

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

Catherine BERTHOMIEU

CEA - Bioscience and Biotechnology Institute Aix-Marseille UMR 7265

IPM, Cité des Energies Bat 1900, CEA-Cadarache, 13108 Saint Paul-lez-Durance

catherine.berthomieu@cea.fr

L'uranium présente une toxicité radiologique et chimique pour les organismes vivants. En tant qu'émetteur alpha, sa radio-toxicité est très localisée. De ce fait, l'impact radiologique comme l'impact chimique de l'uranium sur les organismes résulte d'interactions directes avec les molécules biologiques. Ces interactions déterminent de plus les mécanismes moléculaires d'incorporation, de transport et de stockage de l'uranium.

Les protéines jouent un rôle clé dans ces interactions et dans le mécanisme de transport de l'uranium. Une meilleure connaissance des déterminants des interactions entre uranium et protéines est donc importante pour mieux évaluer les mécanismes de sa toxicité et pour développer des contre-mesures en cas d'exposition. Cela permettrait également de développer de nouvelles molécules affines et sélectives qui pourraient être utilisées pour la décontamination ou la biorémédiation.

Ces dernières années, un nombre croissant d'études a porté sur l'identification et la caractérisation des interactions entre protéines et uranium *in vivo* et *in vitro*, permettant d'identifier des cibles possibles de l'uranium *in vivo* (revue dans Lin et al. 2020; Garai & Delangle 2020, Beccia et al. 2022, Gallois et al. 2022, Pardoux et al. 2022, Vallet et al. 2022) et de déterminer des constantes d'affinité pour l'uranyle, un paramètre important pour prédire la toxicité de l'uranium. Ces études ont également montré que l'uranium peut remplacer des métaux biologiques, tels que le fer ou le calcium, dans des métalloprotéines essentielles comme la transferrine, principal transporteur de fer dans le sang (Vidaud et al. 2007), ou la calmoduline, protéine de la signalisation calcique qui module plus de 100 protéines impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Pardoux et al. 2012, Beccia et al. 2022).

Nous avons montré que l'affinité de l'uranium pour la calmoduline était nettement supérieure à celle du calcium (Pardoux et al. 2012 ; Beccia et al. 2022). De plus, la fixation d'uranium entrave la fonction de la calmoduline comme démontré *in vitro* par la diminution de l'activité enzymatique de la phosphodiesterase qui dépend d'une interaction avec la calmoduline (Brulfert et al. 2017). Ces données illustrent que la toxicité chimique de l'uranium peut être associée à sa capacité à entrer en compétition avec les cations biologiques, à se lier aux protéines et à altérer leur rôle physiologique.

Il est donc primordial de mieux comprendre les facteurs qui régissent la stabilisation thermodynamique de l'uranium dans les protéines afin de mieux comprendre et de prédire sa toxicité chimique *in vivo*.

En utilisant comme plateforme d'ingénierie protéique le domaine N-terminal de la calmoduline, qui fixe deux atomes de calcium au niveau de deux motifs de fixation de type hélice-boucle-hélice, nous avons analysé de façon quantitative l'effet de différents facteurs sur l'affinité des sites pour l'uranium. Nous avons montré que les complexes uranyle formés par les site I et site II de la calmoduline sont plus stables que ceux formés avec le calcium, avec des valeurs de $K_d = 25 \pm 6$ nM et 38 ± 1 μ M, respectivement pour le site I et $K_d = 270 \pm 42$ nM et 55 ± 11 μ M, respectivement, pour le site II à pH 6, et qu'il existe un faible effet de coopérativité pour la fixation du deuxième uranyle par rapport au premier (Beccia et al. 2022).

De plus, nous avons montré que l'introduction d'un ligand phosphorylé dans le site I permettait d'augmenter de manière significative l'affinité de liaison à l'uranyle, avec $K_d = 320 \pm 57$ pM pour le site phosphorylé, par une interaction directe entre le groupement phosphorylé et l'uranium (Pardoux et al. 2012, Sauge-Merle et al. 2017). Ce résultat est en accord avec le grand nombre de protéines phosphorylées parmi les protéines cibles potentielles de l'uranium identifiées par les approches de métalloprotéomique.

Nous avons finalement montré que la structure de la boucle de liaison a un effet très important sur l'affinité pour l'uranyle et qu'une augmentation de l'affinité de deux ordres de grandeur, passant de $K_d = 25 \pm 6$ nM à $K_d \leq 210$ pM à pH 6 pouvait être obtenue, sans changer la nature chimique des ligands, mais en optimisant la structure de la boucle de fixation de l'uranyle (Pardoux et al. 2022). Cette forte affinité obtenue en supprimant deux acides aminés de la boucle permet de plus de supprimer l'affinité pour le calcium.

Nos différentes stratégies nous ont permis de moduler l'affinité du domaine N-terminal de la calmoduline pour l'uranyle, en identifiant les facteurs structuraux régissant cette interaction au niveau moléculaire. Nous avons également pu reproduire dans un peptide assez court les propriétés de forte affinité pour l'uranium et de fixation efficace de l'uranium en présence de très fortes concentrations en calcium. Ce peptide non phosphorylé pourrait présenter un intérêt pour développer des biosenseurs ou des systèmes d'extraction sélective d'uranium.

Références :

- Beccia, M.R., Sauge-Merle, S., Brémond, N., Lemaire, D., Henri, P., Battesti, C., Guilbaud, P., Crouzy, S., Berthomieu, C. (2022) Inter-Site Cooperativity of Calmodulin N-Terminal Domain and Phosphorylation Synergistically Improve the Affinity and Selectivity for Uranyl, *Biomolecules* 12, 1703
- Brulfert, F., Safi, S., Jeanson, A., Foerstendorf, H., Weiss, S., Berthomieu, C., Sauge-Merle, S., and Simoni, E. (2017) Enzymatic activity of the CaM-PDE1 system upon addition of actinyl ions, *J. Inorg. Biochem.* 172, 46-54.
- Gallois, N., Alpha-Bazin, B., Bremond, N. et al. Correction: Discovery and characterization of UipA, a uranium- and iron-binding PepSY protein involved in uranium tolerance by soil bacteria. *ISME J* 16, 902–903 (2022).
- Garai, A., Delangle, P., (2020) Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides. *J. Inorg. Biochem.* 203, 110936.
- Lin, Y.W. (2020) Uranyl Binding to Proteins and Structural-Functional Impacts, *Biomolecules* 10(3) 457.
- Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Guilloreau, L., Adriano, J. M., and Berthomieu, C. (2012) Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation, *Plos One* 7(8): e41922.
- Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Bremond, N., Beccia, M.R., Lemaire, D., Battesti, C., Delangle, P., Solari, P.L., Guilbaud, P., Berthomieu, C. (2022) Optimized Coordination of Uranyl in Engineered Calmodulin Site 1 Provides a Subnanomolar Affinity for Uranyl and a Strong Uranyl versus Calcium Selectivity. *Inorg. Chem.* 61, 20480-20492.
- Sauge-Merle, S., Brulfert, F., Pardoux, R., Solari, P.L., Lemaire, D., Safi, S., Guilbaud, P., Simoni, E., Merroun, M.L., Berthomieu, C. (2017) Structural Analysis of Uranyl Complexation by the EF-Hand Motif of Calmodulin: Effect of Phosphorylation. *Chemistry*. 23, 15505-15517.
- Vallet, A., Martin-Laffon, J., Favier, A., Revel, B., Bonnot, T., Vidaud, C., Armengaud, J., Gaillard, J.C., Delangle, P., Devime, F., Figuet, S., Serre, N.B.C., Boeri Erba, E., Brutscher, B., Ravanel, S., Bourguignon J., Alban, C. (2022) The plasma membrane-associated cation-binding protein PCaP1 of *Arabidopsis thaliana* is a uranyl-binding protein, *Journal of Hazardous Materials*, (2022) doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130668>
- Vidaud, C., Gourion-Arsiquaud, S., Rollin-Genetet, F., Torne-Celer, C., Plantevin, S., Pible, O., Berthomieu, C., Quéméneur, E. (2007) Structural consequences of binding of UO_2^{2+} to apotransferrin: can this protein account for entry of uranium into human cells? *Biochemistry*. 2007 46, 2215-26.