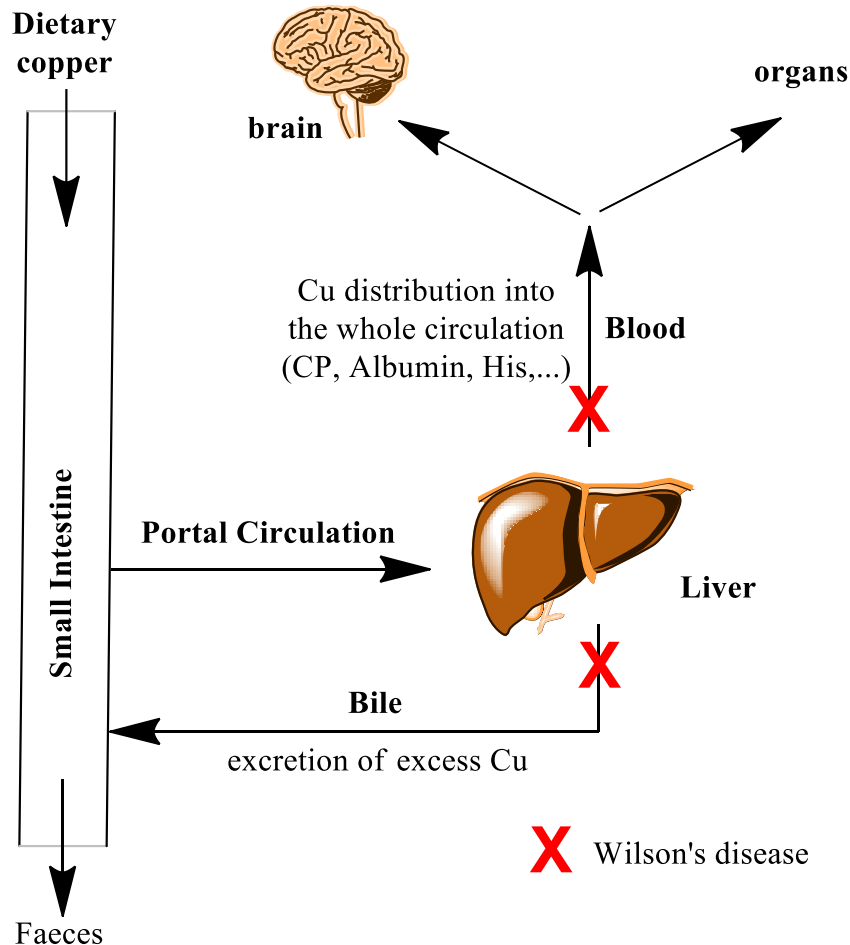
Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Le cuivre dans le vivant



Delangle, Dalton, 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson



Dysfonctionnement de la protéine ATP7B
⇒ Dans le foie

Défaut d'excrétion du cuivre

- Accumulation de cuivre
- Toxicité
- Symptômes hépatiques et neurologiques

Maladie de Wilson

= **Maladie génétique orpheline**

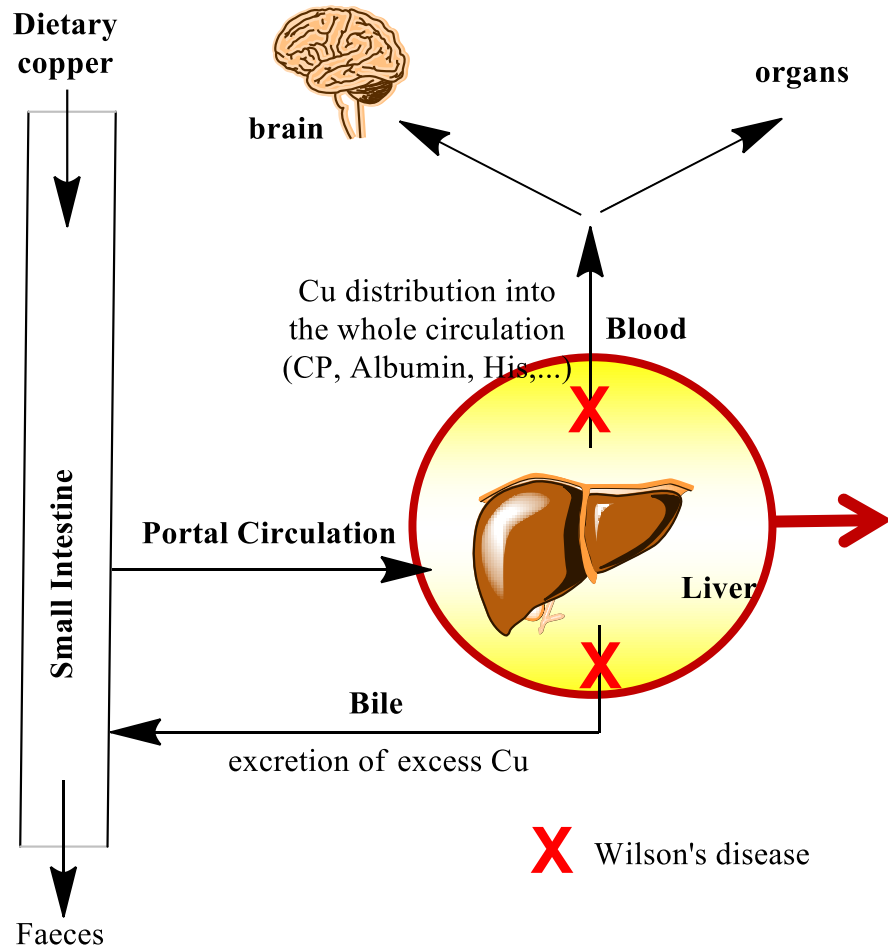
1/30 000-1/100 000 naissances

Difficile à diagnostiquer

Traitement à vie → chélation du cuivre

Delange, Dalton, 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson



Cibler l'accumulation de Cu dans
le **foie**,
l'organe majeur de sa régulation
et de son accumulation

↓
Chélateurs de Cu
intra-hépatocyte

Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2011
Delange, Dalton, 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Cellules $\Rightarrow$ environnement réducteur (glutathion)

Dans les cellules le Cu disponible doit donc être Cu(I)

Cu(I) = ion "mou"

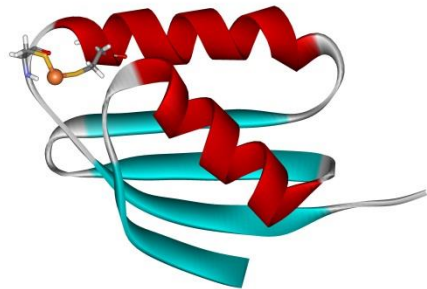
Interactions fortes
avec des
donneurs soufrés



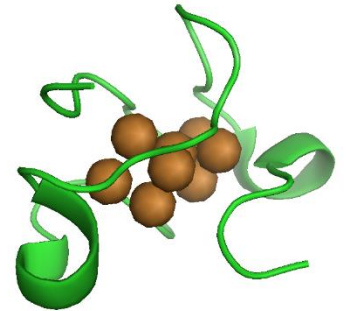
**Transport et stockage du
cuivre**



Protéines avec les
donneurs soufrés mous
de Méthionines et Cystéines
(et des donneurs azotés des
Histidines)



Chaperonnes à Cu



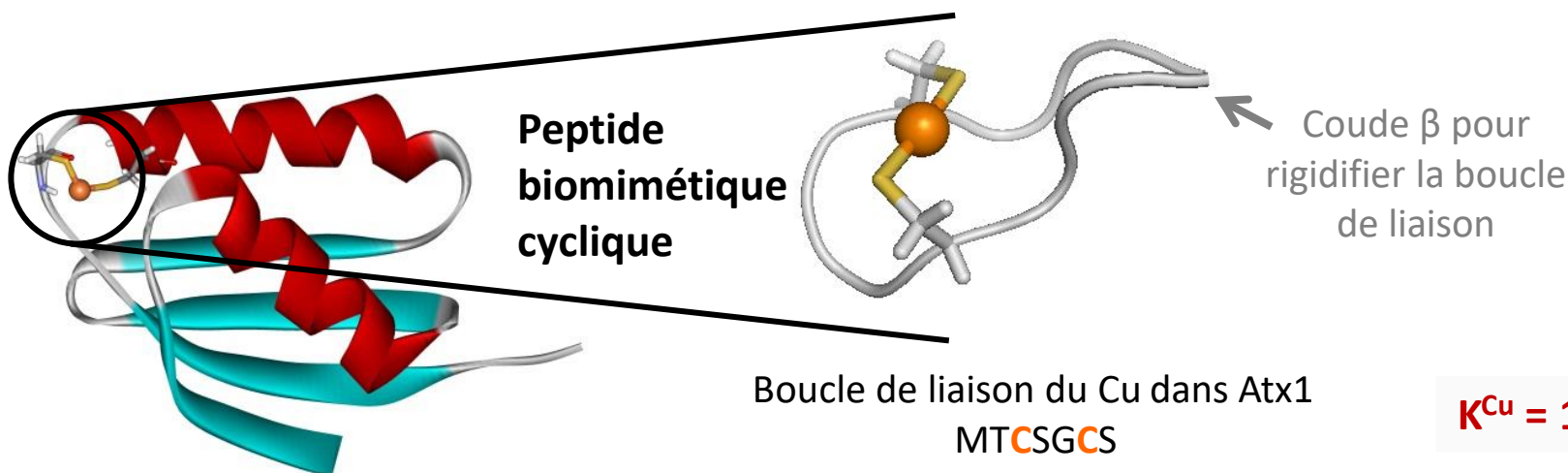
Métallothionéines

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Mimes de sites à Cu(I) dans les protéines

Chaperonne à Cu de la levure Atx1

Transport du Cu(I) dans les cellules



$$K^{\text{Cu}} = 10^{17.4}$$

Site digonal à Cu(I) = **S-Cu-S**

T.V. O'Halloran, 2001

Des peptides simples à base de cystéines ont des affinités très fortes pour Cu(I) et sont très sélectifs par rapport au Zn(II)

Sénèque, Chem Commun 2004

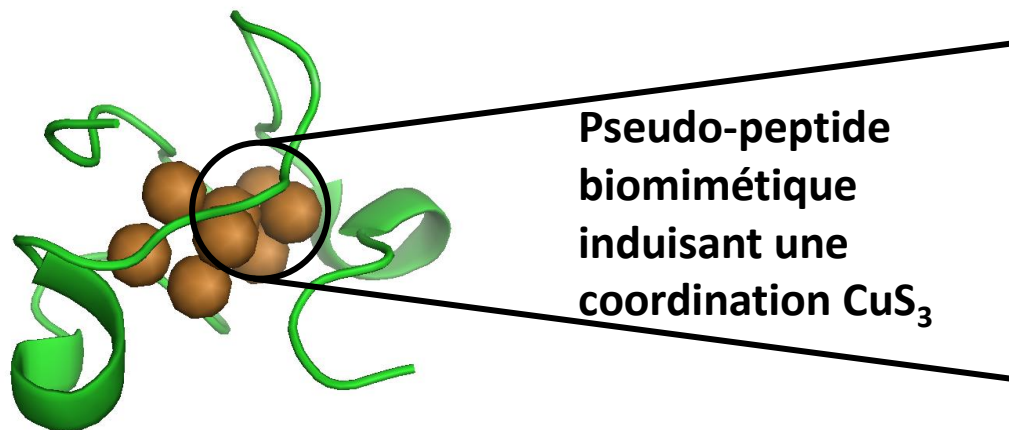
Rousselot-Pailley, Inorg. Chem. 2006

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Mimes de sites à Cu(I) dans les protéines

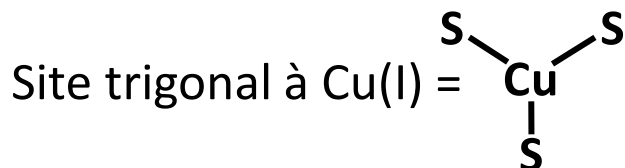
Métallothionéines

Stockage des métaux toxiques ou en excès dans les cellules

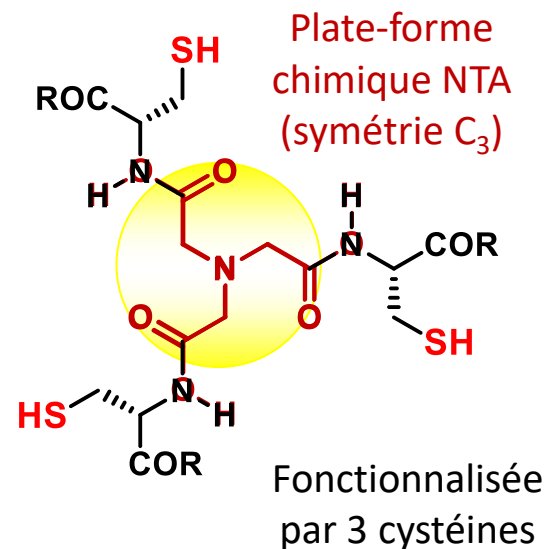


Pseudo-peptide biomimétique induisant une coordination CuS_3

$\text{Cu}_8\text{-MT}$



Calderone, PNAS, 2005

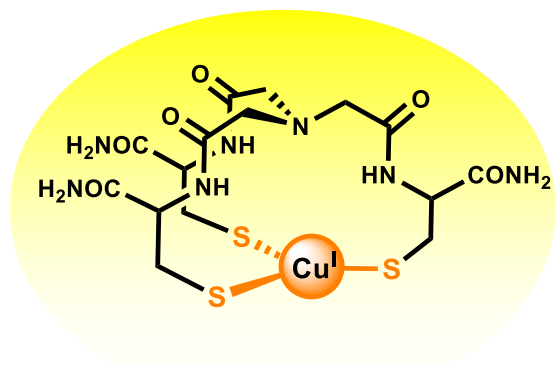


$$K^{\text{Cu}} = 10^{19}$$

Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2009
Pujol, Chem. Eur. J., 2011

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Un pseudo-peptide mimant les métallothionéines est un bon candidat pour la chélation du Cu(I)



- Très forte affinité pour Cu(I) $K^{\text{Cu}} = 10^{18.8}$ (pH 7.4)
- Coordination CuS_3 similaire à ces protéines de détoxification
- Sélectivité très élevée / Zn(II) 8 ordres de grandeur

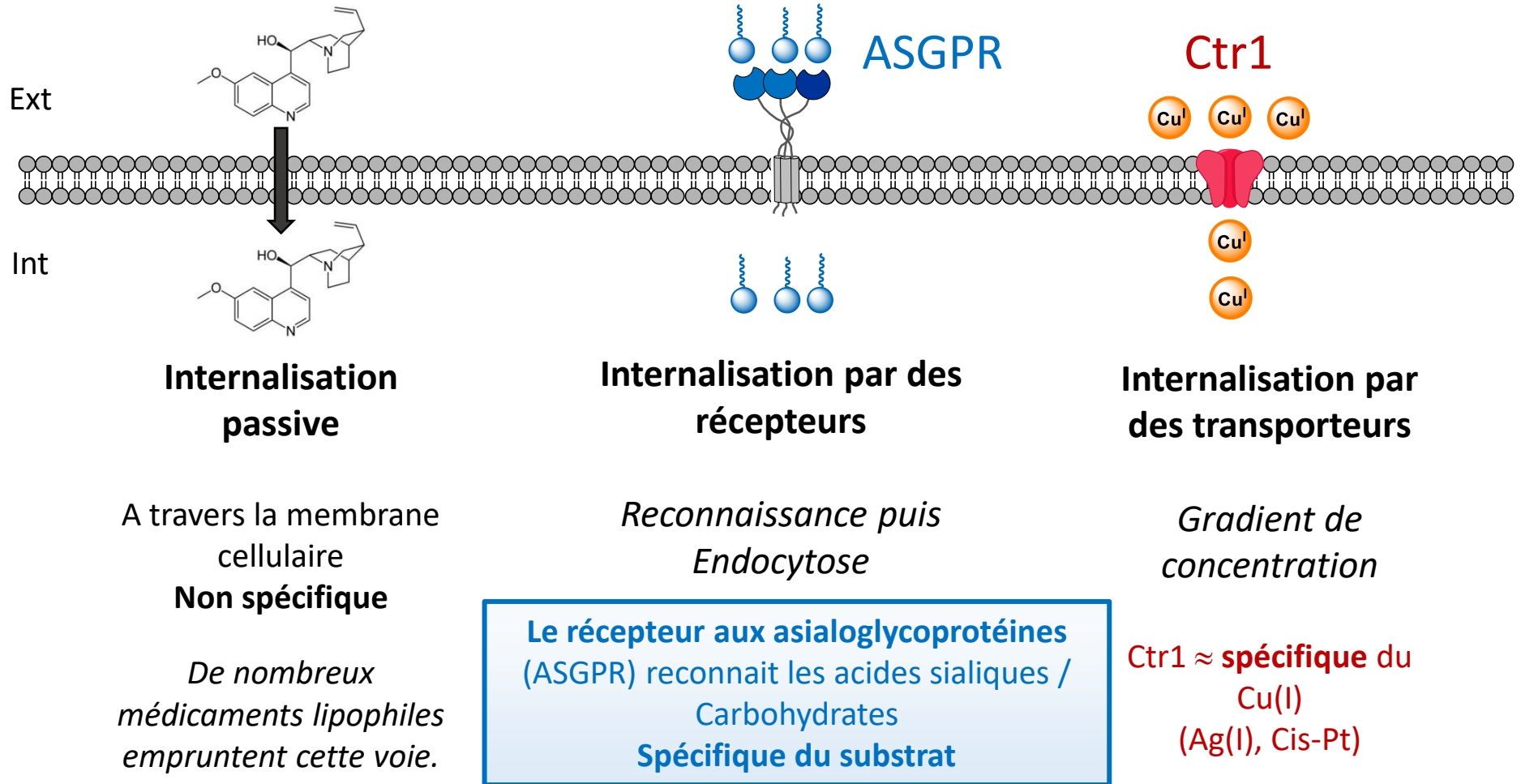
Mais entre-t-il dans les cellules du foie ?

Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2009 - Pujol, Chem. Eur. J., 2011 - Pujol, J. Am. Chem. Soc., 2011
Jullien, Inorg. Chem., 2013

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

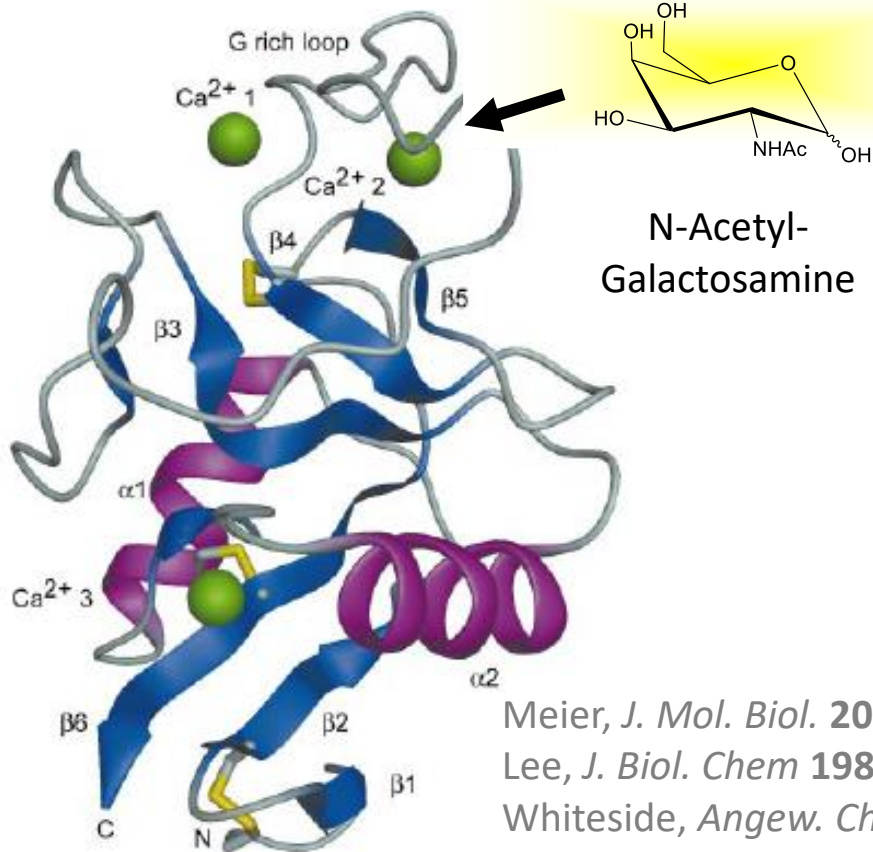
Internalisation dans les cellules

Membrane cellulaire = bicouche phospholipidique



Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Vectoriser le chélateur vers les cellules du foie
par le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR)



Meier, *J. Mol. Biol.* **2000**

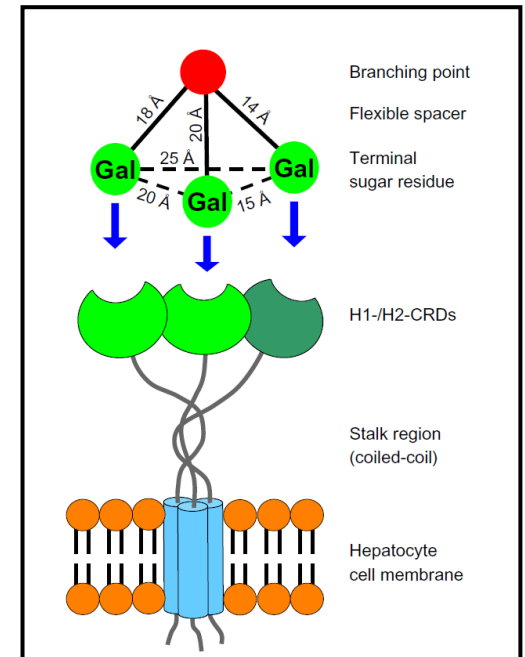
Lee, *J. Biol. Chem* **1982**

Whiteside, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**

Connolly, *J. Biol. Chem.*, **1982**

Lee, *FASEB J.*, **1992**

Structure optimale pour le
substrat = 3 GalNAC espacés de
15-20 Å

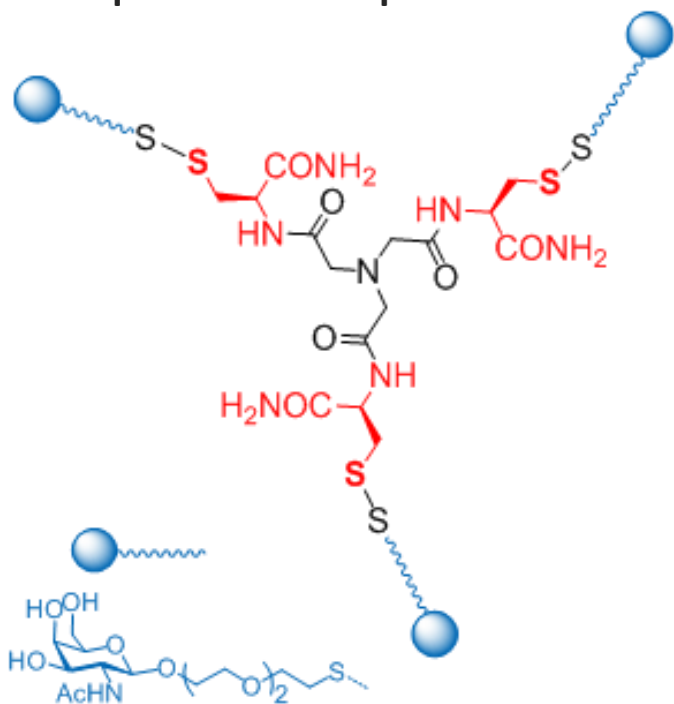


Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Design du prochélateur ciblé vers les cellules du foie

Prodrogue

"fonctions chélatantes thiols SH
masquées dans des ponts disulfures S-S."



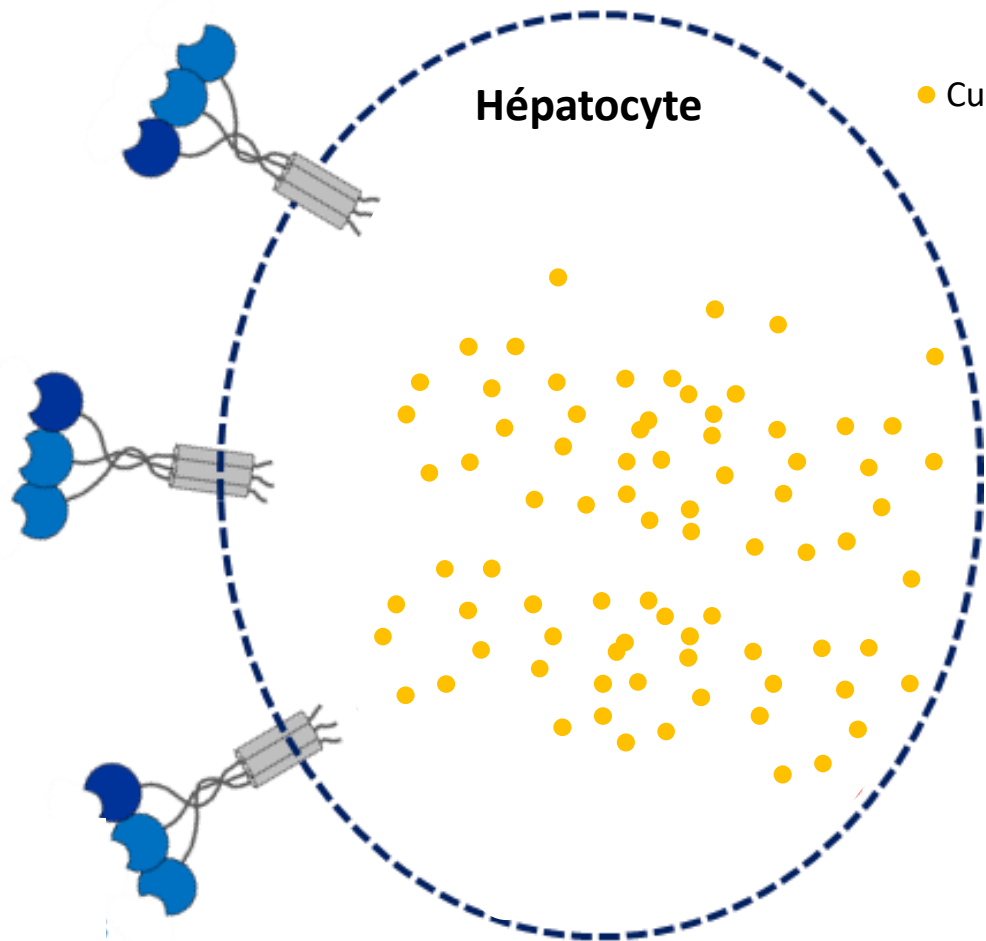
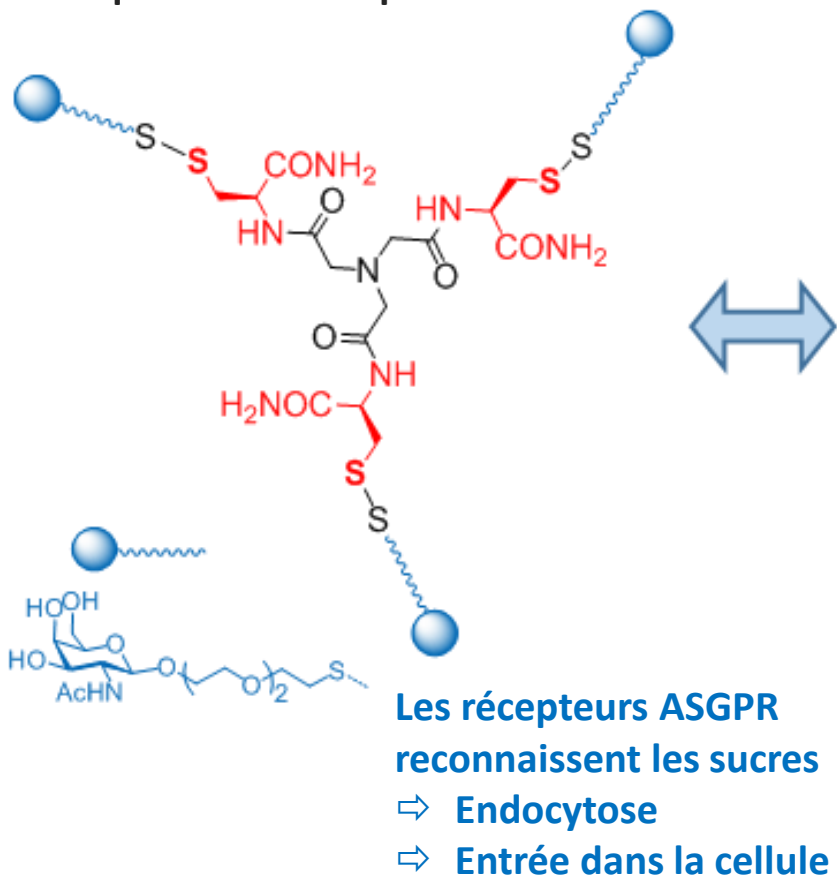
Pujol, Angew. Chem., 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Design du prochélateur ciblé vers les cellules du foie

Prodrogue

"fonctions chélatantes thiols SH
masquées dans des ponts disulfures S-S."



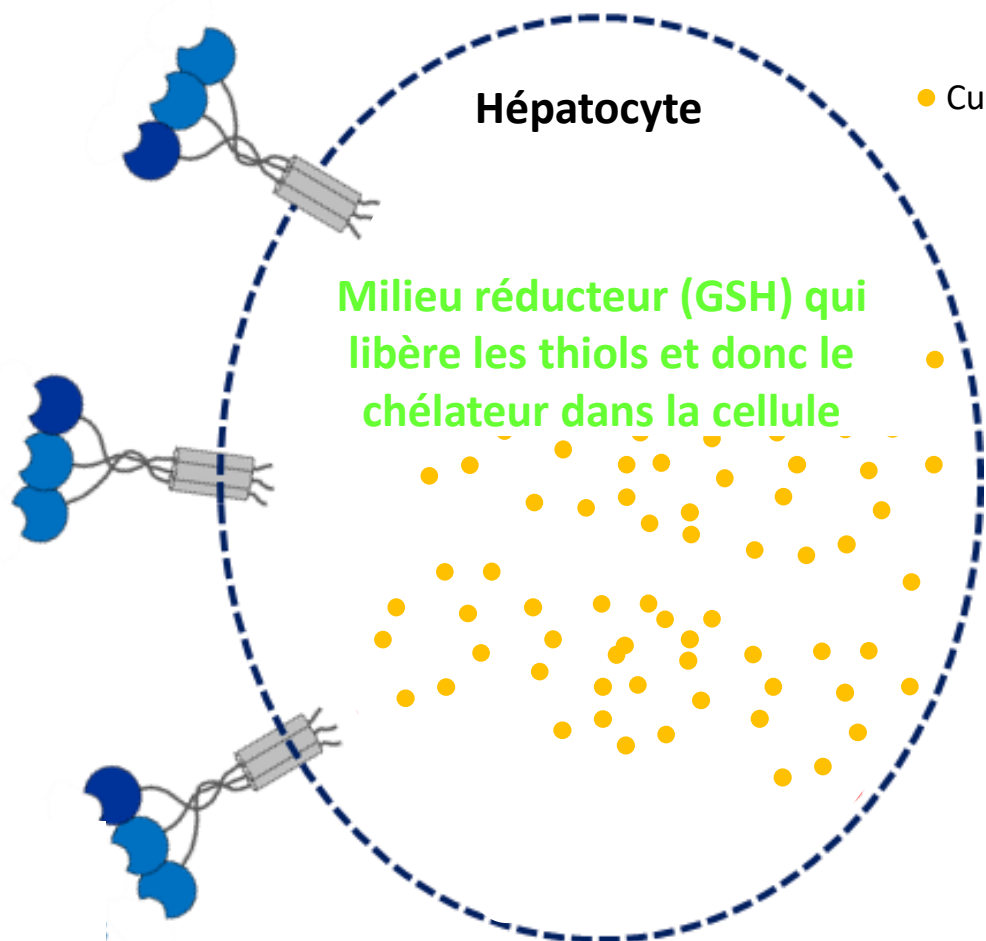
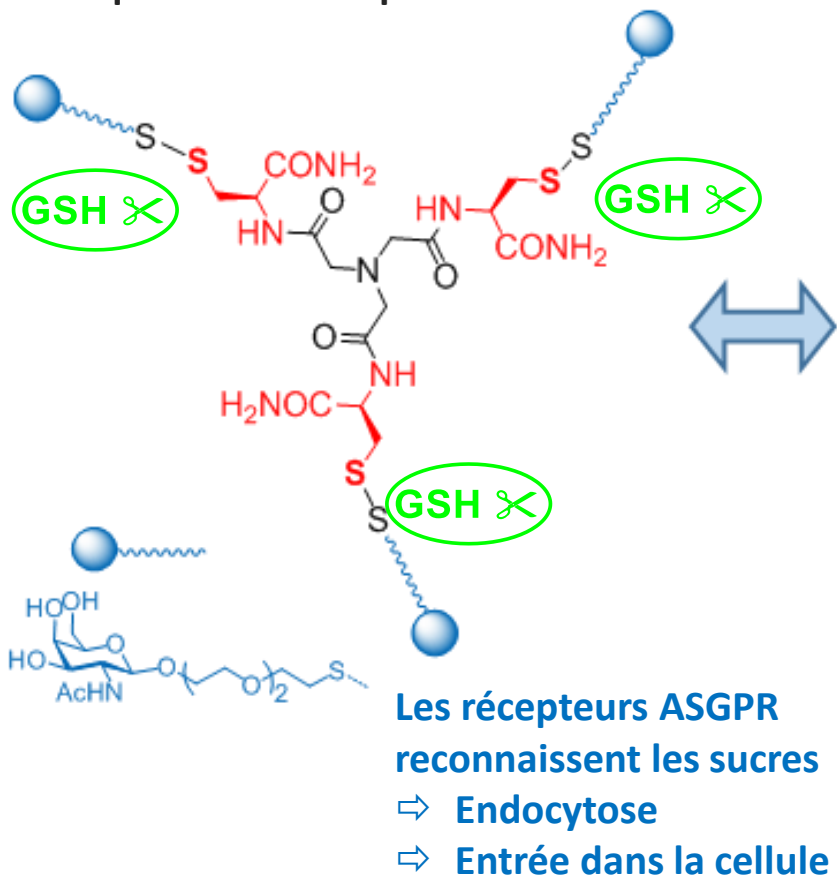
Pujol, Angew. Chem., 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Design du prochélateur ciblé vers les cellules du foie

Prodrogue

"fonctions chélatantes thiols SH
masquées dans des ponts disulfures S-S."



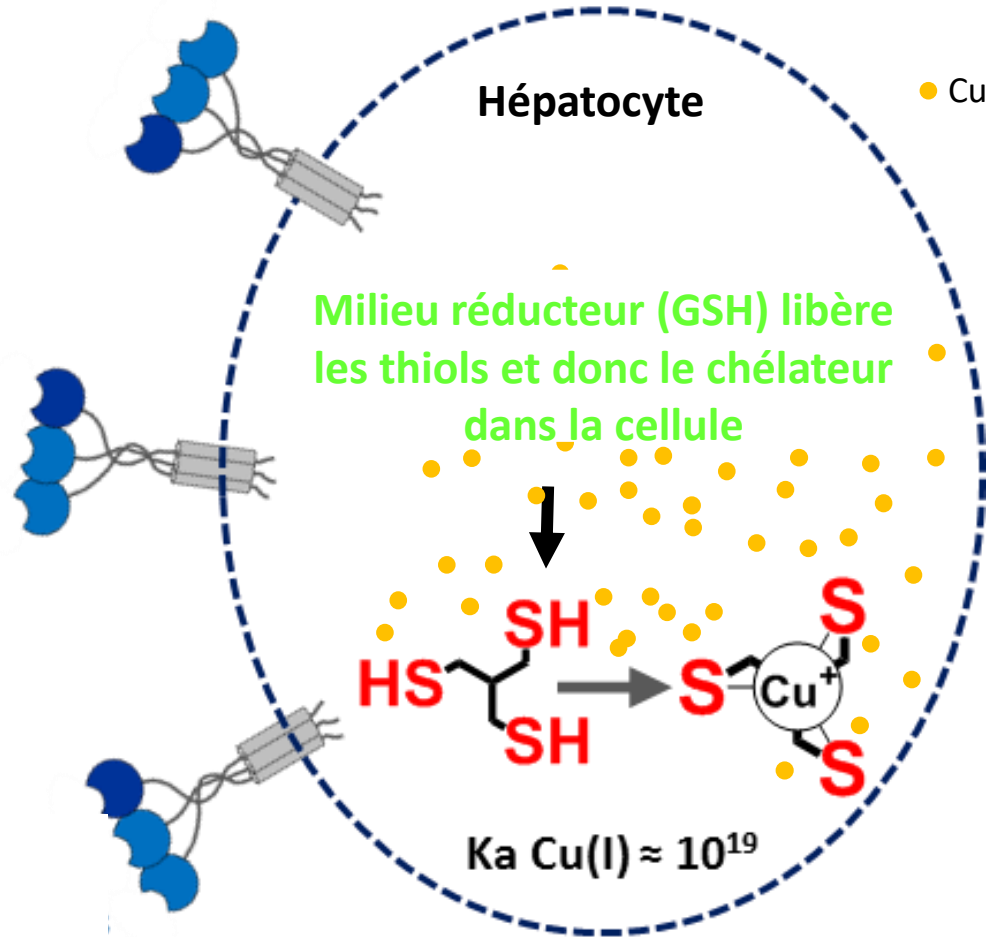
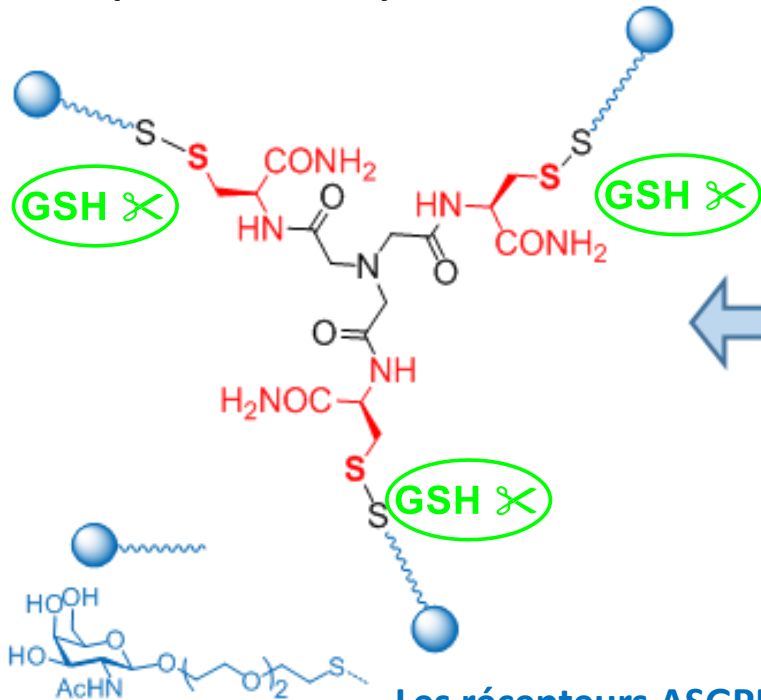
Pujol, Angew. Chem., 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Design du prochélateur ciblé vers les cellules du foie

Prodrogue

"fonctions chélatantes thiols SH
masquées dans des ponts disulfures S-S."



Pujol, Angew. Chem., 2012

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

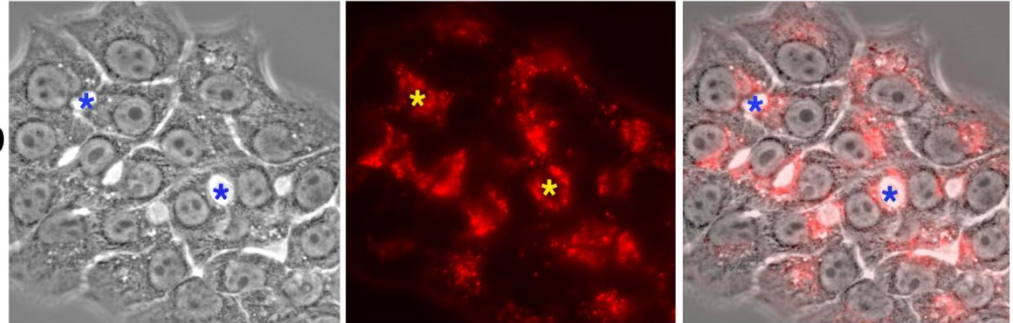
Résultats. Incorporation dans les cellules du foie

Suivi d'un dérivé fluorescent dans le rouge dans des cellules hépatiques

Microscopie de fluorescence

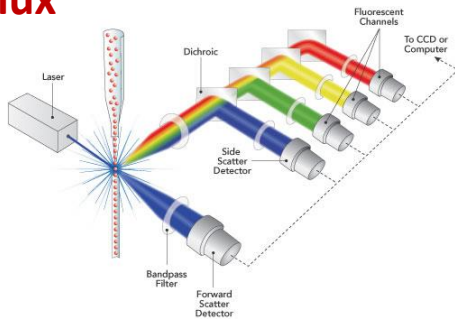
WIF-B9

⇒ Localisation de la prodrogue



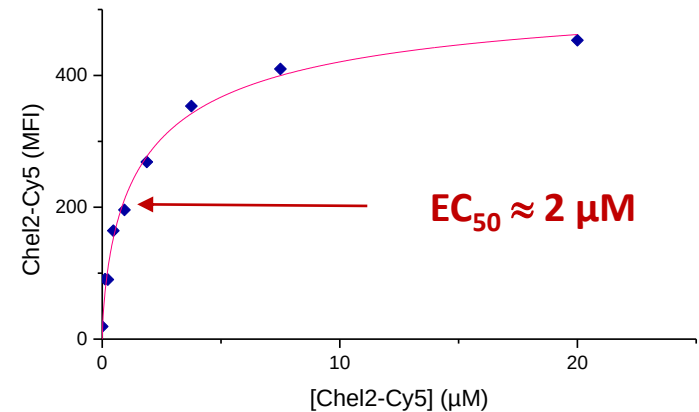
⇒ Incorporation très efficace
par le récepteur ASGPR

Cytométrie en flux



⇒ Quantification de l'incorporation

Expérience de saturation



Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Excrétion du Cu au niveau cellulaire

Nano-XRF à l'ESRF (Synchrotron à Grenoble)



Imagerie des métaux (fluorescence X) sur des cellules à l'échelle nanométrique

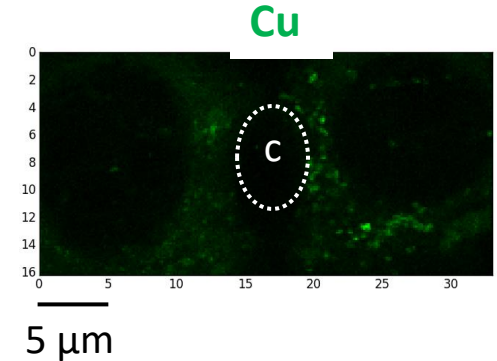
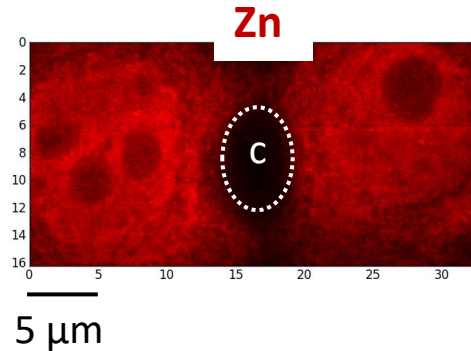
Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Excrétion du Cu au niveau cellulaire

Nano-XRF à ESRF (Synchrotron à Grenoble)

➤ 1^{ère} condition = Cu seul

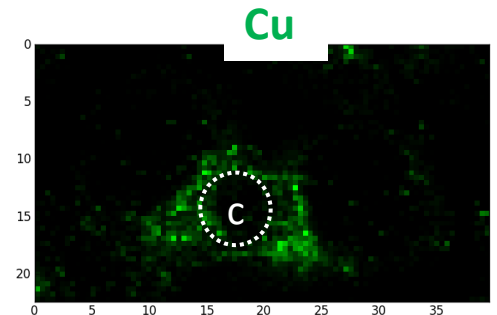
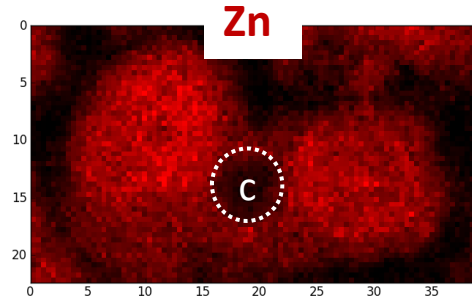
Distribution quasi-uniforme
du Cu dans le cytosole



➤ 2^{ème} condition = Cu puis prodogue

⇒ Redistribution du Cu vers le
canalicule

⇒ Excrétion du Cu par voie
biliaire...



Monestier, unpublished results

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

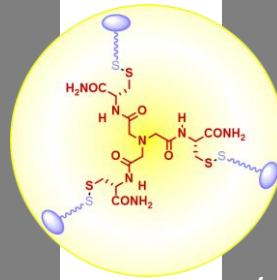
⇒ Une molécule hautement spécifique pour traiter les surcharges en Cu

Spécifique du Cu(I)

Par rapport aux autres métaux

$$K^{\text{Cu(I)}} = 10^{19}, K^{\text{Zn(II)}} = 10^{11}$$

$$>> \text{D-Pen } (K^{\text{Cu(I)}} = 10^8, K^{\text{Zn(II)}} = 10^6)$$



Spécifique des hépatocytes

Ciblage des ASGPR

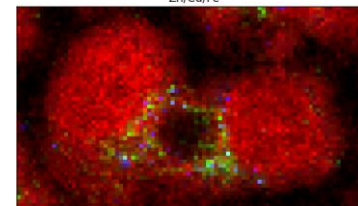
Prodrogue libérant le chélateur
(substance active) seulement dans le foie

⇒ **Diminution du Cu hépatique chez la souris ATP7B^{-/-} (modèle de Wilson)**

Sans excrétion urinaire

⇒ **Mécanisme d'action**

- Chélation intracellulaire du Cu(I)
- Excrétion biliaire



Ce chélateur biomimétique ciblé vers le foie restaure la voie naturelle d'excrétion du Cu par la bile.

Chélation du cuivre et maladie de Wilson

Déroulement du projet

Fondamental

Valorisation

2002

2006

2007-2010

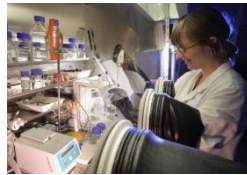
2012-2018

Licence vers un
industriel
spécialisé dans
les médicaments
niches
2020

Mécanismes de
régulation des
métaux lourds
dans le vivant

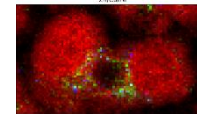
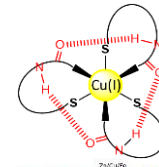


Thèse chimie
bio-inorganique



Optimisation
des molécules

Identification
des mécanismes



Preuve de concept
chez l'animal modèle



Mimes de
protéines

Chélation
biomimétique
du cuivre

Maladie de
Wilson

Ciblage du foie

1^{ères} cellules

CLUSTERS
DE RECHERCHE
RHÔNE-ALPES
CHIMIE

2 brevets



Emergence

Collaboration
avec les
biologistes

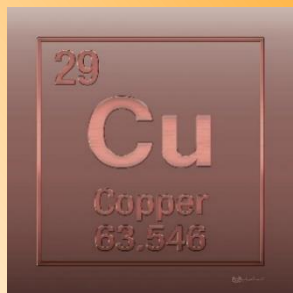
Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

La chimie bio-inorganique au service des interactions métaux-vivant ?

Peptides biomimétiques

Inspirés de sites connus
dans les protéines

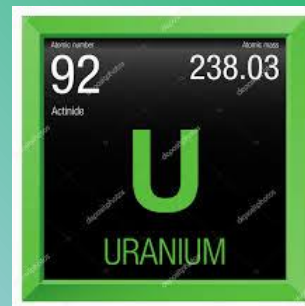


Homéostasie du Cu et
protéines de détoxification
très bien identifiées



Chélateurs du Cu(I) bio-
inspirés efficace pour la
maladie de Wilson

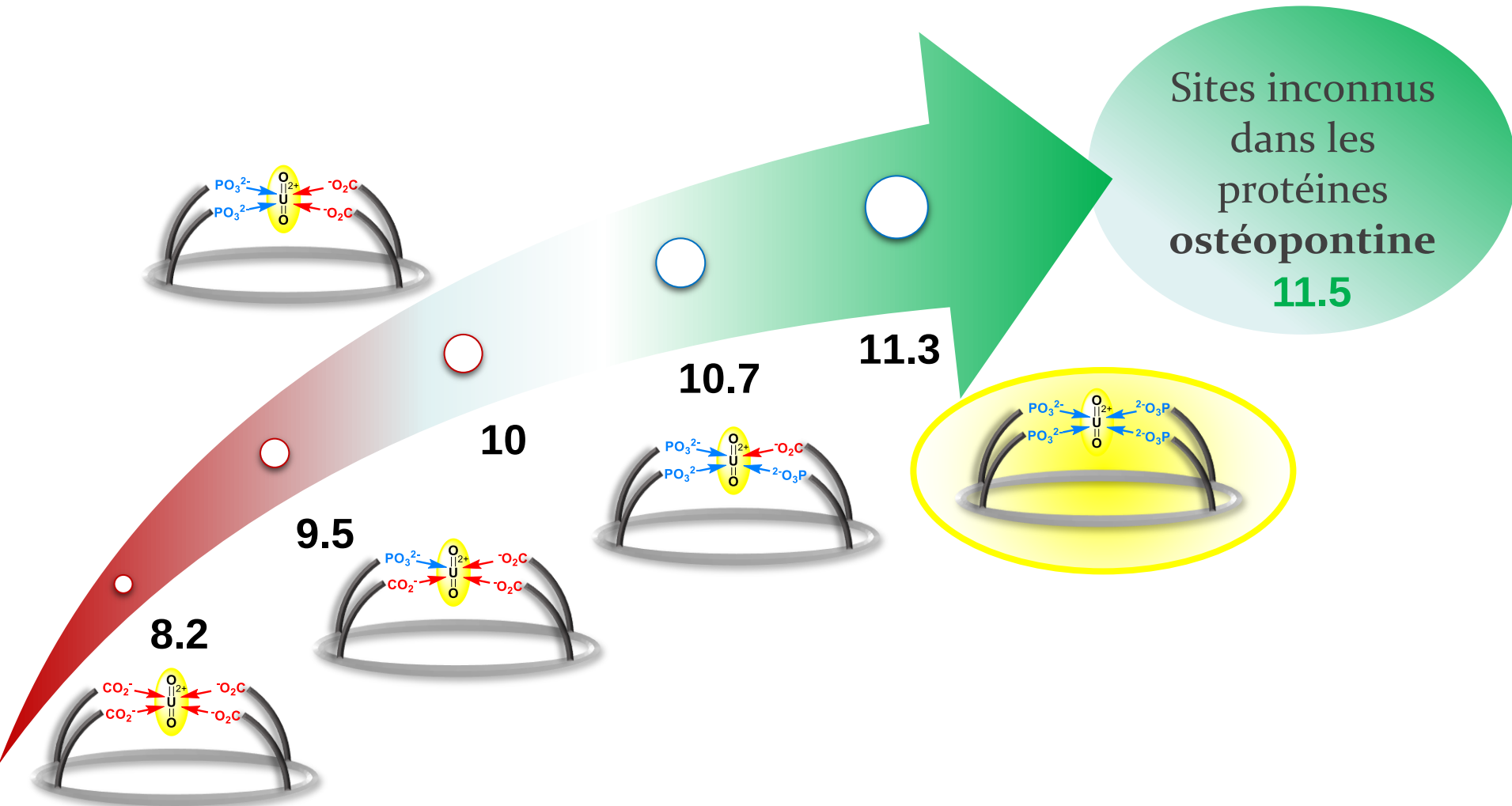
Mis au point *de novo*



Sites de liaison de l'uranium
inconnus dans les protéines

Conclusions et perspectives

$$\log K_1^{pH\ 7.4} \approx \text{affinité}$$

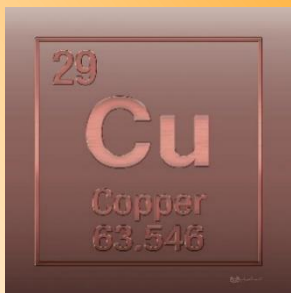


Conclusions and perspectives

La chimie bio-inorganique au service des interactions métaux-vivant ?

Peptides biomimétiques

Inspirés de sites connus
dans les protéines

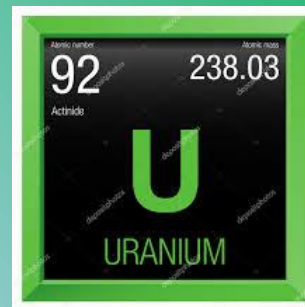


Homéostasie du Cu et
protéines de détoxification
très bien identifiées



Chélateurs du Cu(I) bio-
inspirés efficace pour la
maladie de Wilson

Mis au point *de novo*



Sites de liaison de l'uranium
inconnus dans les protéines



Peptides bio-inspirés $\Rightarrow$
identification de la
coordination de l'uranyle *in*
vivo en lien avec sa toxicité

Collaborateurs

Christelle GATEAU
Colette LEBRUN
Yves CHENAVIER

Collaborateurs U

Vicky Gathu

Stéphane Oros

Matthieu Starck ★

Nathalie Sissomay

Fanny Laporte ★

Aditya Garai

Emilie Régnier

Collaborateurs Cu

Olivier Sénèque

Pierre Rousselot-Pailley

Anaïs Pujol ★

Céline Rivaux

Anne-Solène Jullien

Bastien Boff

Marie Monestier ★

Faustine Robert

Edit Mesterhazy

Michael Claron

Biologie du Cu LCBM

Elisabeth Mintz

Martine Cuillel

Peggy Charbonnier

Amélie Harel

Khémary Um

Michel Ferrand

Serge Crouzy

INSERM Orsay

Doris Cassio

Animals studies (BGE)

Virginie Brun

Michel Jaquinod

Protéines U IBEB

Claude Vidaud

Catherine Berthomieu

Christophe Den Auwer

Damien Bourgeois

Georges Carles

XAS: ESRF/Fame

Isabelle Kieffer

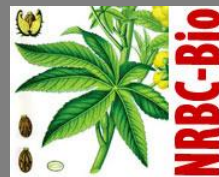
Denis Testemale

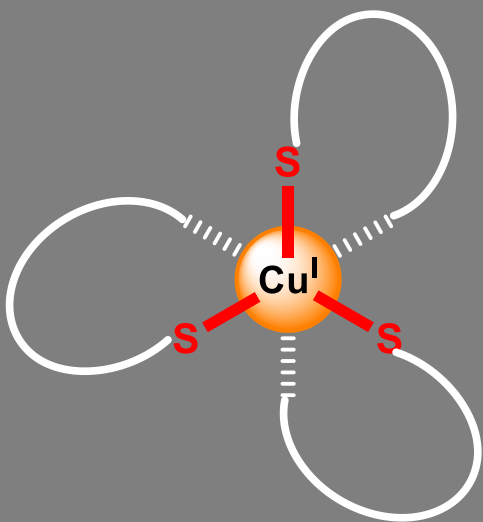
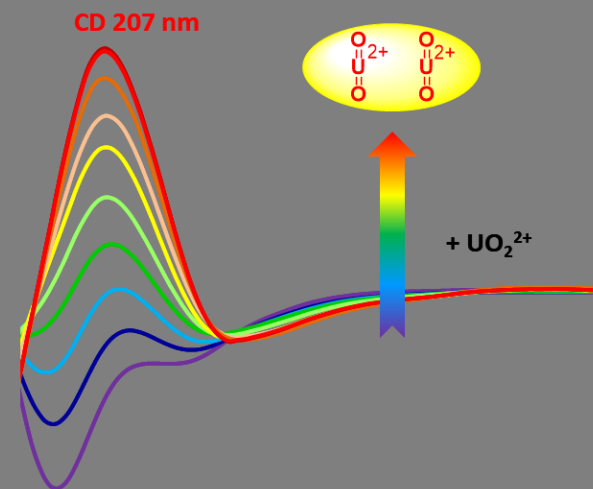
Olivier Proux



Glycopeptides (DCM)

Olivier Renaudet





Merci pour votre attention

