



HAL
open science

Mécanisme d'interaction des actinides avec une protéine : la calmoduline.

Florian Brulfert

► **To cite this version:**

Florian Brulfert. Mécanisme d'interaction des actinides avec une protéine : la calmoduline.. Radiochimie. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS219 . tel-01404260

HAL Id: tel-01404260

<https://theses.hal.science/tel-01404260>

Submitted on 28 Nov 2016

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.

NNT : 2016SACLS219

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS SUD

ÉCOLE DOCTORALE 576
Particules, Hadrons, Énergie, Noyau, Instrumentation, Imagerie, Cosmos et
Simulation (PHENIICS)

Spécialité de doctorat : Avale du cycle nucléaire, Radioprotection et
Radiochimie

Par

Florian BRULFERT

Mécanisme d'interaction des actinides avec une protéine : la calmoduline

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 28 septembre 2016 :

Composition du Jury :

Mme Sandrine Lacombe	Professeur, Université Paris-Sud	Présidente du jury
Mr Jean Aupiais	Docteur, CEA/DAM Bruyère le Châtel	Rapporteur
Mr Christophe Den Auwer	Professeur, Université Nice	Rapporteur
Mr Éric Simoni	Professeur, Université Paris-Sud	Directeur de thèse
Mme Catherine Berthomieu	Docteur, CEA/DSV Cadarache	Examinatrice
Mr Thomas Vercouter	Docteur, CEA Saclay	Examineur
Mr Samir Safi	Docteur, IPN Orsay	Invité

*Il est certains esprits dont les sombres pensées
Sont d'un nuage épais toujours embarrassées ;
Le jour de la raison ne le saurait percer.
Avant donc que d'écrire, apprenez à penser.
Selon que notre idée est plus ou moins obscure,
L'expression la suit, ou moins nette, ou plus pure.
Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement,
Et les mots pour le dire arrivent aisément.*

*Surtout qu'en vos écrits la langue révérée
Dans vos plus grands excès vous soit toujours sacrée.
En vain, vous me frappez d'un son mélodieux,
Si le terme est impropre ou le tour vicieux :
Mon esprit n'admet point un pompeux barbarisme,
Ni d'un vers ampoulé l'orgueilleux solécisme.
Sans la langue, en un mot, l'auteur le plus divin
Est toujours, quoi qu'il fasse, un méchant écrivain.*

*Travaillez à loisir, quelque ordre qui vous presse,
Et ne vous piquez point d'une folle vitesse :
Un style si rapide, et qui court en rimant,
Marque moins trop d'esprit que peu de jugement.
J'aime mieux un ruisseau qui, sur la molle arène,
Dans un pré plein de fleurs lentement se promène,
Qu'un torrent débordé qui, d'un cours orageux,
Roule, plein de gravier, sur un terrain fangeux.
Hâtez-vous lentement, et, sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage :
Polissez-le sans cesse et le repolissez ;
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez.*

Nicolas Boileau, *L'Art poétique*, 1674

Remerciements

J'aimerais dans un premier temps remercier mes parents qui m'ont toujours poussé et encouragé lors de mes études et qui ont fait en sorte que j'ai la meilleure éducation possible.

Je voudrais remercier également mes amis, en particulier le « groupe de l'IUT », qui m'ont permis de décompresser et d'éviter de penser aux divers soucis que j'ai pu rencontrer pendant ces trois ans de thèse.

Je remercie aussi tous les thésards et post docs de l'IPN, en particulier Gabriela, Davide, Kim, Marie, Gerardo et Servando, qui ont partagé mon quotidien pendant trois ans. Leur bonne humeur, délires et soirées jeux ont d'une certaine manière contribué à la réussite de cette thèse.

J'aimerais ensuite remercier Éric Simoni, mon directeur de thèse, qui, tout au long de ma thèse m'a fait part de ses conseils constructifs et m'a ainsi permis d'éviter de me perdre en route.

Je n'oublie pas non plus mes deux encadrants, Samir Safi et Aurélie Jeanson, que je remercie pour leur optimisme, leur enthousiasme et leur aide quotidienne. Malgré leur départ de l'IPN ils sont restés disponibles et ont continué à me conseiller, notamment lors de l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie aussi tous ceux qui ont participé de près ou de loin aux travaux que je présente ici. Merci à Catherine Berthomieu et Sandrine Sauge-Merle du CEA de Cadarache avec qui nous avons collaboré tout au long de cette thèse et qui ont produit une grande partie de la calmoduline utilisée. Merci à Jérôme Roques et Ernesto Martinez-Baez de l'IPN d'Orsay qui ont réalisés les calculs DFT. Merci à Pier Lorenzo Solari, le scientifique responsable de la ligne Mars de SOLEIL, pour son aide lors de nos journées et nuits passées sur la ligne de lumière. Merci également à Johannes Raff, Björn Drobot, Harald Foerstendorf, Stephen Weiss et Atsushi Ikeda-Ohno qui m'ont

accueilli au HZDR de Rossendorf à Dresde pendant deux séjours d'un mois lors desquels j'ai pu apprendre à produire la calmoduline et où j'ai pu réaliser des expériences supplémentaires, nécessaires à l'achèvement de mes travaux, que je n'aurais pas pu mener à l'IPN.

Je remercie enfin les membres du jury, Monsieur Jean Aupiais et Monsieur Christophe Den Auwer qui ont accepté d'être rapporteurs et de juger mon manuscrit, ainsi que Mesdames Sandrine Lacombe et Catherine Berthomieu et Monsieur Thomas Vercoüter pour leur participation à mon jury de thèse.

Sommaire

Table des illustrations	9
-------------------------------	---

Liste des Tableaux	15
--------------------------	----

Introduction générale

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1. Généralités sur les actinides.....	29
2. Études physiologiques	40
3. Complexation des actinides en milieu physiologique	45
4. Mécanismes d'entrée des métaux exogènes dans les cellules	49
5. Généralités sur la calmoduline	52
6. Chélation des actinides	59

Chapitre 2 : Interactions actinides-calmoduline et structure des complexes

1. Interaction entre les ions actinyles et la calmoduline	79
2. Site de complexation des actinyles dans la protéine	89
3. Complexation des actinides trivalents par la CaM	106
4. Conclusion	110

Chapitre 3 : Effets des actinides sur les fonctions de la calmoduline

1. Suivi d'une réaction enzymatique en présence d'An	123
2. Étude spectroscopique des complexes CaM-An	139
3. Chélation des ions actinyles.....	146
4. Conclusion	152

Conclusion générale

Annexe A

1. Préparation des solutions mères.....	167
2. Préparation des ligands et des protéines.....	168

Annexe B

1. Spectrophotométrie UV-visible	173
2. Spectroscopie Laser Résolue en Temps (SLRT)	175
3. Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)	180
4. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).....	185
5. Spectroscopie Raman	188
6. Spectrométrie Infrarouge	189
7. Ultrafiltration.....	192
8. ICP-OES	193
9. Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)	195
10. Spectroscopie d'absorption des rayons X.....	196

Annexe C

1. Données thermodynamiques.....	207
2. Temps de vie et spécificités spectrales de l'uranium (VI)	209
3. Constantes d'hydrolyse de l'euporium	210

Table des illustrations

Chapitre 1 :

Figure 1 : Carte des modes de désintégration.....	29
Figure 2 : Famille $4n + 2$ de l'uranium 238	31
Figure 3 : cinétique d'évacuation des actinides du sang (ECF) et cinétique de fixation sur les organes cibles après injection dans des souris a) uranyle(66), b) neptunyle(67), c) plutonium(IV)(68).	42
Figure 4 : Représentation à gauche du complexe uranyle-proline, et, au centre et à droite du complexe uranyle-glycine d'après Van Horn et al.(74)	46
Figure 5 : Coordination de l'uranyle avec des acides aminés(74)	46
Figure 6 : Structure cristalline de $[NpO_2(CH_3COO)(Im)_2(H_2O)]$ d'après Andreev et al.(84)	47
Figure 7 : Vue en coupe d'une cellule animale eucaryote	49
Figure 8 : Modes d'entrée dans une cellule	50
Figure 9 : Fraction de chaque espèce en fonction de la concentration en calmoduline. (Concentration en CaM de $15\mu M$)(105).	53
Figure 10 : Schéma du site de complexation du calcium de la calmoduline <i>Paramecium tetraurelia</i> (107).....	54
Figure 11 : Structure de l'apo-calmoduline (référence PDB 1CFC) et du complexe calcium calmoduline (référence PDB 3CLN). Le calcium est représenté par les sphères vertes.	55
Figure 12 : mécanisme d'activation de la CaM et de l'enzyme cible (*correspond à la molécule en conformation active).	56
Figure 13 : Effets du calcium et de la calmoduline sur les changements de plasticité synaptique(98).....	57
Figure 14 : affinité du calcium pour la CaM en absence et en présence de protéine cible ..	57
Figure 15 : acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA)	60
Figure 16 : 3,4,3-LI(1,2-HOPO) (en haut) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (en bas)	61

Chapitre 2 :

- Figure 1: Schéma du domaine 1 de la calmoduline. Les résidus d'aspartate qui apparaissent en rouge dans le site 2 ont été mutés en alanine. 79
- Figure 2 : Evolution du spectre de fluorescence de l'uranyle en présence de CaM de pH 3 à pH 7 (lignes grises) comparé au spectre de l'uranyle libre à pH 3 (- -). 81
- Figure 3 : Evolution de la proportion (rapport des intensités de fluorescence relatives à chaque temps de vie) de chaque temps de vie en fonction du pH. 24 μ s (Δ), 4 μ s (\blacksquare), 2 μ s (\star), 0.4 μ s (\blacksquare), 1 μ s (∇), 7 μ s (\circ). 82
- Figure 4 : Déconvolution spectrale calculée par Hypspec à pH 3,5. Spectre expérimental (ligne noire), complexe CaM(UO₂²⁺) (ligne bleue), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue) et uranyle libre (ligne verte). 85
- Figure 5 : Déconvolution spectrale calculée par Hypspec à pH 7. Spectre expérimental (ligne noire), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue), (UO₂)(OH)₃⁻ (points rouges) et (UO₂)₂(OH)₂ (ligne brisée noire). 85
- Figure 6 : Diagramme de spéciation de l'uranyle (4 x 10⁻⁵) en présence de CaM (1 x 10⁻⁴). Complexe CaM(UO₂²⁺) (ligne bleue), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue), uranyle libre (ligne verte), (UO₂)₃(OH)₅⁻ (ligne brisée rouge), UO₂(OH)₃⁻ (ligne orange). 86
- Figure 7 : Titration du Np(V) (1 x 10⁻⁴ M) par la calmoduline (0-1,5 eq). pH 7,4 ; T = 20°C 88
- Figure 8 : Modèles théoriques optimisés par DFT et densité électronique des sites d'interaction de la CaM_{WT} avec l'U^{VI} (colonne de gauche) et le Np^V (colonne de droite) (Oxygène : rouge, carbone : bleu, azote : vert clair, uranium : jaune, neptunium : vert foncé). 91
- Figure 9 : Transformées de Fourier des données EXAFS obtenues pour le complexe CaM_{WT}-U^{VI} à des pH différents. (en bas : pH 3 ; en haut pH 6). Les lignes représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants. 96
- Figure 10 : Spectres EXAFS en k³ du niveau d'énergie U L_{III} pour les complexes CaM_{WT}-U^{VI} à différents pH (pH 3 en bas ; pH 6 en haut). Les lignes noires représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants. 96

Figure 11 : Transformées de Fourier des données EXAFS obtenues pour le complexe $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-Np}^{\text{V}}$ à des pH différents. (en bas : pH 7 ; en haut pH 9). Les lignes représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.	101
Figure 12 : Spectres EXAFS en k^3 du niveau d'énergie Np L_{III} pour les complexes $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-Np}^{\text{V}}$ à différents pH (pH 7 en bas ; pH 9 en haut). Les lignes noires représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.....	101
Figure 13 : Rayon ionique du calcium et de l'euporium en fonction de leur nombre de coordination.....	106
Figure 14 : Structure des niveaux d'énergie pour les actinides et les lanthanides (30)	107
Figure 15 : Spectre de fluorescence de l'euporium en présence de CaM à des pH différents (pH 2,3-7,5).....	107
Figure 16 : Évolution de la proportion des temps de vie (rapport des intensités de fluorescence) des espèces d'euporium en fonction du pH.....	108

Chapitre 3 :

Figure 1 : Structure de la phosphodiesterase PDE_1 (PDB 4OJV (10))	123
Figure 2 : Hydrolyse de l'adénosine monophosphate cyclique par la PDE_1	125
Figure 3 : Données brutes de l'hydrolyse du cAMP par la PDE_1 (2 nM) avec la CaM (160 nM) (ligne noire) et sans la CaM (ligne grise)	126
Figure 4 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM (■) et sans CaM (●), pH 7.4 ; $T=30^\circ\text{C}$	128
Figure 5 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM(■), avec l'enzyme seule (●) et avec l'enzyme seule en présence d'uranyle (▲), pH 7.4 ; $T=30^\circ\text{C}$	130
Figure 6 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante d'uranium. 0 nM (■), 50 nM (●), 100 nM (▲), 500 nM (◆). pH 7.4 ; $T=30^\circ\text{C}$	131
Figure 7 : Activité enzymatique maximal en fonction de la concentration d'uranium en solution	132
Figure 8 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM(■), avec l'enzyme seule (●) et avec l'enzyme en présence de neptunyle (▲), pH 7.4 ; $T=30^\circ\text{C}$	133

Figure 9 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante de neptunium. 0 nM (■), 30 nM (●), 50 nM (▲), 120 nM (◆). pH 7.4 ; T=30°C.	134
Figure 10 : Activité enzymatique maximale en fonction de la concentration en neptunyle dans le milieu	135
Figure 11 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Avec CaM et Ca (■), enzyme seule (●) et avec CaM et Eu (■).	137
Figure 12 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante d'euporium. 0 nM (■), 630 nM (▼), 1000 nM (▲), 2000 nM (◆), 5000 nM (●). pH 7.4 ; T=30°C.....	138
Figure 13 : Spectre infrarouge de différence du complexe CaM-Np(V) moins la CaM pure à différent ratio de métal. pH 7 dans le D ₂ O. (1 : 1 (noir), 1 : 2 (rouge), 1 : 4 (bleu), 1 : 8 (vert). Comparaison avec le spectre infrarouge de différence du complexe CaM-U(VI) moins la CaM pure à pH 6 dans H ₂ O (ratio de 1 : 4 (gris)) et le spectre de différence du complexe CaM-Ca moins la CaM pure (violet).....	140
Figure 14 : spectre infrarouge du complexe CaM-neptunyle avec soustraction du spectre de la calmoduline pure. (Spectre expérimental (noire), somme des contributions du fit (rouge), contributions du fit (gris).	141
Figure 15 : Spectre Raman du complexe CaM-Ca moins la CaM pure (ligne noire) et du complexe CaM-U moins la CaM pure (ligne pointillée). Le zéro est également représenté pour chaque spectre de différence.....	142
Figure 16 : Intensité de la lumière diffusée en fonction du diamètre hydrodynamique (nm) pour la protéine native a), CaM-Ca b), CaM-U c) et CaM-Np d).....	144
Figure 17 : Effet du 5-LIO(Me-3,2-HOPO sur la réaction enzymatique	147
Figure 18 : Titration du neptunium (V) par le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,7 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 10 équivalents de ligand)	148
Figure 19 : activité enzymatique en présence de 500 nM d'uranyle et d'une concentration variable de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) : 0 nM (◆), 300 nM (▲) et 600 nM (●). L'activité enzymatique de référence est également représentée ici (■).	150
Figure 20 : activité enzymatique en présence de 500 nM d'uranyle et d'une concentration variable de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) : 0 nM (◆), 300 nM (▲) et 600 nM (●). L'activité enzymatique de référence est également représentée ici (■).	151

Annexe B :

Figure 1 : Spectre d'absorption du neptunium en solution dans du HClO_4 2M : a) Np(III) , b) Np(IV) , c) Np(V) , d) Np(VI)(I)	174
Figure 2 : Montage expérimental (boite à gants) pour l'analyse en UV-visible	175
Figure 3 : Diagramme d'énergie et levée de dégénérescence pour un ion Ln^{3+}	177
Figure 4 : Niveaux d'énergie de l'ion aquo Eu(III) et transitions associées.....	177
Figure 5 : Emission de fluorescence de l'uranyle.....	178
Figure 6 : Montage expérimental utilisé pour les expériences SLRT.....	179
Figure 7 : Principe et fonctionnement de l'ITC	181
Figure 8 : activité enzymatique en fonction de la concentration en cAMP pour des expériences réalisées à différentes concentration de protéine : 640 nM (gris clair), 320 nM (gris foncé), 160 nM (noir).	183
Figure 9 : Montage expérimental et boite à gants utilisés pour les expériences ITC.....	185
Figure 10 : Principe de la mesure de la diffusion dynamique de la lumière pour un échantillon	186
Figure 11 : Différentes transitions énergétiques pouvant avoir lieu lors d'une analyse Raman. ν_0 : fréquence d'excitation laser, ν_{vib} : fréquence de vibration de la molécule analysée.....	188
Figure 12 : Niveaux d'énergie d'une molécule.....	190
Figure 13 : Changement du moment dipolaire d'une molécule diatomique hétéronucléaire	191
Figure 14 : photo de l'ICP Agilent 720-ES utilisé lors de l'analyse	194
Figure 15 : Droites d'étalonnage aux quatre longueurs d'ondes d'intérêt	194
Figure 16 : Schéma du synchrotron SOLEIL et de ses différentes composantes	196
Figure 17 : Spectre d'absorption X au seuil L_{III} du neptunium pour un complexe Np-CaM	198
Figure 18 : cadre contenant trois cellules en acier installées sur le porte échantillon avec en arrière-plan le détecteur au germanium.	199
Figure 19 : Schéma d'une ligne de lumière	201
Figure 20 : cabine de mesure de la ligne MARS de SOLEIL	202

Annexe C :

Figure 1: Diagramme de spéciation de l'uranyle en fonction du pH avec une concentration en métal de 500 nM. Uranyle libre (ligne verte), $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^-$ (ligne rouge), $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ (ligne bleue), $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ (ligne rose), $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ (ligne violette) et $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})^{2+}$ (ligne orange)..... 208

Figure 2: Diagramme de spéciation de l'uranyle en fonction du pH avec une concentration en métal de 50 nM. Uranyle libre (ligne verte), $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^-$ (ligne rouge), $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ (ligne bleue), $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ (ligne rose) et $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ (ligne violette)..... 208

Liste des Tableaux

Chapitre 1 :

Tableau 1 : Distribution d'actinides injectés par intraveineuse dans des souris (a) et rats (b)(62).	44
--	----

Chapitre 2 :

Tableau 1 : Liste des temps de vie mesurés et les espèces qui leurs sont associés.....	83
Tableau 2 : Constantes de stabilité apparente des complexes de CaM	84
Tableau 3 : Distances et énergies de liaison calculées par DFT pour les quatre complexes	91
Tableau 4 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-U ^{VI} déterminé à pH 3. $S_o^2=1$; $\Delta E_o= 3,8$ eV. $R=0,003$; $\chi^2_{i ln}= 4,2$	94
Tableau 5 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-U ^{VI} déterminé à pH 6. $S_o^2=1$; $\Delta E_o= 3,6$ eV. $R=0,001$; $\chi^2_{i ln}= 5,6$	95
Tableau 6 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-N ^V déterminé à pH 7. $S_o^2=1,05$; $\Delta E_o= 9$ eV. $R=0,001$; $\chi^2_{i ln}= 5,8$	99
Tableau 7 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-N ^V déterminé à pH 9. $S_o^2=1,05$; $\Delta E_o= 9$ eV. $R=0,004$; $\chi^2_{i ln}= 8$	100

Chapitre 3 :

Tableau 1 : paramètres cinétiques obtenus avec et sans la calmoduline en solution	128
Tableau 2 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence d'uranyle	130
Tableau 3 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'uranyle	131
Tableau 4 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence de neptunyle.....	133
Tableau 5 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'uranyle	135
Tableau 6 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM et le Ca, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence d'euporium.....	137

<i>Tableau 7 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'europlum</i>	138
<i>Tableau 8 : Diamètre hydrodynamique des échantillons de calmoduline mesurés</i>	145
<i>Tableau 9 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence et en absence de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)</i>	147
<i>Tableau 10 : paramètres enzymatiques obtenus en présence d'uranyle et de différentes concentrations de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)</i>	150
<i>Tableau 11 : paramètres enzymatiques obtenus en présence de neptunyle et de différentes concentrations de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)</i>	151

Annexe B :

<i>Tableau 1 : paramètres cinétiques du système avec des concentrations de calmoduline variables</i>	183
--	-----

Annexe C :

<i>Tableau 1 : constantes d'hydrolyse de l'uranyle</i>	207
<i>Tableau 2 : pK_A des acides aminés de la CaM</i>	207
<i>Tableau 3 : Temps de vie des espèces hydrolysées de l'uranyle et bandes spécifiques</i>	209
<i>Tableau 4 : Constantes d'hydrolyse de l'europlum en solution</i>	210

Introduction générale

Lors des dernières décennies, la part grandissante de l'énergie nucléaire dans le mix énergétique aussi bien que la menace d'une contamination causée par une bombe sale, ont mené les scientifiques à se concentrer de plus en plus sur l'impact que les actinides pourraient avoir sur la biosphère et plus particulièrement sur le corps humain en cas de contamination interne. Les travaux sur l'effet des actinides radiotoxiques ont commencé en même temps que le projet Manhattan(1) puis ont fait l'objet d'une préoccupation accrue pendant la guerre froide. Les accidents nucléaires de Tchernobyl puis de Fukushima ont relancé l'intérêt porté à de tels métaux toxiques et principalement à leur devenir dans le corps humain.

L'uranium, qui est largement utilisé pour des applications industrielles (production d'électricité) et militaires (blindages en uranium appauvri), est d'un intérêt particulier et sa toxicité a été amplement étudiée(2-4). En cas d'une contamination interne, l'uranium entre dans le sang sous forme d'uranyle (UO_2^{2+}) où il se lie par la suite à des métalloprotéines comme l'albumine ou la transferrine(5). L'uranium se dépose alors dans ses organes cibles qui sont les tissus osseux et les reins. Le neptunium, qui est l'un des actinides mineurs les plus bio-disponibles produit par le réacteur nucléaire à fission, présente également un grand intérêt. Son principal degré d'oxydation dans les conditions physiologiques est Np(V) (neptunyle NpO_2^+) ce qui le rend structurellement comparable à l'uranyle étant donné que les deux métaux possèdent deux oxygènes axiaux (structure en bâtonnet). Le principal organe cible du neptunium est le squelette mais il est observé également dans le foie et dans une moindre mesure les reins(5).

Jusqu'à aujourd'hui, les principaux travaux menés sur l'effet des actinides l'ont été sur des animaux (rats et souris principalement) et par conséquent les données obtenues relèvent principalement de la biocinétique ou de la physiologie. Il n'existe que très peu d'information sur l'aspect microscopique (structure du site de coordination, mécanismes) des interactions entre actinides et molécules biologiques (protéines, peptides). Ces données microscopiques sont en effet essentielles pour l'appréhension de l'interdépendance entre les aspects structure, fonction et affinité. Bien que peu d'informations soient disponibles sur le sujet, l'internalisation des

actinides (U, Np, Am) par les cellules ne fait aucun doute. Une fois internalisés, les métaux ont alors la possibilité d'interagir avec les entités composantes des cellules. Par exemple, la calmoduline (CaM) (abréviation pour CALcium-MODULated proteIN), qui est une protéine ubiquitaire responsable de la régulation métabolique du calcium(6), semble être une cible de choix. Composée de 148 acides aminés, elle est présente dans toutes les cellules eucaryotes et est impliquée dans un grand nombre de réactions biochimiques (réaction enzymatiques). La CaM possède une affinité connue pour les actinides trivalents (Pu^{3+})(7) et hexavalents (uranyle)(8) qui sont susceptible d'entrer en compétition avec le calcium qui occupe naturellement les sites de complexation de la protéine. Cette complexation de corps étrangers peut causer une perturbation des processus biochimiques dans laquelle la protéine est impliquée et donc engendrer des dommages pour les personnes contaminées.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans une approche pluridisciplinaire qui mêle la chimie des solutions, la spectroscopie et la biochimie. Le premier chapitre est consacré à la description du devenir des actinides dans le corps humain ainsi qu'à la description de la calmoduline et de ses fonctions. Comme évoqué au début de cette introduction, il n'existe pas de données microscopiques sur les interactions entre les actinides et la calmoduline. Par conséquent, le deuxième chapitre portera sur l'étude de l'affinité entre la protéine et les métaux d'intérêt (spectroscopie UV-visible et SLRT) et sur la détermination de la sphère de coordination des ions actinyles lorsqu'ils sont complexés par la calmoduline (EXAFS et calculs DFT). La sphère de coordination des métaux sera étudiée à différent pH afin de déterminer si les conditions dans lesquelles la solution est préparée influe sa composition. Une fois la complexation avérée et la sphère de coordination des métaux définie, c'est l'effet de cette complexation sur les propriétés de la protéine (notamment son implication dans les réactions enzymatiques) qui sera analysé par calorimétrie dans le dernier chapitre. La mise au point d'une méthode ITC (titration calorimétrique isotherme) pour le suivi d'une réaction enzymatique activée par la calmoduline (phosphodiesterase) nous permettra d'examiner l'effet de la complexation des actinides sur la réaction enzymatique. L'étude de la réversibilité de ces effets, en

procédant à l'ajout d'un agent chélatant (5-LIO(Me-3,2-HOPO) capable d'extraire les actinides de la protéine, conclura ces travaux de thèse.

Les annexes regroupées en fin de manuscrit portent sur la préparation des solutions et la description du principe de chaque technique expérimentale utilisée.

Références bibliographiques : Introduction

1. J. Schubert, Treatment of Plutonium Poisoning by Metal Displacement. *Science*. **105**, 389–390 (1947).
2. R. L. Kathren, R. K. Burklin, Acute Chemical Toxicity of Uranium. *Health Phys.* **94**, 170–179 (2008).
3. M. Hémadi, N.-T. Ha-Duong, J.-M. El Hage Chahine, Can Uranium Be Transported by the Iron-Acquisition Pathway? Ur Uptake by Transferrin. *J. Phys. Chem. B*. **115**, 4206–4215 (2011).
4. H. C. Hodge, Mechanism of Uranium Poisoning. *Arch Ind Health*. **14** (1956) (available at <http://www.osti.gov/scitech/biblio/5065728>).
5. P. W. Durbin, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 3339–3440.
6. C B Klee, T H Crouch, and P. G. Richman, Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 489–515 (1980).
7. P. A. Seeger *et al.*, Neutron Resonance Scattering Shows Specific Binding of Plutonium to the Calcium-Binding Sites of the Protein Calmodulin and Yields Precise Distance Information. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5118–5125 (1997).
8. R. Pardoux *et al.*, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS ONE*. **7**, e41922 (2012).

Chapitre 1 :

Étude bibliographique

Chapitre 1

1. Généralités sur les actinides	29
1.1 Toxicité des actinides	29
a) Radioactivité	29
b) Effets des radiations.....	31
c) Toxicité des actinides	32
1.2 Origine des actinides dans l'environnement	34
a) Origine naturelle.....	34
b) Origine anthropogénique.....	34
1.3 Transfert des actinides de l'environnement à la biosphère	35
a) Mobilité des actinides dans l'eau et les sols	35
b) Transfert sol-plante	37
c) Contamination animale.....	38
2. Études physiologiques.....	40
2.1. Degré d'oxydation des actinides en milieu physiologique	40
2.2. Organes cibles des actinides chez les mammifères	41
a) Transport des actinides dans le sang.....	41
b) Organes cibles.....	42
3. Complexation des actinides en milieu physiologique.....	45
3.1. Complexation des actinyles par les acides aminés	45
3.2. Interaction actinides/protéines	47
4. Mécanismes d'entrée des métaux exogènes dans les cellules	49
4.1. Les cellules eucaryotes	49
4.2. Voies d'entrée des contaminants dans la cellule	49
5. Généralités sur la calmoduline	52

5.1.	Description de la protéine	52
5.2.	Structure de la protéine et fonction	53
a)	Site de complexation du calcium	53
b)	Modification de la structure.....	54
c)	Fonctions de la CaM	55
d)	Interaction entre la calmoduline et les actinides.....	57
6.	Chélation des actinides	59
6.1.	Caractéristiques d'un agent chélatant.....	59
6.2.	Molécules décorporantes actuelles	60

Les métaux sont présents à l'état naturel dans les roches, l'eau, l'air et le sol, ils sont également produits par les activités humaines (industrielles et minières). Certains métaux comme le chrome sont essentiels à l'homme, d'autres tels que l'arsenic, le plomb, le mercure ou le cadmium sont hautement toxiques. Ils peuvent entraîner des pathologies aiguës et chroniques même à des niveaux d'exposition très faible à cause de leur capacité à s'accumuler dans l'environnement et dans l'organisme(1). Les effets de la toxicité chimique de ces métaux sont différents en fonction de leurs organes cibles ; une exposition au cadmium entraîne un endommagement des reins et des maladies pulmonaires(2) tandis que le plomb et le mercure induisent des troubles au niveau des systèmes nerveux et cardiaque(3, 4).

Ces métaux lourds ne sont pas les seuls susceptibles de provoquer des effets néfastes sur l'environnement et la santé des hommes. Il existe en effet une autre classe de métaux appelés actinides (Uranium, Neptunium, Plutonium, Américium, etc...), qui, en plus de la toxicité chimique habituelle des métaux lourds, présentent aussi une toxicité radiologique due à leur radioactivité. Ces éléments, bien que présents dans l'environnement de manière naturelle pour certains, peuvent toutefois être relâchés dans la biosphère en grande quantité suite aux activités humaines.

Lors des dernières années, la menace croissante d'une contamination due à une « bombe sale » mais aussi les accidents nucléaires comme celui de Tchernobyl ou plus récemment celui de Fukushima ont poussé les chercheurs à s'intéresser de plus en plus à l'impact de ces actinides sur la biosphère et plus spécifiquement sur le corps humain en cas de contamination interne.

1. Généralités sur les actinides

1.1 Toxicité des actinides

a) Radioactivité

La grande majorité des noyaux présents dans la nature sont stables, cependant une fraction des noyaux existant sur terre est radioactive c'est-à-dire qu'ils se désintègrent avec le temps. C'est un phénomène physique naturel au cours duquel un noyau atomique instable se désintègre, en produisant de l'énergie sous forme de rayonnements, pour se transformer en un noyau atomique plus stable. Trois différents types de rayonnement sont recensés, ils peuvent être particuliers comme c'est le cas des rayonnements α (émission de noyaux d'hélium) et β (émission d'électrons ou de positrons), ou électromagnétiques comme le sont les rayonnements γ (émission de photons). Le type de décomposition radioactive d'un noyau dépend de son nombre de protons et de neutrons (*Figure 1*).

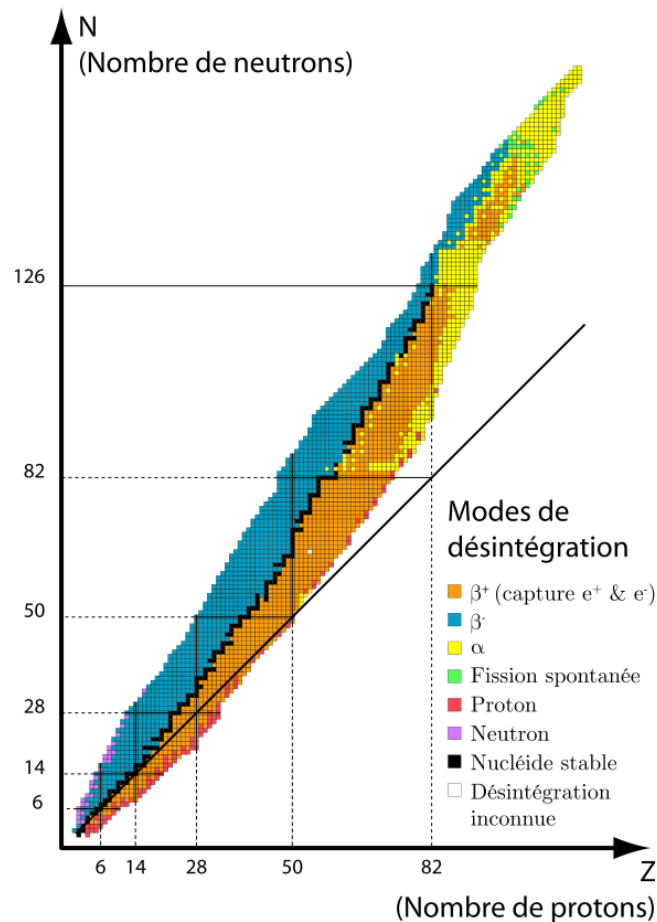


Figure 1 : Carte des modes de désintégration

L'émission de particules alpha concerne principalement les gros noyaux (ex : ${}^{237}_{93}\text{Np} \rightarrow {}^{233}_{91}\text{Pa} + {}^4_2\text{He}$). L'énergie cinétique libérée lors de ce type de désintégration est partagée entre la particule α et le noyau, l'énergie émise est spécifique à chaque noyau. Les particules produites ont une énergie très élevée (> 4 MeV) mais un pouvoir de pénétration faible (quelques centimètres dans l'air, une feuille de papier suffit à les arrêter).

Lors de l'émission radioactive β (émission d'une particule légère et chargée), le rayonnement produit est plus pénétrant que le rayonnement α mais moins énergétique. Son interaction avec la matière traversée est plus faible mais se fait sur une plus grande distance (plusieurs mètres dans l'air). On distingue deux types d'émissions β : la radioactivité β^- , qui conduit à l'émission d'un électron et d'un antineutrino, transforme un neutron du noyau en proton (ex : ${}^{233}_{91}\text{Pa} \rightarrow {}^{233}_{92}\text{U} + {}^0_{-1}\text{e}^- + {}^0_0\bar{\nu}$) et la radioactivité β^+ qui transforme un proton en neutron avec l'émission d'un positon et d'un neutrino (ex : ${}^{18}_9\text{F} \rightarrow {}^{18}_8\text{O} + {}^0_{+1}\text{e}^+ + {}^0_0\nu$).

Les rayonnements γ sont eux très énergétiques, moins ionisants mais plus pénétrants (une centaine de mètres dans l'air, plusieurs centimètres de plomb ou de béton). La radioactivité gamma se produit lorsqu'une désintégration ou une capture neutronique laisse un excès d'énergie au noyau. Le noyau se trouvant dans un état excité, il revient la plupart du temps à son état fondamental en émettant cette énergie sous forme de photons gamma.

La période ou temps de demi-vie ($T_{1/2}$) d'un isotope radioactif correspond au temps nécessaire pour que la moitié des noyaux de cet isotope se désintègre. Cette propriété dépend à la fois de l'isotope et du mode de désintégration considéré.

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad A(t) = A_0 e^{-\lambda t}$$

L'activité ($A(t)$) décroît avec le temps selon un taux de décroissance (λ). Il est généralement considéré que la totalité d'un élément a disparu après 10 périodes radioactives. Les désintégrations radioactives s'enchainent et se poursuivent jusqu'à ce qu'un élément stable, généralement le plomb, soit atteint (**Figure 2**).

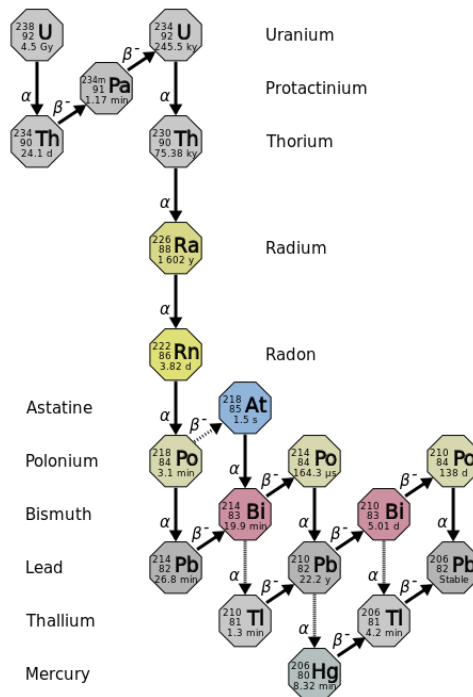


Figure 2 : Famille $4n + 2$ de l'uranium ^{238}U

b) Effets des radiations

L'activité d'un élément radioactif est généralement exprimée en becquerels (Bq) ou en curie (Ci), cependant ces unités ne rendent pas compte de la quantité d'énergie absorbée par les tissus biologiques qui sont eux définis par la dose absorbée (quantité d'énergie absorbée en un point par unité de masse de matière) qui s'exprime en grays (Gy) ou par la dose équivalente (dose absorbée par un tissu ou un organe, multipliée par un facteur tenant compte de l'effet biologique lié à la nature et à l'énergie du rayonnement) qui s'exprime en sievert (Sv)(5).

Les dégâts affectent d'abord les êtres vivants au niveau de leurs cellules dont l'élément le plus sensible est le noyau et sa molécule d'ADN. Le rayonnement ionisant dégrade le matériel génétique en cassant la molécule. La cellule est capable de réparer les dégâts causés par la radioactivité qui sont de même nature que ceux produits par des agressions chimiques ou thermiques. Toutefois, la capacité de la cellule à se réparer est limitée en cas d'irradiation intense pendant un temps très court (débit de dose élevé (Gy/s)). Les lésions qui ne peuvent pas être réparées ou qui sont mal réparées mènent à la mort de la cellule ou à une mutation.

Lorsqu'exposé à de fortes doses, les victimes subissent des dommages qui apparaissent de manière reproductible et produisent des destructions massives de cellules pouvant causer la mort (Liquidateurs de Tchernobyl). Ces effets, appelés déterministes, apparaissant au bout de quelques jours ou semaines, voient leur conséquence augmenter avec la dose reçue (mort certaine à partir de 5 grays reçus uniformément sur le corps). Les effets stochastiques sont eux causés par une exposition faible ou moyenne aux radiations ; leurs effets ne sont plus certains contrairement à ceux observés à forte dose. Ils correspondent à des mutations de cellules plutôt qu'à leur destruction. Les effets stochastiques (cancer, effets génétiques) apparaissent des années après l'exposition qui en a été la cause (e.g. Irradiés d'Hiroshima et Nagasaki) et sont par conséquent très difficiles à distinguer des cancers causés par des produits chimiques ou le tabac par exemple.

À noter que la dose effective annuelle moyenne reçue par habitant est due pour 85% à la radioactivité d'origine naturelle et 15% aux examens médicaux. La dose reçue due aux autres activités humaines (nucléaire civil, accident de Tchernobyl...) est négligeable et ne représente que moins d'un pourcent(6).

c) Toxicité des actinides

Les actinides possèdent une toxicité à la fois chimique et radiologique. Pour les éléments à longue période radioactive, la toxicité chimique l'emporte sur la toxicité radiologique comme c'est le cas pour l'uranium naturel(seulement 0,7% d' ^{235}U qui possède une période beaucoup plus courte que l' ^{238}U)(7-9). Les actinides à vie longue se comportent alors dans l'organisme comme des métaux lourds (Pb) et peuvent se substituer aux éléments naturels (Ca, Fe) intervenant dans le fonctionnement du corps humain.

Pour les actinides ayant un temps de vie plus court (^{237}Np , ^{239}Pu), la toxicité radiologique vient s'ajouter à la toxicité chimique, l'un prévalant sur l'autre en fonction de l'activité de l'élément considéré. Des effets déterministes ou stochastiques peuvent alors être causés par les radiations produites par ces éléments.

En fonction du type de radioactivité qu'ils émettent, les actinides ne présentent pas les mêmes risques. Les rayonnements γ sont très pénétrants et sont dangereux

aussi bien par exposition interne que par exposition externe. Les rayonnements α eux ont un faible pouvoir pénétrant et sont donc dangereux seulement lors d'une contamination interne. Cependant, les particules α engendrent des dégâts beaucoup plus importants que les rayonnements γ , ils sont jusqu'à vingt fois plus nocifs.

Le ^{239}Pu , le ^{237}Np et l' ^{235}U appartiennent à la catégorie de radiotoxicité la plus élevée. La toxicité de ces isotopes de plutonium et d'uranium est donc majoritairement radiologique. Pour le ^{237}Np en revanche, sa toxicité chimique est non négligeable et s'ajoute à sa toxicité radiologique très élevée ; les deux aspects sont donc à prendre en compte. La toxicité chimique très élevée du Np est caractéristique des métaux lourds et impacte principalement le foie et les reins(10).

Des études *in vivo* ont été réalisées sur différents animaux chez lesquels une dose comprise entre 3 et 6 mg.kg⁻¹ de neptunium entraînait une grande perte de poids, des hémorragies et des œdèmes similaires à ceux observés après injection d'uranium(11). La dose létale de neptunium varie entre 6 et 24 mg.kg⁻¹ selon l'espèce et le sexe de l'animal considéré(12-14).

A long terme, l'effet radiotoxique principal du neptunium se traduit par l'apparition de tumeurs malignes. Des études *in vivo* chez des animaux montrent que les tumeurs concernent principalement les poumons, le squelette et le foie(15). Les effets sur le squelette s'expliqueraient par le tropisme osseux et l'émission α du ^{237}Np (10). En combinant les données animales et le rapport du BEIR IV (Biological Effects of Ionizing Radiations)(16, 17), Taylor suggère que, chez l'homme, le risque d'induction de cancer osseux par le neptunium serait deux fois supérieur à celui du plutonium et 3 à 4 fois supérieur à celui de l'américium(18). Ceci peut s'expliquer par la contribution de la toxicité chimique(16) et/ou par une distribution différente de la dose au niveau des cellules osseuses(18).

En cas de contamination interne, les quantités mise en jeu sont généralement relativement faibles. La toxicité radiologique n'est généralement observée que lors d'une exposition prolongée aux rayonnements ionisants (effets stochastiques). Pour les actinides étudiés dans le cadre de cette thèse (le neptunium et l'uranium naturel), c'est par conséquent la toxicité chimique de ces éléments qui sera prise en compte.

1.2 Origine des actinides dans l'environnement

a) Origine naturelle

Les actinides primordiaux (^{235}U , ^{238}U et ^{232}Th) dont la période radioactive est de plusieurs milliards d'années (sauf pour l' ^{235}U qui a une demi-vie de 700 millions d'années) sont présents depuis la formation de la terre il y a 4,6 milliards d'années. L'uranium et le thorium constituant la croûte terrestre sont les seuls actinides restants de la formation de la terre et contribuent à la radioactivité ambiante naturelle. La concentration moyenne d'uranium dans la croûte terrestre est de 3 ppm(19-21), cependant, selon le minerai ou la roche étudiés, la concentration en uranium peut varier grandement (charbon : 1-4 ppm(19), granite : jusqu'à 15 ppm, certains minerais uranifères contiennent 20 000 ppm d'uranium(22)). Certaines molécules naturelles présentes dans l'environnement (phosphates) sont également connues pour leur affinité particulière pour l'uranium (jusqu'à 350 ppm) et constituent des sources alternatives ou non-conventionnelles d'uranium(23). L'uranium est également présent dans l'eau de mer en quantité non négligeable (3 ppb(19, 20)), ce qui fait des océans le premier réservoir potentiel d'uranium sur terre (4000 millions de tonnes).

Le thorium est l'actinide le plus répandu dans la croûte terrestre avec une concentration comprise entre 10 et 15 ppm(19). Le manque de précision quant à la quantité exacte de thorium disponible est dû à la quasi absence d'application industrielle pour cet élément jusque récemment.

b) Origine anthropogénique

Bien que présents naturellement, une re-concentration d'actinides, comme l'uranium ou le thorium, due aux activités humaines est constatée dans certaines zones. Les principales sources industrielles d'enrichissement local de la biosphère en uranium sont le cycle du combustible nucléaire (mines), l'utilisation militaire d'uranium appauvri, la combustion du charbon (relâchement d'uranium dans l'atmosphère) et l'utilisation d'engrais phosphatés qui sont riches en uranium. Le thorium peut lui aussi faire l'objet d'un enrichissement local de la biosphère, principalement causé par le cycle du combustible nucléaire et l'utilisation d'engrais phosphatés (affinité importante pour le thorium également).

Exception faite des faibles quantités de plutonium d'origine naturelle (réacteur naturel d'Oklo au Gabon), le plutonium est exclusivement d'origine humaine. Il est en effet présent en quantité importante dans le cycle du combustible nucléaire (produit dans les réacteurs) mais entre aussi dans la composition des armes nucléaires qui sont responsables du rejet de 3500 kg de Pu dans l'environnement suite aux tests atmosphériques.

Ces programmes d'armes nucléaires, qui ont fait l'objet de plus de 2400 tests dans le monde depuis 1945, ont conduit au rejet dans l'environnement d'actinides artificiels. Ces nombreuses explosions sont responsables du relâchement dans l'atmosphère et la géosphère d'environ 13 PBq de $^{239,240}\text{Pu}$ et de 3,1 PBq d' ^{241}Am (24, 25). Les autres facteurs humains qui peuvent causer la présence de Pu dans l'environnement sont les rejets dans les effluents des usines de retraitement du combustible (La Hague) ou bien les rejets accidentels : accidents de Tchernobyl (Rejet dans l'atmosphère de plusieurs kilogrammes de Pu ainsi qu'un nombre très important d'autres radionucléides: plusieurs exabecquerel de césium 137, Iode 131 et césium 134(26, 27)) et de Fukushima (faible quantité de Pu rejetée comparé aux énormes quantités de césium, d'iode ou de xénon radioactifs(28)).

Le neptunium 237 dont l'origine est totalement anthropogène (la famille $4n+1$ du neptunium 237 s'est éteinte à cause de la faible période radioactive des éléments qui la composent) fut lui aussi relâché en grande quantité lors des essais nucléaires atmosphériques (2500 kg, 40 TBq(24)). Les usines de retraitement du combustible comme celle de La Hague participent également au rejet d'une très faible quantité de neptunium dans l'environnement.

1.3 Transfert des actinides de l'environnement à la biosphère

a) Mobilité des actinides dans l'eau et les sols

En cas de contamination du sol, que ce soit suite à un accident nucléaire, à une fuite d'actinide d'un site de stockage profond ou encore du relâchement d'uranium, par exemple, de roches sédimentaire par érosion(29, 30), il est essentiel de connaître le devenir de ces éléments une fois relâchés dans la géosphère. Les cours d'eau sont le moyen le plus rapide et efficace de transport pour les particules dispersées et donc celui à prendre en compte le plus sérieusement car il augmente la probabilité de

transfert des actinides aux plantes ou autres êtres vivants. La spéciation des éléments dépend bien entendu de l'environnement dans lequel ils sont situés et par conséquent du pH, des propriétés redox et de la composition du sol ou de l'eau. Les actinides forment des complexes particulièrement forts avec certaines substances organiques présentes en grande quantité dans l'eau : les acides humiques(30-36). Les actinides se sorbent à la surface de ces substances colloïdales(37), qui peuvent être présentes à des concentrations parfois supérieures à 100 mg/L dans les eaux souterraines, et sont ainsi transportés sur de grandes distances. Le degré d'oxydation du métal est également de grande importance, en effet, les actinides trivalents (Am^{3+} , Cm^{3+}) et tétravalents (Pu^{4+}) se complexent très facilement aux acides humiques malgré leur propension à s'hydrolyser. En revanche, il a été montré que le neptunium, naturellement au degré d'oxydation +V, ne se complexait que très faiblement aux substances humiques et qu'il subit une réduction en Np(IV) avant d'être complexé(32, 38). L'uranium qui se présente sous forme UO_2^{2+} est lui capable de se complexer avec les substances humiques aussi fortement que les actinides trivalents(34, 39).

La présence de systèmes biologiques dans les sols, comme les bactéries, peut également contribuer au transport des actinides dans l'environnement. Les actinides peuvent interagir avec les structures cellulaires et extracellulaires des bactéries, ce qui va alors altérer leur métabolisme cellulaire. Les acides organiques qui sont produits par les cellules favorisent la solubilité de métaux (originellement sous forme de solide ou colloïde) et augmentent ainsi leur mobilité dans l'environnement ou leur transfert dans les cellules. L'analyse des retombées de l'explosion nucléaire de Nagasaki a montré que l'action des micro-organismes sur le plutonium initialement déposé sous forme d'oxyde thermovitrifié hautement insoluble avait permis au métal d'être incorporé dans des complexes organiques mobiles(40).

La complexation de ces actinides et surtout leur déplacement peut les amener à se déposer et se reconcentrer dans des zones agricoles ou de pâturages, ce qui pourrait causer la contamination de la chaîne alimentaire.

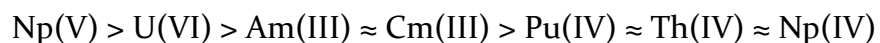
b) Transfert sol-plante

Le transfert des actinides du sol aux plantes dépend de nombreux facteurs tels que la nature du polluant, la composition du sol et la physiologie de la plante concernée. Un facteur de transfert est défini pour déterminer la quantité de métal toxique absorbée par la plante. Il correspond au rapport entre la concentration en polluant présent dans la plante ou une partie de la plante et la concentration de ce même polluant dans le sol. Le facteur de transfert varie en fonction du polluant, de la composition du sol (pH, quantité de matière organique, composition minéralogique), de la plante et même de la saison. Les deux voies de contamination des plantes par les actinides sont :

- leur disponibilité physiologique et leur absorption par les racines des plantes, suivie par une redistribution dans les différentes parties de la plante,
- la déposition de particules sur la surface du feuillage suivi ou non d'une absorption dans les tissus des végétaux.

L'uranium présent de manière naturelle dans le sol est donc absorbé de manière variable selon sa disponibilité et la nature des plantes. Il est ainsi présent naturellement en petite quantité dans une grande partie des aliments consommés aussi bien par les animaux que par l'homme (quantité journalière ingérée : 1-5 μg (41, 42)).

Pour les actinides artificiels, plusieurs études de contamination ont été menées (soit sur le site d'accidents nucléaires soit *via* des études en laboratoire avec contamination volontaire) et ont montré que la biodisponibilité des actinides serait la suivante(43-45) :



Le comportement du neptunium(V) semble donc différer de celui des autres actinides dans le sens où il est plus mobile dans l'environnement et par conséquent est plus facilement absorbé par les plantes. Il a par exemple été reporté que pour des conditions identiques, les plantes pouvaient absorber jusqu'à 1000 fois plus de neptunium que de plutonium(46).

Comme énoncé précédemment, la composition du sol peut changer la disponibilité des actinides envers les plantes d'un ordre de grandeur(44, 46), par

exemple, la présence d'un agent chélatant comme le DTPA peut accroître l'absorption de Pu et d'Am(47, 48).

Sur la base des études menées en laboratoire, il a été constaté que la concentration en actinide était la plus élevée dans les racines des plantes contaminées. La distribution dans les différentes parties de la plante suit généralement la règle suivante(48-50) :

racines > feuilles ≈ tiges > graines ≈ fruits

La nature des plantes impliquées joue cependant un rôle déterminant, et pour certaines espèces le transfert des actinides jusqu'aux fruits est important(51-53).

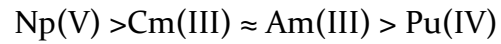
Bien qu'une contamination *via* le sol et donc les racines des plantes soit observée de manière significative, la contamination du feuillage des plantes par des particules contaminées (terre, retombées radioactives...) est le mécanisme de transport prédominant. En effet des études menées dans le désert du Nouveau-Mexique aux USA (Trinity Test Site) ont montré que des éclaboussures causées par la pluie étaient responsables de la quasi-totalité du plutonium détectée sur la végétation du site(44). Ainsi, bien que l'absorption de plutonium par l'intermédiaire des feuilles de la plante ait été démontrée(54), jusqu'à cinquante pourcent du plutonium peut être éliminé simplement en lavant les végétaux(55).

c) Contamination animale

Comme vu dans le paragraphe précédent, les actinides ont la possibilité d'être absorbés par les plantes et par conséquent de faire leur entrée, par leur intermédiaire, dans la chaîne alimentaire. Ainsi, ces métaux toxiques sont susceptibles de se retrouver aussi bien dans la viande que les produits laitiers que nous consommons.

Bien que les plantes ingérées par les ruminants puissent absorber des actinides, dans les cas où le taux de transfert sol-plante est faible, c'est l'ingestion de terre par ces animaux (soit par l'intermédiaire des dépôts présents sur les feuilles soit *via* la terre collée aux racines) qui constitue le principal facteur de contamination pour ces derniers(56, 57).

L'absorption et la disponibilité des actinides dans les intestins suivent(44, 58, 59) :



Ici encore le neptunium est l'élément le plus disponible. Cependant ce classement est soumis à changement en fonction des facteurs environnementaux, par exemple le Pu(IV) complexé à des tissus végétaux ou biologiques devient plus disponible pour l'absorption intestinale que le Pu(IV) non complexé(60, 61).

2. Études physiologiques

Cette thèse portant principalement sur les effets du neptunium et de l'uranium, les autres actinides (Pu, Th, Cm, Am) ne seront évoqués que brièvement dans les paragraphes qui suivent.

2.1. Degré d'oxydation des actinides en milieu physiologique

Les réactions chimiques des actinides dans l'environnement chaud (37°C), quasiment neutre (pH 7.4) des fluides corporeux du corps des mammifères sont dominées par l'hydrolyse et la complexation(62).

L'uranium hexavalent (ion uranyle, UO_2^{2+}) est la forme la plus stable de l'uranium aussi bien en solution qu'en conditions *in vivo*. Il est donc transporté et fixé dans l'organisme sous la forme d'un dioxy cation. L'uranyle est susceptible de s'hydrolyser à très bas pH (selon la concentration à laquelle il est présent)(63).

Le neptunium est lui aussi le plus stable en solution physiologique sous la forme d'un dioxy cation (neptunyle NpO_2^+). Le Np(VI) qui pourrait se former (NpO_2^{2+}) est facilement réduit en Np(V). Le Np(V) peut également se dismuter en Np(IV) et Np (VI) quand des conditions de forte acidité et de concentration élevée se présentent(64). Le neptunium est donc potentiellement présent sous forme de Np(IV) (capable de former des complexes forts) et de neptunyle (moins complexant mais avec une mobilité très élevée (voir 1.3)). Le Np(V) peut également exister sous forme de complexes carbonatés qui sont connus pour stabiliser NpO_2^+ (62).

Le plutonium et le thorium sont tous les deux présents au degré d'oxydation +IV *in vivo*. La présence de ligands stabilisant le plutonium sous cette forme explique ce résultat(62). A noter qu'ils sont tous deux très sensibles à l'hydrolyse.

Le curium et l'américium sont eux présents au degré d'oxydation +III en cas de contamination. Cette forme est la plus stable en solution pour ces éléments(62).

2.2. Organes cibles des actinides chez les mammifères

La contamination des tissus humains ou animaux a de grandes chances de se produire par absorption de particules inhalées qui se seraient déposées dans les poumons mais aussi par une ingestion de nourriture ou d'eau contaminée. Deux autres modes de contamination moins probables se font par l'intermédiaire d'une pénétration cutanée ou par la contamination d'une blessure ouverte. Une fois solubilisés et transportés dans le sang, le mode d'entrée des actinides n'est plus d'aucune importance. Après le passage d'un actinide en solution dans le sang, la compétition entre ligands et parfois le changement local du pH déterminent sa distribution parmi les tissus, favorisant de cette façon les tissus présentant à leur surface les bioligands possédant le pouvoir de complexation le plus élevé. Deux possibilités s'offrent alors aux métaux toxiques : ils peuvent soit être évacués *via* les urines et les fèces, soit se fixer sur les organes cibles pour lesquels ils ont la plus grande affinité. Ces derniers subissent alors la toxicité à la fois chimique et radiologique des actinides.

a) *Transport des actinides dans le sang*

Quel que soit le mode d'entrée dans le corps, les actinides doivent passer dans le sang avant d'atteindre leurs organes cibles. Les métaux peuvent aussi bien former des complexes solubles avec des anions présents dans le sang en quantité importante (carbonate, phosphate, sulfate...) qu'avec des protéines comme la transferrine (protéine responsable du transport du fer dans le sang) et l'albumine (transport de molécules, maintien de la pression osmotique).

Dans le cas de l'uranium par exemple, des études ont montré qu'il formait dans le sang 50% de complexe avec des carbonates ou des citrates, 30% de complexe avec des protéines (Transferrine et Albumine) et 20% de complexe avec les globules rouges(65).

Les actinides sont ensuite rapidement évacués du sang pour aller vers leurs organes cibles (**Figure 3**).

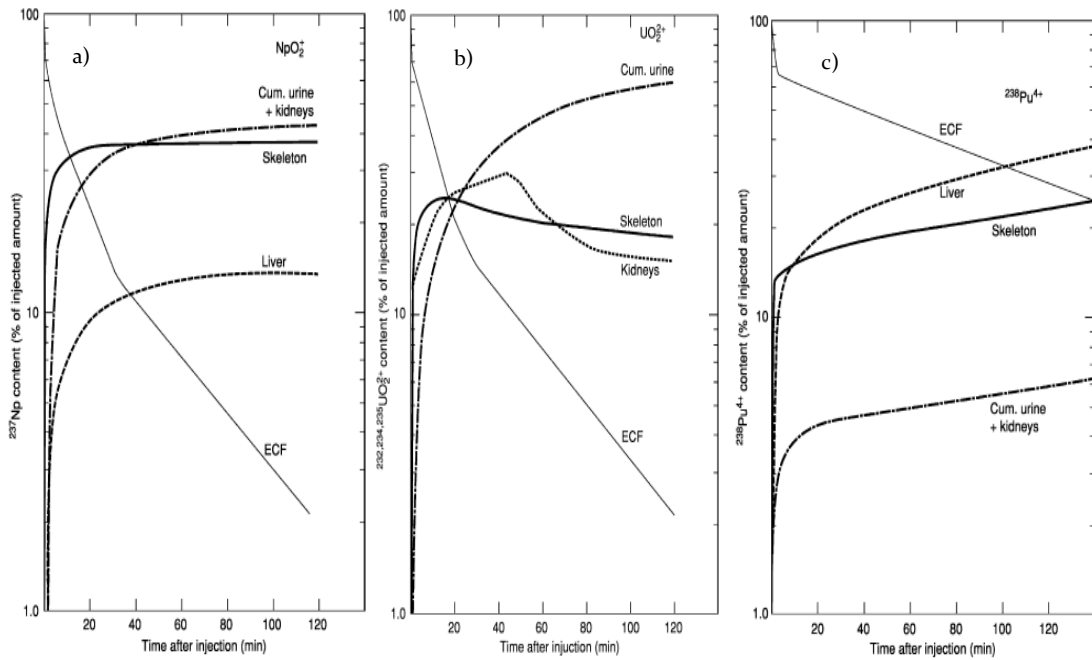


Figure 3 : cinétique d'évacuation des actinides du sang (ECF) et cinétique de fixation sur les organes cibles après injection dans des souris a) uranyle(66), b) neptunyle(67), c) plutonium(IV)(68).

L'uranyle et le neptunyle ont un comportement similaire dans le sang et sont évacués rapidement bien que leur destination soit différente. Pour le neptunyle, il a été constaté qu'une faible portion du métal injecté ne sortait pas aussi rapidement que le reste mais avait un comportement similaire au Pu(IV), qui lui, reste dans les fluides extra cellulaires pendant une période bien plus longue (**Figure 3c**). Cette portion varie en fonction des espèces étudiées (de 0,5% chez la souris à 5,5% chez le rat)(62). Ce changement de comportement suggère une réduction d'une petite partie du neptunyle en Np(IV), qui se lie ensuite fortement aux protéines présentes dans le sérum. Comme énoncé précédemment, le plutonium (Pu^{4+}) reste beaucoup plus longtemps dans le système sanguin, ce qui est dû aux complexes très stables qu'il forme avec les protéines (en particulier la transferrine)(69), l'empêchant ainsi d'avoir un échange rapide avec les tissus des organes (il faut plus d'un jour pour que la totalité du Pu soit évacué du sang quel que soit le modèle animal choisi).

b) Organes cibles

Le squelette et le foie sont des sites de dépôt majeur pour tous les actinides excepté l'uranium pour qui les reins et le squelette sont les cibles privilégiées (**Tableau 1**). Dans le cas d'une inhalation de substances toxiques, la fraction non soluble restera

fixée dans les poumons tandis que les particules non transférables seront évacuées par les fèces en cas de contamination par ingestion.

La fraction d'uranium qui se dissout, soit après une ingestion soit après une inhalation, est transférée dans le sang. L'uranium se retrouve alors principalement sous forme d'uranyle. Il est ensuite distribué dans les organes cibles (squelette et reins) via le système sanguin et est excrété dans l'urine. Dans toutes les études menées, il a été constaté la présence d'une blessure au niveau des reins typique de la présence d' UO_2^{2+} (70, 71). Plusieurs études menées sur des animaux différents (rats, souris, babouins) montrent les mêmes tendances : préférence de l'uranium pour le squelette (5-15% de la quantité injectée) et les reins (10-20%) (62). Le reste de la quantité injectée est excrétée dans l'urine, les autres organes ne sont que peu affectés (< 1%). L'uranium initialement déposé dans les reins passe dans l'urine avec une période de sept jours jusqu'à une élimination quasi complète du dépôt original (62, 72). La grande majorité de l'uranium retenu dans le corps pour une longue période se situe donc dans le squelette.

Contrairement à l'uranium, le neptunyle injecté dans l'organisme des différents sujets préfère se lier au squelette qui est le site de déposition principal. En effet, en moyenne 40% du neptunyle injecté se retrouve fixé sur les os. Le foie est le deuxième organe le plus ciblé avec 10% du total, puis les reins avec seulement 2% (18, 62, 72). La majorité du neptunyle restant (≈ 40%) est évacuée par l'urine. Le reste des autres organes ne sont que peu touchés par les dépôts de neptunium. Ni l'espèce animale étudiée, ni le degré d'oxydation du neptunium injecté (+V ou +VI) ne change fondamentalement la distribution observée ; le squelette reste la cible principale. La différence de comportement entre le neptunium et l'uranium suggère une réduction partielle du Np(V) en Np(IV) lors de la fixation sur les organes. Cependant, malgré une quantité fixée beaucoup plus faible, la déposition du neptunium dans les reins montre des blessures de même nature que celles causées par l'uranyle, suggérant que le neptunium se trouve sous forme de neptunyle dans ces dépôts (14, 62). Le degré d'oxydation du neptunium excrété dans les urines est +V.

Métal	Masse ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Squelette	Foie	Reins	Autres tissus	Urine	Fèces
Am^{3+} (a)	0.23	27	50	1	6	14	3
Th^{4+} (b)	$2 \cdot 10^{-4}$	66	4	3	10	9	7
Pu^{4+} (a)	0.09	31	50	2	8	4	5
Np^{4+} (b)	$3 \cdot 10^{-6}$	56	4	1	1	24	14
NpO_2^+ (a)	200	37	14	2	6	39	2
UO_2^{2+} (a)	100	17	1	19	3	58	2

Tableau 1 : Distribution d'actinides injectés par intraveineuse dans des souris (a) et rats (b)(62).

Les actinides trivalents tels que l'Am(III) (**Tableau 1**) se déposent principalement dans le foie et le squelette. Les proportions relatives sont variables et semblent être dépendantes de la taille de l'ion : plus le rayon ionique est faible, plus la quantité déposée sur le squelette du rat est importante.

Le thorium présent en milieu physiologique sous son degré d'oxydation +IV se fixe essentiellement sur le squelette et peu sur le foie, les autres organes regroupent une part substantielle de la quantité injectée (de 13 à 18% selon les espèces). Seulement 10% du thorium est évacué *via* l'urine.

En moyenne, le squelette et le foie rassemblent environ 85% du plutonium fixé. Cependant, contrairement aux autres métaux, la distribution peut varier selon l'espèce animale étudiée (et même son âge)(73). En effet, dans le rat et le chien la distribution du Pu(IV) ressemble de près aux actinides trivalents lourds (Bk^{3+} , Cf^{3+}), avec une majorité du plutonium fixé sur le squelette et une proportion moindre sur le foie, tandis que pour les souris, les singes et l'homme son comportement est similaire à celui de l'américium avec le foie comme organe cible prioritaire (**Tableau 1**).

3. Complexation des actinides en milieu physiologique

Nous nous intéresserons ici principalement au neptunyle et à l'uranyle, ces deux ions faisant l'objet des études réalisées pendant cette thèse.

Comme évoqué précédemment, l'uranyle et le neptunyle sont présents en milieu physiologique au degré d'oxydation +VI et +V respectivement. À ces degrés d'oxydations là, ils sont sous la forme de dioxo-cations et possèdent donc une structure particulière en bâtonnet due à la présence de deux oxygènes axiaux. La complexation par des ligands est donc possible seulement dans le plan équatorial. L'uranyle est connu pour former des complexes avec un grand nombre de ligands présents dans le corps, majoritairement ceux possédant des fonctions comportant des oxygènes(74, 75). Les fonctions carboxylates étant présentes en très grand nombre dans les protéines et dans les acides aminés les composant, il n'est donc pas surprenant d'observer une affinité importante de ces molécules pour l'uranyle.

Peu d'informations sont disponibles sur le neptunyle ; il a cependant été reporté qu'il possède une grande affinité pour les ions carbonates(62, 76) ainsi que pour les ions acétates (77), montrant également une affinité certaine du neptunyle pour les fonctions chimiques oxygénées.

L'ion carbonate sert aussi d'ion synergique pour la complexation de l'uranium à certaines protéines comme la transferrine (78).

3.1. Complexation des actinyles par les acides aminés

Les actinyles, comme vu précédemment, semblent avoir une affinité particulière pour les fonctions portant des oxygènes. A partir de cette observation, il semble naturel qu'ils puissent former des complexes avec les acides aminés (constituants des protéines), spécialement ceux possédant des fonctions carboxylates (acide glutamique, acide aspartique, proline et glycine). Bien que de nombreuses études d'affinité entre l'uranyle et les acides aminés aient été réalisées(79-81), sur les vingt acides aminés qui existent, seulement deux formant des complexes avec l'uranyle ont fait l'objet d'une

étude par rayons X pour déterminer leur structure(74, 82, 83). Trois exemples, utilisant la glycine et la proline, sont donnés ici :

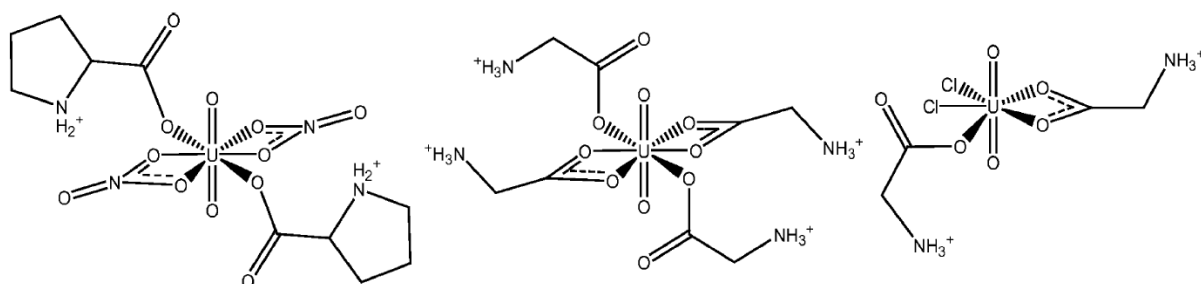


Figure 4 : Représentation à gauche du complexe uranyle-proline, et, au centre et à droite du complexe uranyle-glycine d'après Van Horn et al.(74)

Le complexe entre l'uranyle et la proline montre ici une coordination monodentate de la part des carboxylates, des nitrates complétant la sphère de coordination. Pour les complexes uranyle-glycine, les carboxylates existent à la fois en mode de coordination monodentate et bidentate. L'uranyle peut former des complexes avec six ligands dans sa sphère de coordination (en plus des deux oxygènes axiaux), même si généralement la structure à cinq ligands est plus stable en solution.

La **Figure 5** montre ici un exemple de complexation entre des acides aminés et l'uranyle ainsi que les distances entre le centre métallique et les différents atomes de la sphère de coordination. Selon le mode de coordination des fonctions carboxylates (monodentate ou bidentate), et selon la composition de la sphère de coordination, les distances uranium-oxygène sont amenées à changer(75).

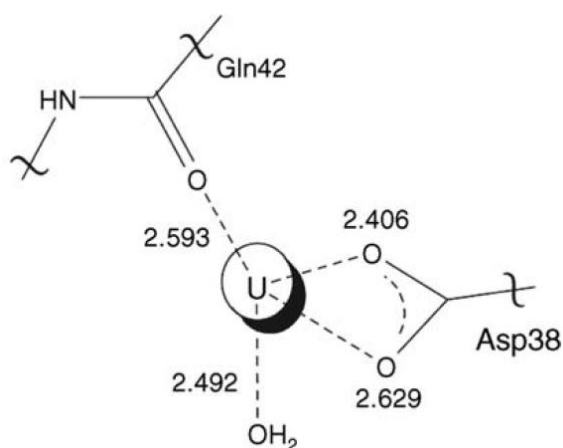


Figure 5 : Coordination de l'uranyle avec des acides aminés(74)

On trouve encore moins de structure du neptunyle dans la littérature. Un modèle a néanmoins été reporté décrivant la complexation du Np(V) par l'imidazole (Im) qui est un constituant de l'histidine (acide aminé composé d'un carboxylate et d'un cycle azoté capable de se lier au neptunyle)(84, 85).

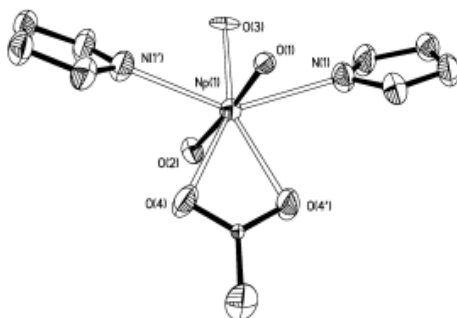


Figure 6 : Structure cristalline de $[NpO_2(CH_3COO)(Im)_2(H_2O)]$ d'après Andreev et al. (84)

Sur la **Figure 6**, le neptunyle est coordonné par cinq atomes (en dehors des deux oxygènes axiaux), deux azotes venant d'hétérocycles et trois oxygènes (un carboxylate bidentate et une molécule d'eau). Comme pour l'uranyle, les ligands ne peuvent être présents que dans le plan équatorial et la coordinance du neptunyle est de cinq en solution.

3.2. Interaction actinides/protéines

L'uranyle se lie préférentiellement à des ligands oxygénés tel que les carboxylates ou les hydroxyles(74). Parmi les biomolécules susceptibles de s'associer avec l'uranyle, les protéines présentent un intérêt majeur par le rôle prépondérant qu'elles jouent dans le transport, la distribution et la rétention des métaux. L'uranyle est ainsi connu pour former des complexes avec un grand nombre de protéines(74, 86), et les complexes formés avec la transferrine ou l'albumine ont été largement étudiés(87, 88). L'uranyle entre en compétition avec les métaux occupant normalement les sites de complexation ; il est ainsi capable de remplacer le calcium dans l'albumine (protéine la plus abondante dans le sérum). La transferrine (Tf), qui est la protéine responsable du transport du fer dans le corps, possède aussi une affinité élevée pour l'uranyle ($\log K = 16$) qui est capable d'occuper les sites de complexation

destinés au fer(89). Comme évoqué précédemment avec le modèle des acides aminés, la complexation de l'uranyle ne peut se faire que dans le plan équatorial. La sphère de coordination de l'uranyle lorsque complexé par la Tf serait constituée de deux résidus tyrosine et d'au moins un oxygène venant d'une fonction carboxylate.

Bien que prépondérant pour le transport de l'uranyle dans le corps humain(62), la transferrine n'est pas responsable de l'internalisation de cet actinide dans les cellules. En effet, le changement de conformation observé lors de la complexation du fer par la transferrine n'est pas observé lors de la complexation de l'uranyle. La protéine ne peut alors pas interagir avec son récepteur, par conséquent l'uranyle ne peut être transféré dans les cellules par cette voie(90, 91).

Le neptunyle a fait l'objet de peu d'études, mais encore une fois c'est la transferrine qui fut la protéine de référence. L'interaction entre le neptunyle et la transferrine fut étudiée *in vitro* dans des conditions proches des conditions physiologiques(92). Il ressort de cette étude que le neptunyle ne se lie que faiblement à la protéine ($\log K = 4$) et que les carbonates (anion synergique qui augmente la complexation des métaux à la protéine), au lieu d'augmenter le pouvoir complexant de la transferrine, agissent comme des compétiteurs(92). Ces travaux suggèrent que le Np(V) ne se lie qu'en faible quantité à la transferrine après son entrée dans le sang mais est transporté sous forme de $\text{NpO}_2\text{CO}_3^-$ tandis que le Np(IV) peut lui former des complexes très stables avec les protéines du sérum.

4. Mécanismes d'entrée des métaux exogènes dans les cellules

4.1. Les cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes sont présentes dans toutes les plantes et tous les animaux. Contrairement aux cellules procaryotes, elles possèdent un noyau qui héberge l'ADN.

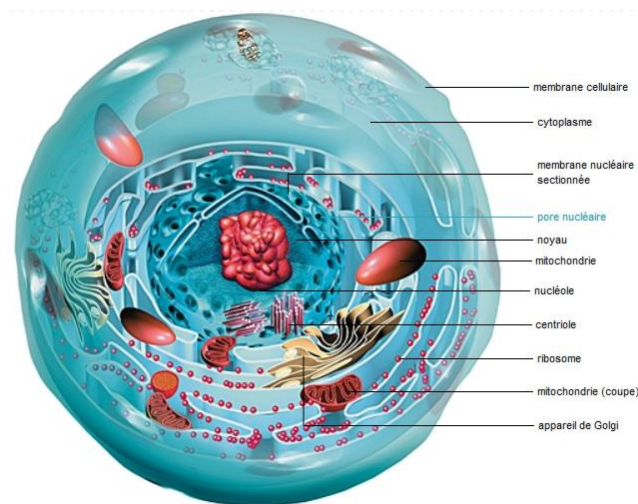


Figure 7 : Vue en coupe d'une cellule animale eucaryote (Dictionnaire Larousse)

Les compartiments intracellulaires sont délimités par des membranes. Ces compartiments abritent notamment les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou des vésicules comme les lysosomes (**Figure 7**). Toutes ces structures sont autant de sites de séquestration potentiels pour les métaux toxiques une fois entrés dans la cellule.

4.2. Voies d'entrée des contaminants dans la cellule

En l'absence de protéine, toute molécule liposoluble diffuse à travers une membrane cellulaire (double couche lipidique) dans le sens de son gradient de concentration : c'est le transport passif. Toutes les molécules ou ions ne peuvent cependant pas passer cet obstacle grâce à la simple diffusion. C'est pourquoi les membranes cellulaires sont agrémentées de protéines surfaciques qui permettent la régulation des entrées et sorties des molécules (**Figure 8**).

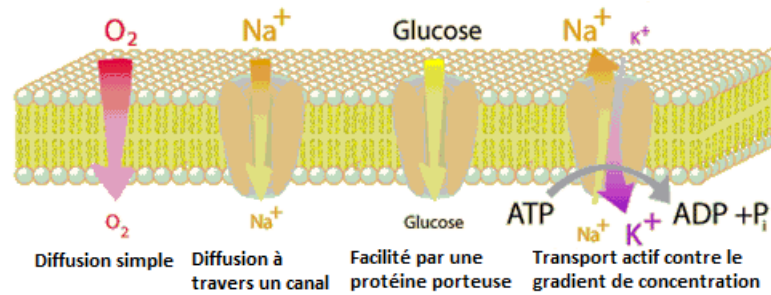


Figure 8 : Modes d'entrée dans une cellule

Les deux principales voies d'entrée des molécules dans une cellule sont :

- Les protéines porteuses se lient au soluté qui doit être transporté, avant de subir un changement de conformation lui permettant de faire traverser la membrane à des molécules ou des ions spécifiques. Ex : Sidérophores (Fer) qui a une grande affinité pour le Pu^{4+} .
- Les canaux ioniques n'ont pas besoin de fixer le soluté. Ils forment des pores hydrophiles étroits permettant le mouvement passif de petits ions inorganiques à travers la double couche lipidique. Ce processus moins sélectif que le précédent est le plus susceptible d'être mis en jeu lors de l'internalisation de contaminants par la cellule.

Ces deux modes de transport sont passifs, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas d'apport en énergie. En revanche, lorsqu'il est nécessaire de s'opposer au gradient de concentration, un mécanisme actif, mettant en jeu certaines protéines de transport couplées à une source d'énergie, existe.

Peu d'information sont disponibles sur la voie d'entrée des actinides dans le corps humain. Cependant vu la grande affinité de ces métaux pour les métalloprotéines, il semblerait que les protéines porteuses soient le mécanisme privilégié. Le plutonium, par exemple, semble utiliser le chemin d'acquisition du fer et entrer dans les cellules en se complexant à la transferrine pour former un complexe mixte Fe-Tf-Pu(93). Comme évoqué précédemment, l'uranyle n'a pas la possibilité d'emprunter cette voie, et bien qu'il ait été observé dans les cellules à maintes reprises, son processus d'internalisation demeure inconnu à ce jour. Néanmoins, tout semble

indiquer que son internalisation par les cellules est principalement gouvernée par ses interactions avec les protéines.

Au contraire, le neptunyle, qui n'interagit que peu avec les molécules du sérum, emprunte vraisemblablement une voie d'internalisation différente.

Les mécanismes d'internalisation de ces métaux demeurant largement inconnus, il n'en demeure pas moins qu'une fois la couche membranaire traversée ils ont la possibilité d'interagir avec la totalité des protéines présentes à l'intérieur des cellules.

La calmoduline (CaM) qui est une protéine ubiquitaire, constituée de 148 acides aminés, est présente dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes. Elle est responsable entre autres de la régulation du calcium dans le corps humain(94-97). Son action indispensable pour la bonne fonction de nombreux processus en fait un sujet de préoccupation majeur en cas de contamination accidentelle par des actinides. Leur présence pourrait en effet perturber un grand nombre de processus essentiels au corps humain. Cependant, très peu d'études structurales ont été menées sur les complexes formés entre la calmoduline et les ions actinyles. De plus, aucune information sur l'effet produit par le complexe CaM-An sur les différents processus enzymatiques dans lesquels la protéine est impliquée n'est disponible.

5. Généralités sur la calmoduline

5.1. Description de la protéine

Le calcium intracellulaire sert de messenger secondaire en réponse à un stimulus extracellulaire. L'augmentation de la concentration cytoplasmique du calcium conduit à la complexation de ce métal par des protéines intracellulaires régulatrices. Une des nombreuses protéines responsables de la régulation du Ca^{2+} est la calmoduline (CaM) qui est une protéine ubiquitaire, multifonctionnelle, qui peut se lier à une large gamme d'enzymes comme la phosphodiesterase, la calcineurine, les calmoduline-kinases(98).

La calmoduline (CaM) est une petite protéine globulaire constituée d'une chaîne peptidique de 148 acides aminés pour une masse totale d'environ 16700 Da. Elle contient une grosse proportion d'aspartate et de glutamate (35%) ce qui en fait une protéine relativement acide. Cette séquence d'acides aminés forme deux domaines similaires possédant chacun deux sites de complexation du calcium. Chaque site de complexation est constitué d'un motif dénommé main-EF (EF-1, EF-2, EF-3 et EF-4 numérotés à partir du domaine N-terminal). Les sites EF-3 et EF-4 du domaine C-terminal, ont une plus grande affinité envers le calcium que les sites EF-1 et EF-2 du domaine N-terminal(99, 100). La complexation du calcium par chaque paire de site est coopérative(94, 96).

La calmoduline se retrouve dans quasiment toutes les cellules eucaryotes(101–103) et peut par conséquent être extraite de plusieurs différents organes et/ou espèces. La séquence d'acides aminés de la CaM a été extraite de plusieurs organismes (du cerveau humain à la tetrahymena (organisme unicellulaire)(101, 104)). La structure primaire s'est remarquablement conservée à travers l'évolution, ce qui suggère que chaque site du calcium et chaque paramètre structural de la protéine sont utiles à ses différentes fonctions, aussi variées soient-elles. Des degrés d'occupation des sites de complexation différents peuvent ainsi traduire une différence quantitative de calcium (concentration) en une réponse cellulaire qualitativement différente (interaction avec des types d'enzymes ou de molécules différents en fonction de la concentration en Ca)(94).

La calmoduline, grâce à ses rôles divers dans le corps humain (activation d'enzyme, pompe à calcium, régulation du calcium...) et à son omniprésence dans les cellules eucaryotes, représente ainsi un sujet d'étude d'un intérêt tout particulier en cas de contamination interne par des éléments radioactifs.

5.2. Structure de la protéine et fonction

a) Site de complexation du calcium

Les quatre sites de complexation du calcium, bien que similaires, présentent quelques différences et par conséquent la capacité de chaque site à complexer le calcium varie. Les constantes de stabilité séquentielles sont les suivantes : $K_1= 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_2= 3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_3= 3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $K_4= 3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (105). Un large excès de calcium est nécessaire pour que les quatre sites de la protéine soient chargés (**Figure 9**).

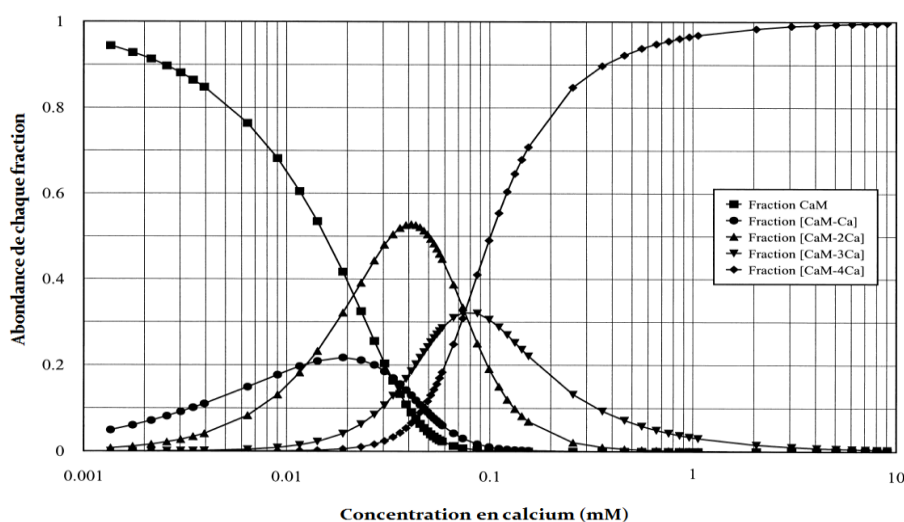


Figure 9 : Fraction de chaque espèce en fonction de la concentration en calmoduline. (Concentration en CaM de $15\mu\text{M}$)(105).

Le calcium est un ion divalent qui forme préférentiellement des liaisons avec des ligands oxygènes donneurs. La géométrie préférentielle de l'ion comporte sept ligands arrangés soit en octaèdre distordu, soit en pentagone bipyramidal. Le motif main-EF est le motif majoritaire pour la complexation du calcium dans les protéines(106). Il est composé de deux hélices α orthogonales qui flanquent un site de complexation flexible qui fournit les résidus participant à la coordination aux positions 1, 3, 5, 7, 9 et 12 (**Figure 10**).

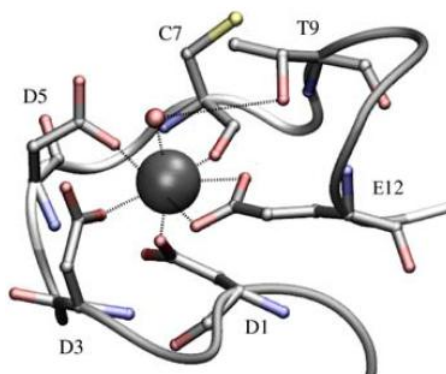


Figure 10 : Schéma du site de complexation du calcium de la calmoduline *Paramaecium tetraurelia*(107)

Dans le site 1 de la CaM (**Figure 10**), la sphère de coordination du calcium est composée de trois aspartates monodentate aux positions 1, 3, 5, un glutamate bidentate à la position 12, un carbonyle venant de la chaîne principale en position 7 et d'une molécule d'eau stabilisée par la thréonine en position 9(108). La composition du site de coordination du calcium (ligands durs et acides) en fait donc un site d'intérêt particulier pour l'étude de la complexation d'autres métaux tels que l'uranyle ou le neptunyle, d'autant plus qu'il a été montré qu'il peut y avoir une compétition entre l'uranyle et le calcium pour l'occupation du site de complexation du calcium de certaines protéines comme l'albumine(88, 87).

b) Modification de la structure

Comme dit précédemment, la CaM a été très stable durant l'évolution et quelle que soit l'espèce choisie pour l'extraction de la protéine, les différences ne sont que minimales aussi bien au niveau de la chaîne d'acides aminés la composant qu'au niveau de la structure tertiaire (forme globale de la protéine). Comme le montre la **Figure 11**, la complexation du calcium par la CaM entraîne un changement de conformation de la protéine qui prend alors une forme d'haltère où les deux domaines (C-terminal et N-terminal) de la protéine sont séparés. D'après les travaux de Zhang et al.(109), la complexation du calcium par la CaM entraîne peu de changements dans la structure secondaire de la protéine. En revanche, la structure tertiaire se trouve grandement modifiée avec des changements conséquents sont observés au niveau des angles inter-hélicoïdaux (jusqu'à 44°) et des distances des hélices des mains-EF (jusqu'à 6.2 Å)(109).

Ces changements sont cependant réversibles lorsque la protéine est déchargée en calcium.



Figure 11 : Structure de l'apo-calmoduline (référence PDB 1CFC) et du complexe calcium calmoduline (référence PDB 3CLN). Le calcium est représenté par les sphères vertes.

La présence de calcium entraîne l'ouverture de la protéine conjuguée à une augmentation de la quantité d'hélices alpha et dévoile une surface hydrophobe située sur la colonne vertébrale de la protéine reliant les deux domaines(109, 110). Ce changement de conformation induit par le calcium permet l'activation de la CaM, qui a la possibilité d'interagir par la suite avec des enzymes, d'autres protéines ou même des agents pharmacologiques(94, 101, 111).

c) Fonctions de la CaM

Le passage de la CaM en conformation active évoqué précédemment permet de révéler une surface hydrophobe lui permettant d'interagir avec les enzymes(98). La concentration, et donc le nombre d'atomes de calcium complexé par la protéine, peut

définir les enzymes avec lesquelles la protéine est susceptible d'interagir. La complexation de quatre atomes de calcium est cependant généralement nécessaire pour l'activation de la majorité des enzymes(101) (**Figure 12**).

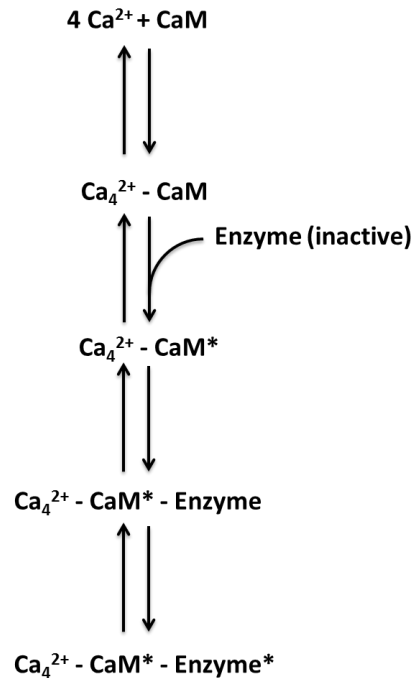


Figure 12 : mécanisme d'activation de la CaM et de l'enzyme cible (*correspond à la molécule en conformation active).

La CaM est impliquée dans un grand nombre de processus enzymatiques essentiels (elle régule plus d'une centaine d'enzymes et de protéines(98)). L'exemple de l'effet de la CaM sur la plasticité et l'activité synaptique est donné par la **Figure 13**. Dans ce cas précis, la CaM, grâce à ses interactions uniques avec une large gamme d'enzyme et de protéine cible (ici protéine kinases ou calcineurine), permet l'activation de plusieurs molécules émettrices de signaux dans les neurones à différentes concentrations de calcium.

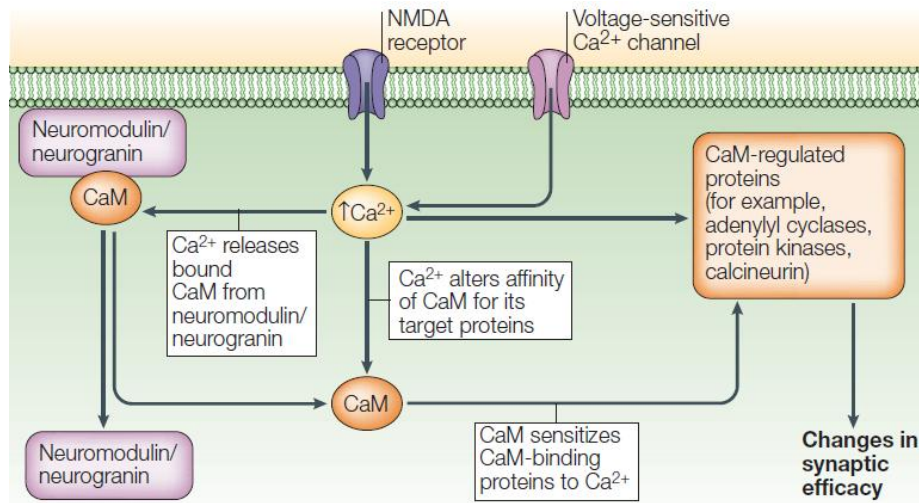


Figure 13 : Effets du calcium et de la calmoduline sur les changements de plasticité synaptique(98)

Il est intéressant de noter que la présence d'enzyme ou de protéine cible peut augmenter l'affinité de la CaM pour le calcium et ainsi permettre l'activation de la protéine puis de l'enzyme à des concentrations moindres en calcium. En effet, des études menées en présence de la troponine, qui est une protéine cible de la CaM, ont montré une affinité de la CaM pour le calcium supérieure d'un ordre de grandeur lorsque la troponine est en solution(98).

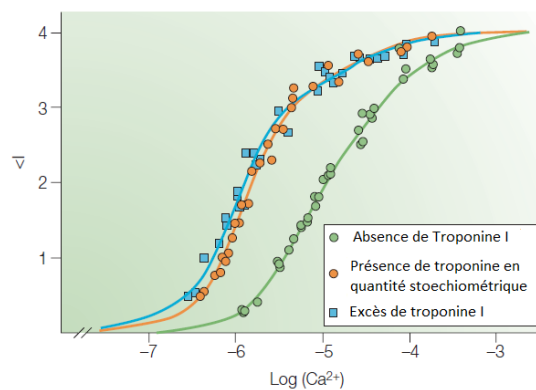


Figure 14 : affinité du calcium pour la CaM en absence et en présence de protéine cible

d) Interaction entre la calmoduline et les actinides

Il n'existe que peu d'informations sur la complexation des actinides par la CaM, cependant, il a été démontré que le Pu(III) est non seulement complexé par la protéine, mais qu'il occupe le site de complexation du calcium et par conséquent peut le remplacer en cas de contamination interne(112). D'autres travaux sur les ions trivalents (tels que les lanthanides qui sont des analogues de l'américium) ont

démontré que ces lanthanides ont une affinité importante et même supérieure à celle du calcium pour la CaM. Le rayon ionique de ces ions est semblable à celui du calcium et une étude menée par Song *et al.*(113) a montré que la complexation de ces lanthanides par la CaM entraînait une activation des enzymes cibles semblable à celle obtenue avec le calcium.

Concernant les actinides étudiés durant cette thèse, aucune donnée relative à l'interaction entre le neptunyle et la CaM n'existe. L'uranyle en revanche a fait l'objet de plusieurs études d'affinité et les résultats obtenus montrent qu'il possède lui aussi une grande affinité pour la CaM ($K_d = 32 \pm 7$ nM(107)). Il est supposé que l'uranyle occupe lui aussi le site du calcium, comme c'est le cas pour d'autres protéines(88, 87), qu'il est donc amené à remplacer en cas de contamination interne.

La calmoduline ayant une affinité naturelle pour l'uranyle, des hybrides avec un site de complexation modifié ont été synthétisés afin d'augmenter l'affinité de la protéine pour l'uranyle. Ces études de bio-ingénierie menées sur la CaM ou d'autres protéines sont souvent réalisées à des fins de décorporation(114, 115), de biosenseurs(116, 117) ou bien de récupération des sources non conventionnelles d'uranium (uranium dans l'eau de mer)(107, 118).

6. Chélation des actinides

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les actinides sont susceptibles de se retrouver dans l'environnement de manière accidentelle ou criminelle (sabotage ou bombe sale). Une contamination interne expose les personnes à la fois à la toxicité chimique et à la toxicité radiologique de ces éléments qui ne jouent aucun rôle dans les réactions biochimiques naturelles, qui ont lieu dans l'organisme, et se déposent dans différents organes cibles (reins, foie, squelette). Il est donc important, pour extraire les actinides, d'avoir les moyens de produire des agents chélatants non toxiques, sûrs, efficaces (de préférence bio-disponibles oralement) et simples à synthétiser.

Très tôt après le début des premières études menées sur les matériaux radioactifs, tels que le plutonium, les risques potentiels que présentent les actinides ont été pris en compte et la recherche de moyens de décorporation efficaces a commencée(119).

6.1. Caractéristiques d'un agent chélatant

Les agents chélatants doivent présenter les caractéristiques suivantes à pH physiologique(120-122) :

- Les ligands doivent être suffisamment déprotonés à pH physiologique pour assurer la complexation des actinides d'intérêts
- Les ligands doivent avoir une grande affinité pour les actinides et une faible affinité pour les autres métaux essentiels présents dans l'organisme (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+})
- L'affinité des ligands pour les actinides doit être supérieure à celle des espèces complexantes qui les fixent sur les organes cibles
- Le site d'action (sang, os, reins) de l'agent chélatant doit être pris en compte car il peut affecter ses propriétés physico chimiques. (Ex : l'uranium, qui a pour organe cible principal les reins, peut être déplacé dans le foie sous forme de complexe uranium-calixarène(123)).

- Des agents chélatants avec une faible toxicité chronique à faibles doses effectives sont nécessaires.
- Possibilité pour ces ligands d'être administrés oralement, la masse moléculaire est un facteur important qui influence la vitesse d'absorption (seuil de coupure compris entre 300 et 500 Da pour l'intestin⁽¹²²⁾)

6.2. Molécules décorporantes actuelles

Le seul agent décorporant autorisé aujourd'hui est le DTPA (**Figure 15**). Synthétisé et breveté pour la première fois en 1954, le H₅-DTPA est un ligand octodentate. Ses constantes de stabilité élevées pour les lanthanides en ont fait un agent potentiel pour le traitement de contamination par des métaux lourds.

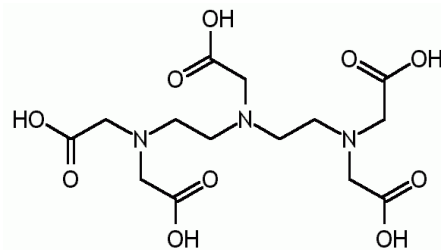


Figure 15 : acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA)

Le DTPA est utilisé sous sa forme ZnNa₃-DTPA ou CaNa₃-DTPA, qui présente une toxicité faible, mais peut cependant se révéler toxique lors d'un usage prolongé (diminution de la quantité de certains métaux essentiels tel que le Zn, Co, Cu et le Mn^(124, 125)). Cette molécule, bien que capable de complexer certains actinides et de favoriser leur excrétion de manière efficace, possède de nombreux défauts. En effet, elle est hydrophile et se distribue seulement dans les fluides extracellulaires ce qui l'empêche de réagir avec les dépôts d'actinides intracellulaires⁽¹²⁴⁾. De plus, malgré sa capacité à complexer les actinides trivalents et le Pu(IV) dans les fluides corporels, sa constante de stabilité avec ceux-ci n'est pas suffisante pour solubiliser et évacuer les hydroxydes et les colloïdes qui peuvent se former à pH physiologique^(126, 127).

Enfin, l'impossibilité de l'administrer oralement s'ajoute au fait que le DTPA n'est pas efficace en tant que décorporant pour évacuer certains actinides tel que le Th(IV), le Np(IV/V) et l'U(VI)^(66, 67).

Afin d'améliorer les performances de la thérapie par chélation, de nouvelles molécules inspirées des sidérophores (molécules naturelles complexant le Fe(III)) ont été développées. Deux nouveaux ligands ont été choisis pour ces études : le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (**Figure 16**).

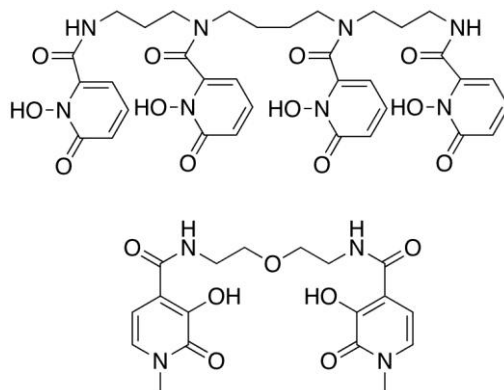


Figure 16 : 3,4,3-LI(1,2-HOPO) (en haut) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (en bas)

Ils possèdent tous les deux les caractéristiques nécessaires énoncées plus haut et, contrairement au DTPA, ils sont capables de complexer une large gamme d'actinides différents(121, 128–131). Leur structure particulière leur permet de complexer facilement les ions actinyles dans le plan équatorial mais également les ions sphériques comme le Pu⁴⁺.

L'affinité de ces ligands pour différents actinides a été étudiée *in vitro*, la constante d'affinité du 5-LIO(Me-3,2-HOPO) pour l'uranyle est très élevée à pH physiologique ($\log K = 14,9 \pm 0,2$) mais reste néanmoins inférieure à celle obtenue en utilisant le ligand 3,4,3-LI(1,2-HOPO) ($\log K = 18,0 \pm 0,4$)(129). Ces ligands ont une affinité encore plus grande pour les actinides sphériques du type Pu(IV), Np(IV) ou Th(IV) ($\log K \approx 40$) ce qui peut s'expliquer par l'absence de contrainte structurale lors de la complexation (pas de gêne causée par la présence d'oxygènes axiaux). Lors d'une expérience réalisée *in vitro* la toxicité des ligands utilisés n'est que peu importante, en revanche lorsque des études *in vivo* sont menées cette donnée est primordiale et peut contraindre à l'éviction d'un ligand très complexant mais qui serait par ailleurs trop toxique pour les sujets traités.

Des études *in vivo* réalisées sur des rats, souris et chiens ont permis de démontrer que la présence de ces agents chélatants augmente de manière significative

l'excrétion des actinides et permet ainsi de réduire l'exposition à la toxicité radiologique aussi bien que chimique des animaux contaminés(62, 121).

Ces deux molécules sont actuellement en phase de test pré-clinique et si elles répondent aux différents critères nécessaires à la mise sur le marché d'un nouveau médicament, elles pourraient à terme remplacer le DTPA.

N'étudiant pas de système *in vivo* dans cette thèse, le terme décorporation ne paraît pas complètement adapté. Néanmoins, ces agents chélatants possédant une affinité très importante pour les actinides d'intérêt, il sera utile d'étudier la réversibilité des effets causés par ces métaux en utilisant de tels ligands.

Références bibliographiques : Chapitre 1

1. WHO, "Health risks of the heavy metals from long-range transboundary air pollution" (World Health Organization, 2007).
2. S. Satarug, S. H. Garrett, M. A. Sens, D. A. Sens, Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Ciênc. Amp Saúde Coletiva*. **16**, 2587–2602 (2011).
3. N. Abdelouahab *et al.*, Ecosystem matters: Fish consumption, mercury intake and exposure among fluvial lake fish-eaters. *Sci. Total Environ.* **407**, 154–164 (2008).
4. M. Wilhelm, B. Heinzow, J. Angerer, C. Schulz, Reassessment of critical lead effects by the German Human Biomonitoring Commission results in suspension of the human biomonitoring values (HBM I and HBM II) for lead in blood of children and adults. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **213**, 265–269 (2010).
5. Lexique du CEA.
6. "Rapport du Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants" (Nations Unies, New York, 2000).
7. M. D. Wrenn, P. W. Durbin, B. Howard, D. L. Willis, Metabolism of ingested uranium and radium. *Health Phys.* **48**, 601–633 (1985).
8. J. Aigueperse, "Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes" (IRSN, Fontenay aux Roses, 2001).
9. R. L. Kathren, R. K. Burklin, Acute Chemical Toxicity of Uranium. *Health Phys.* **94**, 170–179 (2008).
10. J. C. Nenot, *Métabolisme et toxicité du neptunium* (Paris, Editions Masson., 1982), *Toxiques Nucléaires*.
11. T. I. Levdik, V. K. Lemberg, L. A. Buldakov, E. R. Lyubchanskii, V. M. Pesternikov, Biological Effectiveness of ^{237}Np . *Health Phys.* **22**, 643–647 (1972).
12. F. Paquet, H. Métivier, R. Masse, Le neptunium : pourquoi de nouvelles études ? *Radioprotection.* **29**, 387–396 (1994).
13. H. W. Casey, R. O. McClellan, W. J. Clarke, L. K. Bustad, Acute Toxicity of Neptunium-237 and its Relationship to Liver Function in Sheep. *Health Phys.* **9**, 827–834 (1963).
14. D. D. Mahlum, W. J. Clarke, ^{237}Np toxicity in the rat.-I. Histopathologic and chemical observations in liver and kidney. *Health Phys.* **12**, 7–13 (1966).
15. A. Darque, O. Girard de Vasson, G. Bataller, R. Fottorino, Revue des principales caractéristiques du ^{237}Np . *Radioprotection.* **32**, 451–465 (1997).

16. NRC, "Neptunium : radiation protection guidelines" (90, Bethesda, 1988).
17. National Research Council, *Health Risks of Radon and Other Internally Deposited Alpha-Emitters: BEIR IV* (National Academy Press, Washington, D.C., 1990).
18. D. M. Taylor, The biodistribution and toxicity of plutonium, americium and neptunium. *Sci. Total Environ.* **83**, 217–225 (1989).
19. R. A. Bailey, H. M. Clark, J. P. Ferris, S. Krause, R. L. Strong, *Chemistry of the Environment* (Academic Press, 2002).
20. E. Merian, T. W. Clarkson, *Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance* (VCH, 1991).
21. W. Runde, M. P. Neu, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 3475–3593.
22. *Uranium 2003: Resources, Production, and Demand* (Nuclear Energy Agency, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004).
23. I. A. E. A. (IAEA), OECD, *Uranium 2005 Resources, Production and Demand: Resources, Production and Demand* (OECD Publishing, 2006).
24. R. W. Perkins, C. W. Thomas, *Worldwide fallout* (1980).
25. D. A. Atwood, *Radionuclides in the Environment* (John Wiley & Sons, 2013).
26. UNSCEAR, "Exposures and Effects of the Chernobyl Accident. In Sources and Effects of Ionizing Radiation" (2000b, New York, 2000), pp. 453–566.
27. IRSN, "Les accidents dus aux rayonnements ionisants" (2007).
28. IRSN, "Bilan des conséquences de l'accident de Fukushima sur l'environnement au Japon, un an après l'accident" (2012).
29. C. Degueldre, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 3013–3085.
30. G. R. Choppin, Actinide speciation in the environment. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **273**, 695–703 (2007).
31. R. Artinger *et al.*, Humic colloid-borne migration of uranium in sand columns. *J. Contam. Hydrol.* **58**, 1–12 (2002).
32. R. Artinger *et al.*, Humic colloid-borne Np migration: influence of the oxidation state. *Radiochim. Acta Int. J. Chem. Asp. Nucl. Sci. Technol.* **88**, 609 (2000).

33. G. R. Choppin, Humics and Radionuclide Migration. *Radiochim.Acta.***44-45**, 23-28 (1988).
34. V. Moulin, J. Tits, G. Ouzounian, Actinide Speciation in the Presence of Humic Substances in Natural Water Conditions. *Radiochim.Acta.***58-59**, 179-190 (1992).
35. V. Moulin, G. Ouzounian, Role of colloids and humic substances in the transport of radio-elements through the geosphere. *Appl. Geochem.***7**, **Supplement 1**, 179-186 (1992).
36. H. R. von Gunten, P. Beneš, Speciation of Radionuclides in the Environment. *Radiochim.Acta.***69**, 1-30 (1995).
37. J. I. Kim, P. Zeh, B. Delakowitz, Chemical Interactions of Actinide Ions with Groundwater Colloids in Gorleben Aquifer Systems. *Radiochim.Acta.***58-59**, 147-154 (1992).
38. C. Marquardt, G. Herrmann, N. Trautmann, Complexation of Neptunium(V) with Humic Acids at Very Low Metal Concentrations. *Radiochim.Acta.***73**, 119-126 (1996).
39. G. R. Choppin, Actinide speciation in aquatic systems. *Mar. Chem.***99**, 83-92 (2006).
40. Y. Fujikawa, J. Zheng, M. Sugahara, H. Takigami, A. Kudo, Strong association of fallout plutonium with humic and fulvic acid as compared to uranium and ¹³⁷Cs in Nishiyama soils from Nagasaki, Japan. *J. Radioanal. Nucl.Chem.***240**, 69-74 (1999).
41. G. A. Welford, R. Baird, Uranium Levels in Human Diet and Biological Materials. *Health Phys.***13**, 1321-1324 (1967).
42. M. Galletti, L. D'Annibale, V. Pinto, C. Cremisini, Uranium Daily Intake and Urinary Excretion: A Preliminary Study in Italy. *Health Phys.***85**, 228-235 (2003).
43. R. C. Thompson, Neptunium: The Neglected Actinide: A Review of the Biological and Environmental Literature. *Radiat.Res.***90**, 1-32 (1982).
44. R. L. Watters, T. E. Hakonson, L. J. Lane, The Behavior of Actinides in the Environments. *Radiochim.Acta.***32**, 89-104 (1983).
45. E. A. Bondietti, J. R. Trabalka, C. T. Garten, G. G. Killough, in *Radioactive waste in geologic storage* (1979), pp. 241-265.
46. C. T. Garten, C. S. Tucker, T. G. Scott, Plant uptake of neptunium-237 and technetium-99 under field conditions. *J. Environ. Radioact.***4**, 91-99 (1986).
47. D. C. Adriano, A. Wallace, E. M. Romney, in *Transuranic elements in the environment* (1980), pp. 336-360.

48. K. R. Price, A Review of Transuranic Elements in Soils, Plants, and Animals. *J. Environ. Qual.***2**, 62–66 (1973).
49. R. G. Schreckhise, J. F. Cline, Comparative Uptake and Distribution of Plutonium, Americium, Curium and Neptunium in Four Plant Species. *Health Phys.***38**, 817–824.
50. R. K. Schulz, in *Transuranics in natural environments* (1977), pp. 321–330.
51. F. Carini, Radionuclide transfer from soil to fruit. *J. Environ. Radioact.***52**, 237–279 (2001).
52. F. Carini, Radionuclides in plants bearing fruit: an overview. *J. Environ. Radioact.***46**, 77–97 (1999).
53. Z. Ould-Dada, I. Fairlie, C. Read, Transfer of radioactivity to fruit: significant radionuclides and speciation. *J. Environ. Radioact.***52**, 159–174 (2001).
54. D. A. Cataldo, B. E. Vaughan, in *Transuranic elements in the environment* (1980).
55. G. C. White, T. E. Hakonson, A. J. Ahlquist, Factors Affecting Radionuclide Availability to Vegetables Grown at Los Alamos. *J. Environ. Qual.***10**, 294–299 (1981).
56. N. A. Beresford *et al.*, The Importance of Source-Dependent Bioavailability in Determining the Transfer of Ingested Radionuclides to Ruminant-Derived Food Products. *Environ. Sci. Technol.***34**, 4455–4462 (2000).
57. N. A. Beresford, B. J. Howard, The importance of soil adhered to vegetation as a source of radionuclides ingested by grazing animals. *Sci. Total Environ.***107**, 237–254 (1991).
58. R. L. Watters, D. N. Edgington, T. E. Hakonson, W. C. Hanson, M. H. Smith, in *Transuranic elements in the environment* (1980), pp. 1–44.
59. J. D. Harrison, The gastrointestinal absorption of the actinide elements. *Sci. Total Environ.***100**, 43–60 (1991).
60. J. E. Ballou, K. R. Price, R. A. Gies, P. G. Doctor, The Influence of DTPA on the Biological Availability of Transuranics. *Health Phys.***34**, 445–450 (1978).
61. M. F. Sullivan, T. R. Garland, Gastrointestinal absorption of alfalfa-bound plutonium-238 by rats and guinea pigs. *Pac. Northwest Lab. Annu. Rep.* (1977).
62. P. W. Durbin, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 3339–3440.

63. C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation. *Appl. Spectrosc.* **52**, 528–535 (1998).
64. Z. Yoshida, S. G. Johnson, T. Kimura, J. R. Krsul, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 699–812.
65. M. Sutton, S. R. Burastero, Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1468–1480 (2004).
66. P. W. Durbin, B. Kullgren, J. Xu, K. N. Raymond, New Agents for in Vivo Chelation of Uranium(VI): Efficacy and Toxicity in Mice of Multidentate Catecholate and Hydroxypyridinonate Ligands. *Health Phys.* **72**, 865–879 (1997).
67. P. W. Durbin *et al.*, ^{237}Np : Oxidation State in Vivo and Chelation by Multidentate Catecholate and Hydroxypyridinonate Ligands. *Health Phys.* **75**, 34–50 (1998).
68. P. W. Durbin, B. Kullgren, C. T. Schmidt, Circulatory Kinetics of Intravenously Injected $^{238}\text{Pu(IV)}$ Citrate and ^{14}C -CaNa₃-DTPA in Mice: Comparison with Rat, Dog, and Reference Man. *Health Phys.* **72**, 222–235 (1997).
69. D. M. Taylor, The bioinorganic chemistry of actinides in blood. *J. Alloys Compd.* **271–273**, 6–10 (1998).
70. A. Tannenbaum, in *Toxicology of uranium* (New York, McGraw-Hill., 1951), pp. 236–244.
71. C. L. Yuile, in *Uranium, Plutonium, Transplutonic Elements* (Springer-Verlag, New York, 1973), pp. 165–196.
72. P. W. Durbin, B. Kullgren, J. Xu, K. N. Raymond, In Vivo Chelation of Am(III), Pu(IV), Np(V), and U(VI) in Mice by TREN-(Me-3,2-HOPO). *Radiat. Prot. Dosimetry.* **53**, 305–309 (1994).
73. F. W. Bruenger *et al.*, Skeletal Retention and Distribution of ^{226}Ra and ^{239}Pu in Beagles Injected at Ages Ranging from 2 Days to 5 Years. *Health Phys.* **44**, 513–527 (1983).
74. J. D. Van Horn, H. Huang, Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 765–775 (2006).
75. V. Vallet, H. Moll, U. Wahlgren, Z. Szabó, I. Grenthe, Structure and Bonding in Solution of Dioxouranium(VI) Oxalate Complexes: Isomers and Intramolecular Ligand Exchange. *Inorg. Chem.* **42**, 1982–1993 (2003).

76. A. Ikeda-Ohno *et al.*, Neptunium Carbonato Complexes in Aqueous Solution: An Electrochemical, Spectroscopic, and Quantum Chemical Study. *Inorg.Chem.***48**, 11779–11787 (2009).
77. K. Takao, S. Takao, A. C. Scheinost, G. Bernhard, C. Hennig, Complex Formation and Molecular Structure of Neptunyl(VI) and -(V) Acetates. *Inorg.Chem.***48**, 8803–8810 (2009).
78. M. R. Schlabach, G. W. Bates, The synergistic binding of anions and Fe³⁺ by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis. *J. Biol. Chem.***250**, 2182–2188 (1975).
79. V. V. Ramanujam, K. Rengaraj, B. Sivasankar, Studies on Uranyl Complexes. II. Unidentate Carboxylate Coordination in Uranyl Complexes of α -, β -, and γ -Amino Acids: A Polarographic Study. *Bull. Chem. Soc. Jpn.***52**, 2713–2716 (1979).
80. P. V. Selvaraj, M. Santappa, Equilibrium studies of mixed-ligand complexes of uranyl ion with amino acids and carboxylic acids in aqueous solution. *J. Inorg. Nucl.Chem.***39**, 119–122 (1977).
81. M. M. Petit-Ramel, L. Mosoni, Stability and visible absorption of glutamic acid complexes with uranyl and neodymium ions. *Fresenius Z. Für Anal. Chem.***313**, 544–547 (1982).
82. A. D. Keramidias *et al.*, Investigation on uranyl interaction with bioactive ligands. Synthesis and structural studies of the uranyl complexes with glycine and N-(2-mercaptopropionyl)glycine. *Radiochim.Acta.***90**, 549–554 (2002).
83. N. W. Alcock, D. J. Flanders, T. J. Kemp, M. A. Shand, Glycine complexation with uranyl ion: absorptiometric, luminescence, and X-ray structural studies of tetrakis(glycine)dioxouranium(VI) nitrate. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 517–521 (1985).
84. G. B. Andreev, N. A. Budantseva, I. G. Tananaev, B. F. Myasoedov, Interaction of Transuranium Elements with Biologically Important Molecules: Structural and Spectroscopic Study of Np(V) Complexes with Imidazole. *Inorg.Chem.***48**, 1232–1235 (2009).
85. G. Andreev, N. Budantseva, I. Tananaev, B. Myasoedov, Cation–cation interaction in novel Np(V) compound with methylimidazole as a model of histidine side chain. *Inorg. Chem. Commun.***13**, 679–682 (2010).
86. S. Safi *et al.*, Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem. – Eur. J.***19**, 11261–11269 (2013).
87. O. Pible, C. Vidaud, S. Plantevin, J.-L. Pellequer, E. Quéméneur, Predicting the disruption by UO₂²⁺ of a protein-ligand interaction. *Protein Sci.***19**, 2219–2230 (2010).

88. G. Montavon, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, U. Repinc, A. Morgenstern, 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).
89. S. Scapolan, E. Ansorborlo, C. Moulin, C. Madic, Uranium (VI)-Transferrin System Studied by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **79**, 505–508 (1998).
90. C. Vidaud *et al.*, Structural Consequences of Binding of UO₂²⁺ to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry (Mosc.)*.**46**, 2215–2226 (2007).
91. C. Vidaud, D. Bourgeois, D. Meyer, Bone as Target Organ for Metals: The Case of f-Elements. *Chem. Res. Toxicol.***25**, 1161–1175 (2012).
92. R. Racine, P. Moisy, F. Paquet, H. Métivier, C. Madic, In vitro study of the interaction between neptunium ions and apotransferrin by absorption spectrophotometry and ultrafiltration: the case of Np(V). *Radiochim. Acta/International J. Chem. Asp. Nucl.Sci. Technol.***91**, 115–122 (2003).
93. M. P. Jensen *et al.*, An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium. *Nat. Chem. Biol.***7**, 560–565 (2011).
94. C B Klee, T H Crouch, and P. G. Richman, Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.***49**, 489–515 (1980).
95. L. A. Jurado, P. S. Chockalingam, H. W. Jarrett, Apocalmodulin. *Physiol. Rev.***79**, 661–682 (1999).
96. R. J. P. Williams, Calcium and calmodulin. *Cell Calcium*.**13**, 355–362 (1992).
97. C.-L. A. Wang, R. R. Aquaron, P. C. Leavis, J. Gergely, Metal-Binding Properties of Calmodulin. *Eur. J. Biochem.***124**, 7–12 (1982).
98. Z. Xia, D. R. Storm, The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.***6**, 267–276 (2005).
99. M. Ikura *et al.*, Nuclear magnetic resonance studies on calmodulin: calcium-induced conformational change. *Biochemistry (Mosc.)*.**22**, 2573–2579 (1983).
100. R. E. Klevit, D. C. Dalgarno, B. A. Levine, R. J. P. Williams, ¹H-NMR studies of calmodulin. *Eur. J. Biochem.***139**, 109–114 (1984).
101. M. P. Walsh, Review Article Calmodulin and its roles in skeletal muscle function. *Can. Anaesth.Soc. J.***30**, 390–398 (1983).
102. H. Tidow *et al.*, A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature*.**491**, 468–472 (2012).

103. W. Y. Cheung, Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*.**207**, 19–27 (1980).
104. T. Yang, B. W. Poovaiah, Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.***8**, 505–512 (2003).
105. O. Nemirovskiy, D. E. Giblin, M. L. Gross, Electrospray ionization mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange for probing the interaction of calmodulin with calcium. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***10**, 711–718 (1999).
106. Y. Ye, H.-W. Lee, W. Yang, S. Shealy, J. J. Yang, Probing Site-Specific Calmodulin Calcium and Lanthanide Affinity by Grafting. *J. Am. Chem. Soc.***127**, 3743–3750 (2005).
107. R. Pardoux *et al.*, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS ONE*.**7**, e41922 (2012).
108. Y. S. Babu *et al.*, Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature*.**315**, 37–40 (1985).
109. M. Zhang, T. Tanaka, M. Ikura, Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat. Struct. Biol.***2**, 758–767 (1995).
110. S. R. Martin, P. M. Bayley, The effects of Ca²⁺ and Cd²⁺ on the secondary and tertiary structure of bovine testis calmodulin. A circular-dichroism study. *Biochem. J.***238**, 485–490 (1986).
111. C. B. Klee, Conformational transition accompanying the binding of calcium(2+) ion to the protein activator of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. *Biochemistry (Mosc.)*.**16**, 1017–1024 (1977).
112. P. A. Seeger *et al.*, Neutron Resonance Scattering Shows Specific Binding of Plutonium to the Calcium-Binding Sites of the Protein Calmodulin and Yields Precise Distance Information. *J. Am. Chem. Soc.***119**, 5118–5125 (1997).
113. Y.-Y. Song *et al.*, Biological effects of rare earth protein complexes: Influence of lanthanide ions Eu³⁺, Tb³⁺ on secondary structure of calmodulins. *Biospectroscopy*.**5**, 371–377 (1999).
114. S. T. Krishnaji, D. L. Kaplan, Bioengineered Chimeric Spider Silk-Uranium Binding Proteins. *Macromol. Biosci.***13**, 256–264 (2013).
115. Y. Bao *et al.*, Efficacy of a novel chelator BPCBG for removing uranium and protecting against uranium-induced renal cell damage in rats and HK-2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***269**, 17–24 (2013).
116. L. L. Clainche, C. Vita, Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide. *Environ. Chem. Lett.***4**, 45–49 (2006).

117. L. L. Clainche, C. Vita, in *Environmental Chemistry* (Springer Berlin Heidelberg, 2005), pp. 133–143.
118. L. Zhou *et al.*, A protein engineered to bind uranyl selectively and with femtomolar affinity. *Nat. Chem.***6**, 236–241 (2014).
119. J. Schubert, Treatment of Plutonium Poisoning by Metal Displacement. *Science***105**, 389–390 (1947).
120. É. Ansoborlo *et al.*, Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chim.***10**, 1010–1019 (2007).
121. A. E. V. Gorden, J. Xu, K. N. Raymond, P. Durbin, Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides. *Chem. Rev.***103**, 4207–4282 (2003).
122. R. C. Hider, Design of therapeutic chelating agents. *Biochem.Soc. Trans.***30**, 751–755 (2002).
123. M. H. Henge-Napoli, G. N. Stradling, D. M. Taylor, Decorporation of Radionuclides from the Human Body. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **87**, 9–10 (2000).
124. V. Volf, in *Technical reports series IAEA* (Vienna, 1978).
125. O. P. Pachauri, J. P. Tandon, Mixed ligand derivatives of 1:1 Th(IV) - DTPA chelate with some hydroxy acids(I). *J. Inorg. Nucl.Chem.***37**, 2321–2323 (1975).
126. M. W. Rosenthal, A. Lindenbaum, Influence of DTPA Therapy on Long-Term Effects of Retained Monomeric Plutonium: Comparison with Polymeric Plutonium. *Radiat.Res.***31**, 506–521 (1967).
127. V. H. Smith, Therapeutic Removal of Internally Deposited Transuranium Elements. *Health Phys.***22**, 765–778 (1972).
128. A. E. V. Gorden *et al.*, Sequestered Plutonium: [PuIV{5LIO(Me-3,2-HOPO)}₂]—The First Structurally Characterized Plutonium Hydroxypyridonate Complex. *Chem. – Eur. J.***11**, 2842–2848 (2005).
129. M. Sturzbecher-Hoehne, G. J.-P. Deblonde, R. J. Abergel, Solution thermodynamic evaluation of hydroxypyridinonate chelators 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2-HOPO) for UO₂(VI) and Th(IV) decorporation. *Radiochim.Acta Int. J. Chem. Asp.Nucl.Sci. Technol.***101**, 359–366 (2013).
130. G. J.-P. Deblonde, M. Sturzbecher-Hoehne, R. J. Abergel, Solution Thermodynamic Stability of Complexes Formed with the Octadentate Hydroxypyridinonate Ligand 3,4,3-LI(1,2-HOPO): A Critical Feature for Efficient Chelation of Lanthanide(IV) and Actinide(IV) Ions. *Inorg.Chem.***52**, 8805–8811 (2013).

131. F. Paquet, V. Chazel, P. Houpert, R. Guilmette, B. Muggenburg, Efficacy of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) for decorporation of Pu,Am and U from rats injected intramuscularly with high-fired particles of MOX. *Radiat. Prot. Dosimetry*. **105**, 521-525 (2003).

Chapitre 2 : Interaction actinides- calmoduline et structure des complexes

Chapitre 2

1. Interaction entre les ions actinyles et la calmoduline	79
1.1 Hybride de la CaM	79
1.2 Etude de l'interaction entre la CaM _{WT} et l'uranyle par SLRT	80
a) Effet du pH sur les spectres de fluorescence et les temps de vie associés	80
b) Calcul des constantes de stabilité et des spectres théoriques	84
1.3 Etude de l'interaction entre le neptunyle et la CaM par UV-vis.....	87
2. Site de complexation des actinyles dans la protéine	89
2.1 Modèles optimisés par DFT	89
2.2 Analyse des données EXAFS de l'U ^{VI}	92
2.3 Analyse des données EXAFS du Np ^V	98
2.4 Analyse de la densité électronique des modèles	102
2.5 Comparaison de l'énergie de liaison des complexes	104
3. Complexation des actinides trivalents par la CaM	106
4. Conclusion.....	110

Suite à une contamination interne par des actinides, un grand nombre d'organes et de fonctions vitales sont touchés. La plupart des études menées à ce jour portent sur des systèmes *in vivo*, et il n'y a pour le moment que peu d'information sur les aspects microscopiques (site de coordination) des interactions entre les actinides et les molécules biologiques telles que les protéines.

Dans l'optique de cette étude, la calmoduline (CaM), protéine présente dans les cellules eucaryotes et jouant un rôle essentiel dans un grand nombre de processus enzymatiques, est d'un intérêt majeur en cas de contamination. La complexation des actinides par cette protéine pourrait perturber un grand nombre de fonctions indispensables au corps humain. Bien que certaines études analysant l'affinité de la CaM pour des actinides aient déjà été réalisées, en particulier l'uranyle, aucune étude structurale visant à déterminer la constitution de la sphère de coordination du métal dans la protéine n'a encore été conduite.

Dans ce chapitre seront présentées des études de spectroscopie laser résolue en temps (SLRT) et de spectroscopie UV-visible ayant pour objectif de déterminer l'affinité de certains actinides (uranyle et neptunyle) pour la calmoduline. Les travaux d'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure), réalisés sur la ligne de lumière MARS du synchrotron SOLEIL, seront ensuite exposés. Ces expériences réalisées avec des échantillons préparés à différents pH permettront de caractériser l'environnement du métal dans ce système biologique. De plus, l'ajustement des données EXAFS avec des modèles optimisés grâce aux calculs DFT (Density Functional Theory) nous permettra d'identifier les fonctions liées aux deux actinides étudiés.

L'uranium et le neptunium ne sont pas les seuls éléments susceptibles d'être relâchés dans l'environnement en cas d'accident. En effet, des actinides trivalents tels que l'américium sont aussi extrêmement dangereux en cas de contamination. Une étude SLRT de l'euporium, un homologue de l'américium, sera menée afin de déterminer si cet élément peut également interagir avec la calmoduline.

Ces différentes études structurales nous permettront de déterminer si les actinides considérés peuvent remplacer le calcium dans la protéine et ainsi causer une inhibition des propriétés de la CaM qui peuvent être à l'origine de troubles pour l'organisme.

A noter que la quantité limitée de protéine cible disponible nous a amené à réaliser les expériences à des concentrations relativement faibles. De plus la radioactivité des

éléments étudiés (particulièrement le ^{273}Np) et les précautions indispensables à leur utilisation ont constitué un problème supplémentaire à la mise en place des investigations menées.

1. Interaction entre les ions actinyles et la calmoduline

1.1 Hybride de la CaM

La calmoduline possédant quatre sites similaires mais néanmoins pas identiques, les études structurales (SLRT, UV-vis, et à plus forte raison EXAFS) ne peuvent pas être réalisées avec la protéine native. Afin de contourner ce problème, une variante du lobe N-terminal de la CaM a été produite en collaboration avec le laboratoire de Catherine Berthomieu (du laboratoire CEA/IBEB Cadarache).

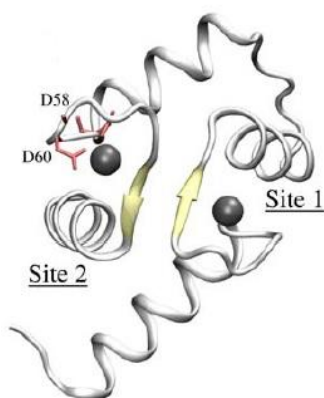


Figure 1 : Schéma du domaine 1 de la calmoduline. Les résidus d'aspartate qui apparaissent en rouge dans le site 2 ont été mutés en alanine.

La variante synthétisée (**Figure 1**) correspond à une séquence de 77 acides aminés dans laquelle les propriétés de complexation du site 2 de la protéine ont été bloquées en procédant à la mutation suivante : Asp58Ala et Asp60Ala (substitution des aspartates situés aux positions 58 et 60 par des alanines). Ce peptide, appelé CaM_{WT}, ne possède ainsi qu'un seul site disponible à la complexation. Les acides aminés interagissant avec l'uranyle ont été identifiés grâce à des études SAR (Structure Affinity Relationship)(1) et il a ainsi pu être observé que les acides aminés complexant l'uranyle étaient similaires à ceux complexant le calcium.

L'utilisation d'un hybride possédant un seul site de complexation permet d'éviter les biais dus aux ajustements des spectres lors de la caractérisation par EXAFS des complexes CaM-An (décrit dans ce chapitre). La variante de la calmoduline utilisée lors de ces études nous permet d'avoir un seul type d'environnement pour l'ion métallique étudié et donc de limiter les erreurs sur les distances métal-ligand obtenues.

1.2 Etude de l'interaction entre la CaM_{WT} et l'uranyle par SLRT

Les procédés de luminescence font référence à la phosphorescence, la fluorescence ou la chimiluminescence. La phosphorescence et la fluorescence se produisent après l'absorption d'un photon par une molécule, un complexe ou un ion.

La fluorescence est particulièrement intéressante pour notre étude à cause de sa sélectivité importante et de sa limite de détection très basse (μM). Les temps de vie du signal de fluorescence sont modifiés en fonction de l'environnement du métal étudié (ici l'uranyle). De plus les temps de vie, bien que sensibles à la température et à la composition de la solution (force ionique, tampon)(2-4), sont généralement spécifiques à une espèce(5, 6). Il est donc possible de suivre la complexation de l'uranium par la protéine et de déterminer sa spéciation en présence de la CaM_{WT}. Le principe détaillé, les spécificités des systèmes étudiés ainsi que les paramètres expérimentaux sont répertoriés en Annexe B. Les temps de vie et les caractéristiques spectrales propres à chaque espèce seront également reportés en Annexe C.

a) Effet du pH sur les spectres de fluorescence et les temps de vie associés

Pour cette étude, les spectres de fluorescence de l'uranyle ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) en présence de CaM_{WT} ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) et d'un tampon MES (5 mM) ont été mesurés sur des échantillons préparés à plusieurs pH différents (pH 3-7). Les concentrations d'uranyle et de protéine sont restées constantes pour tous les échantillons mesurés et le pH de la solution fut la seule variable. Le premier spectre est enregistré à pH 3, le pH est ensuite augmenté progressivement jusqu'à pH 7.

Un spectre de fluorescence et une étude de fluorescence résolue en temps sont enregistrés pour chaque valeur de pH.

Le spectre de fluorescence de l'uranyle est bien connu et possède quatre bandes caractéristiques situées à 488 nm, 509 nm, 534 nm et 560 nm (5) comme le montre la ligne pointillée de la *Figure 2*.

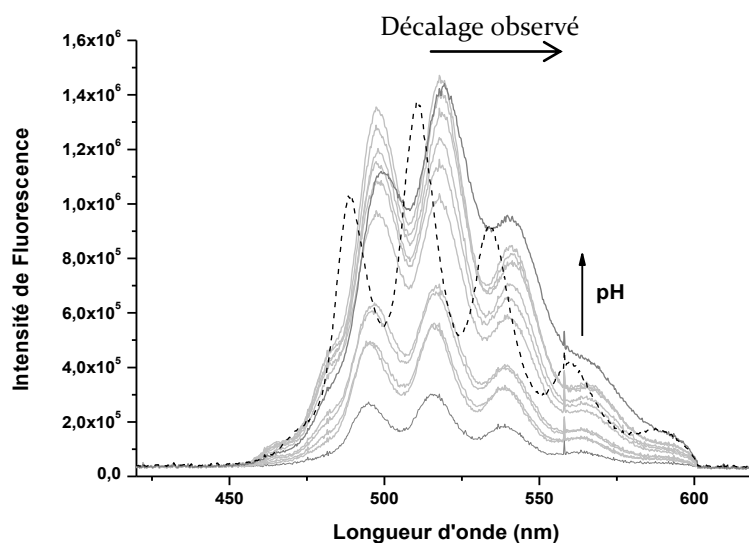


Figure 2: Evolution du spectre de fluorescence de l'uranyle en présence de CaM de pH 3 à pH 7 (lignes grises) comparé au spectre de l'uranyle libre à pH 3 (- -).

Le premier spectre enregistré en présence de CaM_{WT} révèle des changements drastiques du spectre de fluorescence. En effet, on constate une diminution importante de l'intensité de fluorescence mesurée couplée à un déplacement des maximums d'intensité de 5 nm vers les plus hautes longueurs d'ondes (**Figure 2**). Ce déplacement vers les plus hautes longueurs d'ondes suggère que déjà à pH 3 l'uranyle en solution est quasiment totalement complexé par la protéine. On a ensuite procédé à l'augmentation progressive du pH jusqu'à pH 7. On a constaté une augmentation de l'intensité de fluorescence suivant l'augmentation du pH jusqu'à pH 5,6.

Un décalage progressif supplémentaire (3 nm) du spectre a également été observé lors de l'augmentation du pH (entre pH 3 et pH 6,3) ce qui suggère que la quantité d'uranyle lié à la protéine augmente et/ou qu'une nouvelle espèce est formée entre l'uranyle et la CaM. L'augmentation de l'intensité additionnée au décalage supplémentaire observé laisse penser qu'une seconde espèce est formée (second complexe). Cette augmentation d'intensité de la fluorescence peut s'expliquer par un rendement quantique supérieur de la seconde espèce. Le spectre du dernier échantillon, enregistré à pH 7, change drastiquement par rapport aux spectres précédents, un spectre de cette allure indique généralement la présence d'une concentration élevée d'hydroxydes par rapport aux autres espèces en solution ce qui est confirmé par l'étude des temps de vie (**Figure 3**).

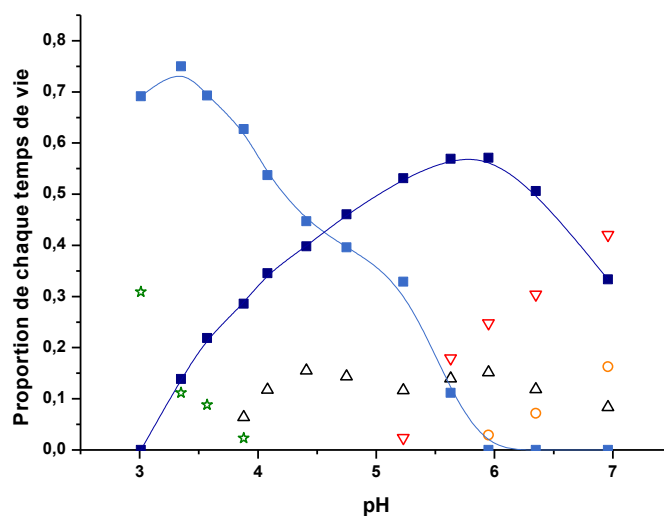


Figure 3 : Evolution de la proportion (rapport des intensités de fluorescence relatives à chaque temps de vie) de chaque temps de vie en fonction du pH. 24μs (Δ), 4μs (■), 2μs (☆), 0,4μs (■), 1μs (▽), 7μs (○).

Une décroissance bi-exponentielle est observée au pH le plus bas démontrant la présence de deux temps de vie différents et par conséquent de deux espèces différentes. Une décroissance tri-exponentielle apparaît dans la gamme de pH basse (entre pH 3 et pH 5), tandis qu'une décroissance quadri-exponentielle est observée aux pH les plus élevés (de pH 5 à pH 7). Ces résultats indiquent la présence d'un mélange d'au moins deux, trois ou quatre espèces à tout moment. Six temps de vie différents ont été mesurés : 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 ; 7 et 24 μs (**Tableau 1**). La contribution relative au temps de 2 μs qui est présente seulement à bas pH est typique de l'ion uranyle libre en solution (6, 7). Comme ça a été évoqué plus tôt, le décalage de longueur d'onde suite à l'ajout de protéine indique une complexation quasi complète de l'uranyle par la protéine, et comme le montre la **Figure 3**, la proportion d'uranyle libre est très faible, même à bas pH. Par conséquent, le temps de vie le plus faible (0,4 μs) est attribué au complexe formé entre la CaM et l'uranyle (CaM(UO₂²⁺)). La complexation de l'uranyle par la CaM semble être responsable d'une diminution de son temps de vie. La proportion de ce temps de vie diminue avec l'augmentation du pH impliquant une diminution de la quantité de CaM(UO₂²⁺). En parallèle de la diminution du premier complexe une autre espèce dont le temps de vie est de 4 μs apparaît. La contribution au signal de fluorescence de cette espèce augmente jusqu'à pH 5,5 puis reste stable jusqu'à pH 6,5 avant de commencer à diminuer à pH 7. Ce temps de vie de 4 μs est

attribué à une autre forme du complexe entre la calmoduline et l'uranyle. Un temps de vie différent impliquant un environnement différent, ceci indique un changement dans la sphère de coordination du métal. L'apparition de cette nouvelle espèce se faisant en parallèle à l'augmentation du pH, il est supposé que c'est une espèce hydrolysée de l'uranyle qui est complexé par la protéine pour former le complexe $\text{CaM}(\text{UO}_2(\text{OH})^+)$. De plus une augmentation du temps de vie est généralement observée pour les espèces hydrolysées de l'uranyle(5, 6), on retrouve donc ici ce comportement avec une augmentation du temps de vie du complexe qui passe de 0,4 μs à 4 μs . Par ailleurs, les liaisons M-OH étant bien plus courtes que les liaisons M-OH₂ cette hypothèse devrait pouvoir être vérifiée par les travaux d'EXAFS, décrits plus tard dans ce chapitre, qui permettront de déterminer la composition de la sphère de coordination de l'uranyle.

Temps de vie (μs)	Espèce
0,4 \pm 0,1	$\text{CaM}(\text{UO}_2^{2+})$
1 \pm 0,2	$\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$
2 \pm 0,3	UO_2^{2+}
4 \pm 0,5	$\text{CaM}(\text{UO}_2\text{OH}^+)$
7 \pm 0,7	$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$
24 \pm 3	$(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$

Tableau 1 : Liste des temps de vie mesurés et les espèces qui leurs sont associés

L'attribution d'un temps de vie à chaque espèce c'est faite en suivant en les temps de vie trouvés dans la littérature mais également en prenant en compte la spéciation de l'uranyle en absence de ligand, à la concentration choisie lors de l'étude en pH. La contribution du temps de vie de 24 μs qui apparait à pH 3,9 est présente à une faible et constante quantité. Elle est attribuée à l'espèce d'hydroxyde $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$. Le rendement quantique de cette espèce étant quatre-vingt fois supérieur à celui de l'uranyle libre en solution (2) nous sommes capables de le détecter lors de cette expérience malgré sa concentration en solution très faible, proche de zéro. De plus, le temps de vie mesuré est proche de celui reporté dans la littérature.

Le temps de vie de 1 μs apparait après pH 5 et sa contribution augmente avec le pH. Ce temps de vie correspond à une autre espèce hydrolysée. D'après le diagramme de spéciation de l'uranium à cette concentration(6), cette espèce correspond

vraisemblablement à $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3^-$. Le rendement de fluorescence de cette espèce est lui aussi largement plus élevé que celui de l'uranyle libre ce qui explique que sa contribution soit aussi importante sur la **Figure 3** bien que sa concentration reste relativement limitée avant pH 7. En outre, le spectre calculé lors de la simulation correspond très bien aux spectres de $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3^-$ que l'on peut trouver dans la littérature (4, 5). Le temps de vie de 7 μs qui apparaît à la fin de l'étude est attribué à l'espèce $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ qui est présente en faible quantité dans les conditions de notre étude. On l'observe néanmoins à cause de son rendement quantique élevé par rapport à l'uranyle libre (intensité quatre fois plus importante que l'uranyle libre)(2).

b) Calcul des constantes de stabilité et des spectres théoriques

Les différents spectres obtenus lors de l'étude en pH ont été utilisés pour calculer la constante de stabilité des deux complexes avec le logiciel *Hypspec*(8). Les constantes d'hydrolyses de l'ion uranyle ont également été utilisées et sont reportées en Annexe tout comme le pK_A des acides aminés participant à la complexation (aspartate, glutamate et thréonine).

Les différents équilibres ont été ajoutés dans le modèle préparé sur *Hypspec* et les constantes de stabilité apparentes calculées pour les deux complexes sont reportées dans le **Tableau 2**.

Equilibre	Log β
$\text{CaM} + \text{UO}_2^{2+} \rightleftharpoons \text{CaM}(\text{UO}_2^{2+})$	$6,0 \pm 0,2$
$\text{CaM} + (\text{UO}_2\text{OH}^+) \rightleftharpoons \text{CaM}(\text{UO}_2\text{OH}^+)$	$1,1 \pm 0,1$

Tableau 2 : Constantes de stabilité apparente des complexes de CaM

En plus des constantes de stabilité calculées, les spectres théoriques de chacune des espèces peuvent être obtenus par déconvolution du signal de fluorescence (**Figure 4** et **Figure 5**).

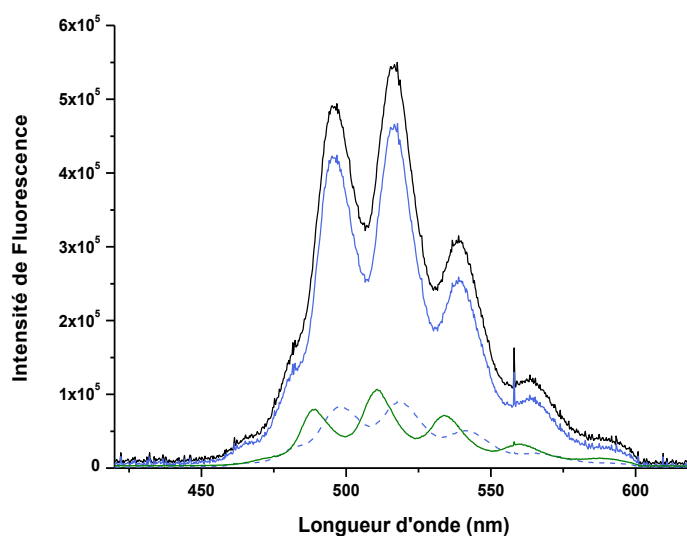


Figure 4 : Déconvolution spectrale calculée par Hypspec à pH 3,5. Spectre expérimental (ligne noire), complexe $\text{CaM}(\text{UO}_2^{2+})$ (ligne bleue), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue) et uranyle libre (ligne verte).

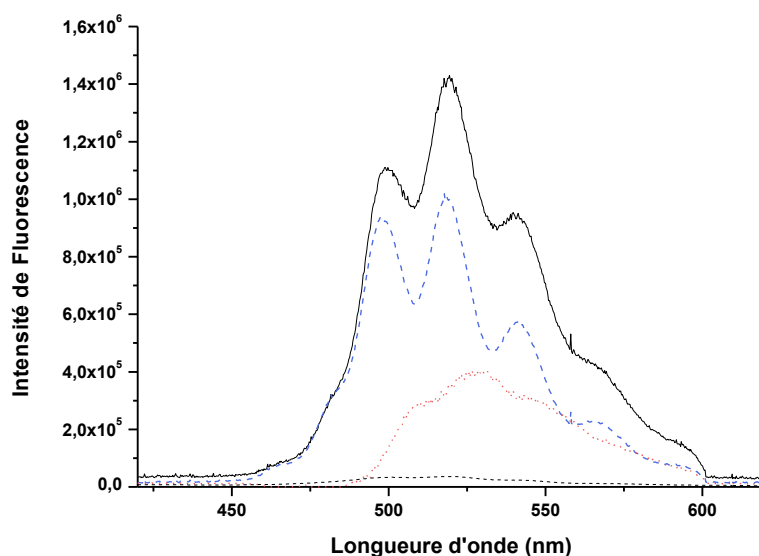


Figure 5 : Déconvolution spectrale calculée par Hypspec à pH 7. Spectre expérimental (ligne noire), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue), $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3^-$ (points rouges) et $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2$ (ligne brisée noire).

Comme les résultats expérimentaux l'avaient laissé présager, les spectres des deux complexes sont similaires, et ne sont différenciés que par le décalage vers les plus hautes longueurs d'onde du complexe hydrolysé présent à plus haut pH et par son rendement quantique plus important (intensité de fluorescence beaucoup plus élevée).

Grâce aux simulations effectuées et aux constantes calculées, le diagramme de spéciation de l'uranyle en présence de CaM a pu être tracé (**Figure 6**). Celui-ci montre les mêmes tendances que l'étude des temps de vie exposée sur la **Figure 3**. Comme énoncé précédemment, on constate ici que la concentration des espèces hydrolysées de l'uranyle ($(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ et $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$) reste à une concentration très faible tout au long de l'étude menée et n'étaient par conséquent visible sur les spectres de fluorescence que grâce à leur rendement quantique très élevé. A bas pH le premier complexe est l'espèce majoritaire, puis avec l'augmentation du pH la proportion du complexe hydrolysé s'accroît pour devenir l'espèce prédominante au-delà de pH 5. La quantité d'uranyle complexé à la protéine diminue à partir de pH 6, valeur à laquelle les espèces hydrolysées apparaissent, et deviennent à mesure que le pH augmente, de plus en plus importantes.

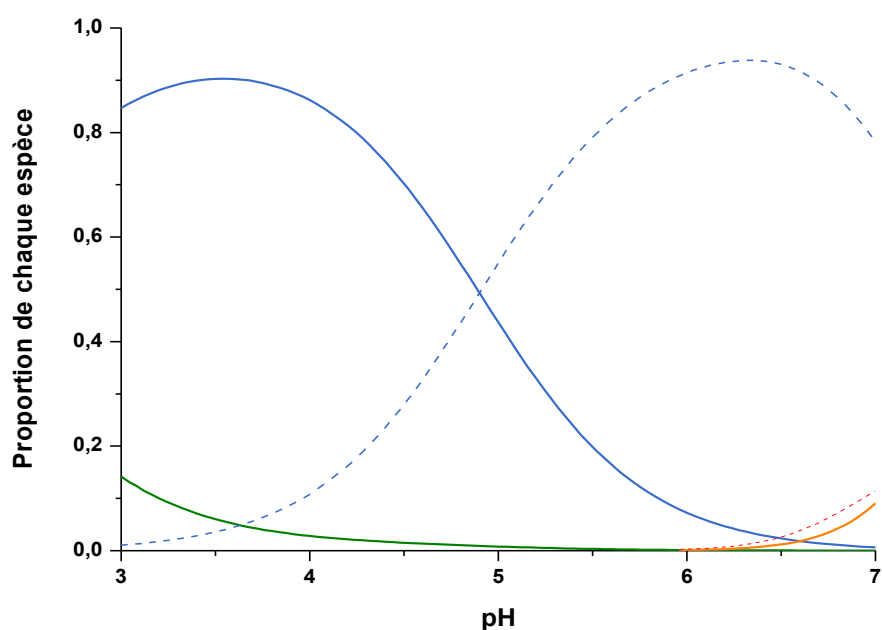


Figure 6 : Diagramme de spéciation de l'uranyle (4×10^{-5}) en présence de CaM (1×10^{-4}). Complexe $\text{CaM}(\text{UO}_2^{2+})$ (ligne bleue), complexe hydrolysé (ligne brisée bleue), uranyle libre (ligne verte), $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^-$ (ligne brisée rouge), $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ (ligne orange).

Les données obtenues grâce à cette étude de fluorescence seront utilisées pour déterminer les conditions dans lesquelles les solutions, pour les expériences EXAFS, seront préparées.

1.3 Etude de l'interaction entre le neptunyle et la CaM par UV-vis

Contrairement à l'uranyle, les interactions entre la CaM et le neptunyle n'ont encore fait l'objet d'aucune investigation. Afin de déterminer si la protéine possède une affinité suffisante pour le Np(V) un dosage UV-visible a été réalisé. Cette méthode, qui permet de suivre l'absorbance d'un échantillon en fonction de la variation de la longueur d'onde, suit la loi de Beer-Lambert.

Les transitions électroniques observées sont caractéristiques d'un élément et les modifications spectrales susceptibles d'apparaître pendant le dosage sont dues au changement d'environnement du métal. Ces modifications permettent le suivi de la complexation du métal par la protéine (Le principe et les solutions utilisées seront détaillés en Annexe).

La protéine entière a été utilisée ici pour déterminer la capacité de celle-ci à complexer le neptunyle. Une expérience couplant l'ultrafiltration à l'analyse par ICP-OES dont la méthode est décrite en Annexe a permis de déterminer le nombre de sites de la protéine occupés par les ions actinyles. Pour des raisons de radioprotection, l'expérience n'a pu être réalisée avec le neptunyle mais seulement avec l'uranyle. La structure des deux ions étant identique (structure en bâtonnet), les résultats obtenus avec l'uranyle ($2,6 \pm 0,2$ ions uranyles par protéine) seront également utilisés avec le neptunyle.

Des échantillons contenant la même concentration de neptunyle (1×10^{-4} M) et des quantités variables de protéine ont été préparés. Tous les spectres d'absorbance sont montrés sur la **Figure 7**. On constate une diminution de l'absorbance à 980 nm (longueur d'onde caractéristique du Np(V) libre en solution (9, 10) ainsi qu'une augmentation de l'absorbance à 987 nm (longueur d'onde attribué au complexe). Le point isobestic situé à 984 nm a été utilisé pour le calcul de la constante de stabilité du complexe : $\log(\beta) = 4,9 \pm 0,2$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que les constantes de stabilité reportée entre la CaM et le calcium qui est le métal d'intérêt en milieu physiologique (1, 11).

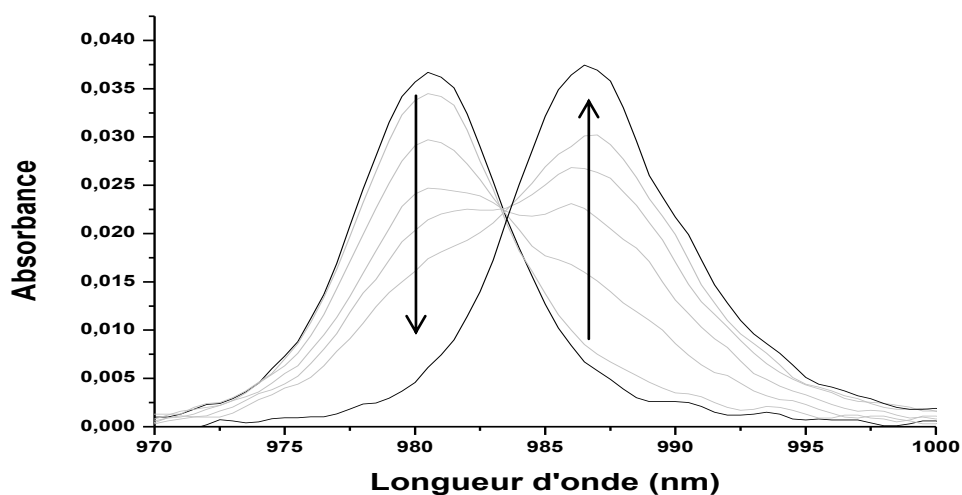


Figure 7 : Titration du Np(V) ($1 \times 10^{-4} M$) par la calmoduline (0-1,5 eq). pH 7,4 ; $T = 20^{\circ}C$

Afin de vérifier que le neptunyle et le calcium partagent le même site de complexation, une grande quantité de calcium (1000 équivalents par rapport au neptunyle) à la solution de CaM-Np a été ajoutée. On constate une forte diminution de l'absorbance à 987 nm (complexe) et une augmentation de l'absorbance à 980 nm (Neptunyle libre). Ces changements spectraux démontrent une décomplexation quasi complète du neptunyle par la protéine, suggérant qu'il y a une compétition entre les deux ions pour les sites de complexation.

2. Site de complexation des actinyles dans la protéine

Les expériences précédemment exposées (UV-visible, SLRT) ont démontré qu'il existe une interaction entre la protéine et les deux ions actinyles d'intérêts mais également que ces métaux occupent le même site de complexation que le calcium. Cependant un manque d'information subsiste sur les fonctions chimiques participant à la complexation de l'uranyle et du neptunyle.

L'EXAFS (Extended X-ray Fine Structure) est une technique de spectroscopie des rayons X (réalisée sur synchrotron) qui permet de déterminer la composition de la sphère de coordination des métaux. Ces analyses nous donnent la possibilité de connaître l'environnement des ions actinyles lorsqu'ils sont complexés par la CaM. De plus, cette technique nous donne la possibilité de confirmer l'existence d'une liaison M-OH dans le cas de l'uranyle ce qui se traduirait par la présence d'une distance courte. L'effet du pH sur la sphère de coordination du métal est donc étudié dans ce chapitre pour les deux ions d'intérêts.

Le principe de l'EXAFS, les paramètres d'acquisition et d'analyse ainsi que les détails relatifs aux calculs DFT sont regroupés en Annexe.

2.1 Modèles optimisés par DFT

Afin de réaliser l'ajustement des données obtenues en EXAFS, il est nécessaire de construire un modèle décrivant la structure des complexes entre la calmoduline et les ions actinyles. Les structures construites sont ensuite optimisées en énergie *via* des calculs utilisant la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT). La géométrie des systèmes a été optimisée en employant les RECP (Relativistic Effective Core Potential) au niveau B₃LYP et les effets de solvation ont été introduits en utilisant un modèle de continuum polarisé (PCM). L'uranyle est connu pour occuper le site de complexation du calcium dans certaines protéines régulatrices du Ca (12, 13) et la titration UV-visible réalisée précédemment a également montré que Ca et Np partagent le même site de complexation. Par conséquent, afin de construire les modèles, les données cristallographiques de la CaM_{WT} ont été utilisées pour localiser et

construire le site de complexation du Ca et ainsi déterminer la sphère de coordination de l'uranyle et du neptunyle dans la protéine. Plusieurs modèles ont été construits avec une sélection systématique des fonctions complexantes présentes dans le site de complexation du calcium (acides aminés constituant le site du Ca : DKDGDGYITTK). Un grand nombre de ces modèles fut éliminé à cause de la gêne stérique causée par la complexation dans le plan équatorial, spécifique aux ions actinyles. D'autres structures furent écartées car instables énergétiquement suite aux processus de minimisation de l'énergie. Les structures issues des calculs DFT les plus stables énergétiquement furent par conséquent utilisées pour l'ajustement des données EXAFS. Finalement, l'environnement le plus stable énergétiquement pour les actinyles est composé d'un carboxylate bidentate (O_{bi}), d'un carboxylate monodentate (O_{mono}) et d'un oxygène provenant d'un carbonyle ($O_{carbonyle}$). De plus, les données EXAFS, présentées plus tard dans ce chapitre, ont révélées la présence d'une distance courte à haut pH (pH 6) suggérant la présence d'un hydroxyde dans la sphère de coordination de l'uranyle (14). L'absence de cette distance courte à plus bas pH (pH 3) nous a conduits à construire deux modèles différents : un modèle « bas pH » (environnement acide) possédant une molécule d'eau dans sa sphère de coordination et un modèle « haut pH » (environnement plus basique) où un groupement OH^- remplace la molécule d'eau. La sphère de coordination de l'uranyle est donc complétée soit par une molécule d'eau ou un OH^- satisfaisant ainsi le nombre de coordination de cinq dans le plan équatorial. L'optimisation énergétique des structures actinyles-protéine nous a permis de déterminer la plus stable et par conséquent la plus à même d'exister en cas de contamination interne. Toutes les chaînes latérales ne participant pas à la complexation ont été éliminées pour minimiser le temps de calcul, ce qui ne pose pas de problème étant donné que cette étude se concentre sur la composition de la sphère de coordination des actinyles et non sur la structure globale de la protéine.

La **Figure 8** montre les deux structures optimisés énergétiquement pour chaque métal, l'une contenant une molécule d'eau, l'autre un hydroxyde dans sa sphère de coordination.

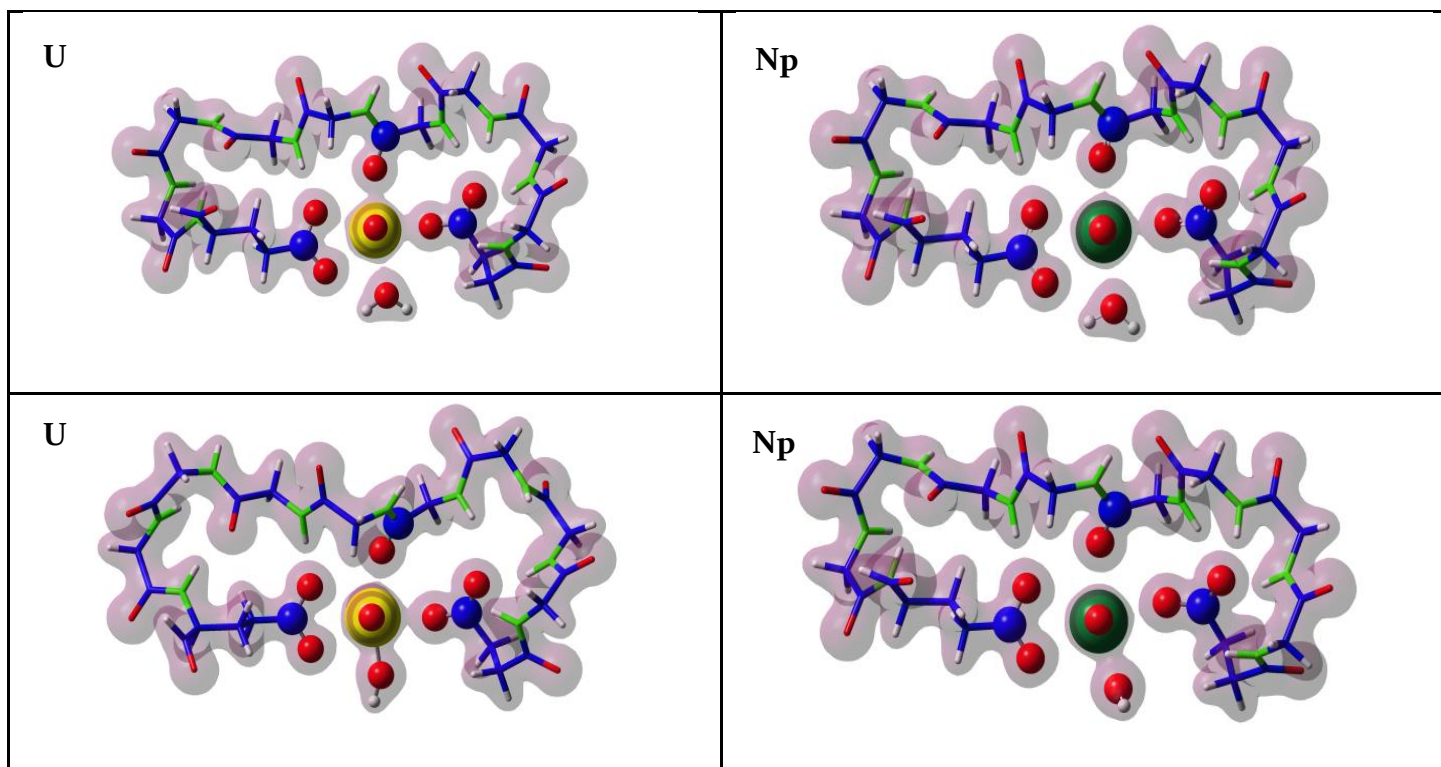


Figure 8 : Modèles théoriques optimisés par DFT et densité électronique des sites d'interaction de la CaM_{WT} avec l'U^{VI} (colonne de gauche) et le Np^V (colonne de droite) (Oxygène : rouge, carbone : bleu, azote : vert clair, uranium : jaune, neptunium : vert foncé).

Distance (Å)	[CaM _{WT} -U-H ₂ O]	[CaM _{WT} -U-OH] ⁻¹	[CaM _{WT} -Np-H ₂ O] ⁻¹	[CaM _{WT} -Np-OH] ⁻²
M-O _{ax}	1.80	1.82	1.83	1.87
M-O _{mono}	2.22	2.28	2.33	2.44
M-O _{carbonyle}	2.33	2.44	2.41	2.52
M-O _{bi}	2.51	2.59	2.62	2.68
M-O _{OH₂/OH}	2.47	2.12	2.53	2.25
E _I (eV)	-3.28	-1.71	-2.17	-1.65

Tableau 3 : Distances et énergies de liaison calculées par DFT pour les quatre complexes

Comme attendu (15, 16) les longueurs moyennes de liaison des complexes CaM_{WT}-[M-OH₂] augmentent dans l'ordre suivant : M-O_{mono} < M-O_{carbonyle} < M-O_{H₂O} < M-O_{bi}. Pour le complexe CaM_{WT}-[M-OH] en revanche, le groupe OH⁻ est beaucoup plus proche du centre métallique ce qui donne des longueurs de liaison qui suivent l'ordre : M-O_{OH} < M-O_{mono} < M-O_{carbonyle} < M-O_{bi}. Ces résultats théoriques sont en accord avec la nature plus covalente (interaction plus intense) de l'oxygène du groupement OH⁻ comparé à l'oxygène de la molécule d'eau. L'ion OH⁻ étant beaucoup plus proche du métal, une augmentation des distances M-O_{CaM} est observée dans le complexe CaM_{WT}-

[M-OH] par rapport au complexe $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-[M-OH}_2\text{]}$ pour les deux métaux étudiés indiquant un affaiblissement de la complexation entre la protéine et les actinyles dû à la liaison très forte existant entre OH et le centre métallique.

Toutes les distances calculées entre l'ion uranyle et les oxygènes composant sa sphère de coordination dans les deux complexes ($\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-U-H}_2\text{O}$ et $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-U-OH}$) sont plus courtes que les même distances calculées entre le neptunyle et la CaM ce qui peut être expliqué par la différence de charge des deux cations.

Ces structures ont ensuite été utilisées pour réaliser l'ajustement des données EXAFS et ainsi comparer les distances théoriques aux distances expérimentales.

2.2 Analyse des données EXAFS de l' U^{VI}

L'affinité du motif main-EF de la CaM pour l'uranyle a déjà été étudiée en utilisant le domaine N-terminal de la calmoduline ou des peptides correspondant au site de complexation du calcium. Cependant, une étude structurale complète permettant de déterminer la composition de la sphère de coordination n'a toujours pas été menée. Les expériences préliminaires de SLRT ont montré qu'à pH 3 et pH 6 les complexes entre la calmoduline et l'uranyle sont largement majoritaires (**Figure 3**). Les changements de temps de vie observés lors de cette étude suggèrent un changement d'environnement de l'uranyle. La présence d'une seule espèce étant impérative à l'obtention de résultats significatifs, les données d'EXAFS ont par conséquent été recueillies à ces deux pH d'intérêt. Le but de ces expériences est de déterminer la composition de la sphère de coordination de l'uranyle dans ces deux conditions et ainsi de déterminer l'impact de l'hydrolyse de l'uranyle sur sa complexation par la protéine.

Le modèle adopté le plus stable inclus deux oxygènes axiaux (O_{ax}) et trois couches d'oxygènes équatoriaux (i.e. O_{mono} , O_{carb} et O_{eq}). L'atome O_{mono} représente l'atome d'oxygène du carboxylate monodente présent dans la sphère de coordination, O_{carb} représente l'oxygène du groupe carbonyle et O_{eq} représente à la fois les oxygènes du carboxylate bidente et celui de la molécule d'eau (Ils ont été regroupés dans la même couche car ils se situent à la même distance du métal (résolution de l'EXAFS $\sim 0,1 \text{ \AA}$)). Une couche additionnelle représentant les atomes de carbones associés aux

oxygènes précités a également été prise en compte (C_{bi} représente le carbone du carboxylate bidente, C_{mono} celui du carboxylate monodente et C_{carb} celui de la fonction carbonyle). Pour l'expérience menée à pH 6 (**Tableau 5**) en revanche, l'attribution est légèrement différente. O_{oh} représente l'hydroxyde présent dans la sphère de coordination et O_{eq} est remplacé par O_{bi} qui représente les deux oxygènes du carboxylate bidente. L'oxygène de l'hydroxyde est beaucoup plus proche du centre métallique que les autres atomes de la sphère de coordination et par conséquent ne peut pas être regroupé avec les oxygènes du carboxylate bidente comme c'était le cas pour O_{H_2O} à pH 3 (**Tableau 4**).

Lors de la procédure d'ajustement, les chemins de diffusion triple et quadruple relatif aux deux oxygènes axiaux des actinyles ont été pris en compte. Les chemins de diffusion multiple $U-C_{mono}-O_{mono}$, $U-C_{carb}-O_{carb}$, et $U-C_{bi1}-C_{bi2}$ ont également été nécessaire pour effectuer l'ajustement des données expérimentales. Le facteur Debye-Waller (σ) des trois chemins de diffusion multiple relatifs aux oxygènes axiaux a été contraint à deux fois la valeur du facteur correspondant au chemin de diffusion simple (σ_i). Pour les autres chemins de diffusion multiple, la linéarité (ou quasi-linéarité) des chemins pris en compte ne nécessitait pas l'introduction de nouveaux facteur Debye-Waller et les σ sont par conséquent les mêmes que ceux des atomes d'oxygènes leur correspondant (ces approximations sont faite afin de minimiser le nombre de paramètres et ainsi contraindre la contribution des différents groupes).

Pour l'expérience menée à pH 6, le même protocole a été suivi, seulement le chemin $U-O_{mono}-U-O_{bi}$ s'est vu attribué son propre facteur debye-Waller (σ_7). ΔR représente la différence de distance entre le modèle calculé et les données expérimentales. Le ΔR des chemins multiples a été contraint à deux fois celui des chemins simples correspondant. (e.g. ΔR_i). Le ΔR des atomes de carbones est généralement le même que celui des atomes d'oxygène auxquels ils sont rattachés (i.e. O_{mono} et C_{mono} ont le même ΔR). Cependant quand l'angle entre le centre métallique, l'oxygène et le carbone n'est pas linéaire il est important de le prendre en compte car il a une influence directe sur le résultat final qui est la distance entre l'ion actinyle et sa sphère de coordination (e.g. pour le chemin $U-C_{mono}$ (**Tableau 5**) on utilise l'approximation $\Delta R = \cos(\text{angle}) \times \Delta R_3 = 0,99 \times \Delta R_3$). Cette approximation est basée sur

l'hypothèse selon laquelle les angles issus des calculs DFT sont ceux existant dans le complexe expérimental étudié.

Une fenêtre d'ajustement Hanning en k^3 (2 ; 12) a été utilisée et l'ajustement des spectres s'est fait en R (1 ; 5). Les paramètres d'ajustement tel que l'amplitude (S_o^2) et ΔE_o sont donnés pour chaque expérience. Le facteur R (r) de l'ajustement et le facteur de qualité χ^2 -réduit ($\chi^2_{i ln}$) sont tous les deux fournis en tant qu'indicateur de la qualité de l'ajustement.

Chemin	$R_{DFT}(\text{Å})$	ΔR	σ	N_{deg}	$R_{ajusté}(\text{Å})$	$\sigma (x 10^{-3} \text{Å}^2)$
U-O _{ax}	1,80	ΔR_1	σ_1^2	2	1,78	4
U-O _{mono}	2,22	ΔR_2	σ_2^2	1	2,29	2
U-O _{carb}	2,33	ΔR_3	σ_3^2	1	2,37	3
U-O _{eq}	2,52	ΔR_4	σ_4^2	3	2,49	3
U-C _{bi}	2,96	ΔR_5	σ_5^2	1	2,90	4
U-C _{mono}	3,54	ΔR_2	σ_2^2	1	3,62	2
U-C _{carb}	3,61	ΔR_3	σ_3^2	1	3,65	3
U-O _{ax1} -U-O _{ax1}	3,61	$2 \times \Delta R_1$	$2 \times \sigma_1^2$	2	3,56	8
U-O _{ax2} -U-O _{ax1}	3,61	$2 \times \Delta R_1$	$2 \times \sigma_1^2$	2	3,56	8
U-O _{ax2} -O _{ax1}	3,61	$2 \times \Delta R_1$	$2 \times \sigma_1^2$	2	3,56	8
U-O _{carb} -C _{carb}	3,61	ΔR_3	σ_3^2	2	3,65	3
U-C _{bi1} -C _{bi2}	4,46	ΔR_5	σ_5^2	2	4,40	4
U-O _{mono} -C _{mono}	3,56	ΔR_2	σ_2^2	2	3,63	2

Tableau 4 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-U^{VI} déterminé à

pH 3. $S_o^2=1$; $\Delta E_o= 3,8 \text{ eV}$. $R=0,003$; $\chi^2_{i ln}= 4.2$

Chemin	R _{DFT} (Å)	ΔR	σ	N _{deg}	R _{ajusté} (Å)	σ (x 10 ⁻³ Å ²)
U-O _{ax}	1,82	ΔR ₁	σ ₁ ²	2	1,78	4
U-O _{oh}	2,12	ΔR ₂	σ ₂ ²	1	2,21	6
U-O _{mono}	2,28	ΔR ₃	σ ₃ ²	1	2,32	7
U-O _{carb}	2,44	ΔR ₄	σ ₄ ²	1	2,40	5
U-O _{bi}	2,59	ΔR ₅	σ ₅ ²	2	2,47	3
U-C _{bi}	3,05	ΔR ₆	σ ₆ ²	1	2,91	4
U-C _{mono}	3,58	0,99 x ΔR ₃	σ ₃ ²	1	3,62	7
U-C _{carb}	3,56	0,92 x ΔR ₄	σ ₄ ²	1	3,52	5
U-O _{ax1} -U-O _{ax1}	3,65	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,55	8
U-O _{ax2} -U-O _{ax1}	3,65	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,55	8
U-O _{ax2} -O _{ax1}	3,65	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,55	8
U-O _{mono} -C _{mono}	3,59	ΔR ₃	σ ₃ ²	2	3,63	7
U-O _{carb} -C _{carb}	3,64	0,96 x ΔR ₄	σ ₄ ²	2	3,60	5
U-C _{bi1} -C _{bi2}	4,53	ΔR ₇	σ ₆ ²	2	4,43	4
U-O _{mono} -U-O _{bi}	4,87	ΔR ₃ + ΔR ₅	σ ₇ ²	4	4,79	3

Tableau 5 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-U^{VI} déterminé à

$$pH\ 6. S_o^2=1; \Delta E_o=3,6\ eV. R=0,001; \chi^2_i\ ln=5,6$$

En prenant en considération le nombre de chemin et les contraintes géométriques, le nombre de paramètre flottant est de 10 pour l'expérience à pH 3 et de 12 pour celle à pH 6. Tous les résultats des ajustements sont résumés dans le **Tableau 4** et le **Tableau 5**. Les spectres EXAFS k³ et leurs transformées de Fourier correspondantes sont montrés dans les **Figure 9** et **Figure 10**.

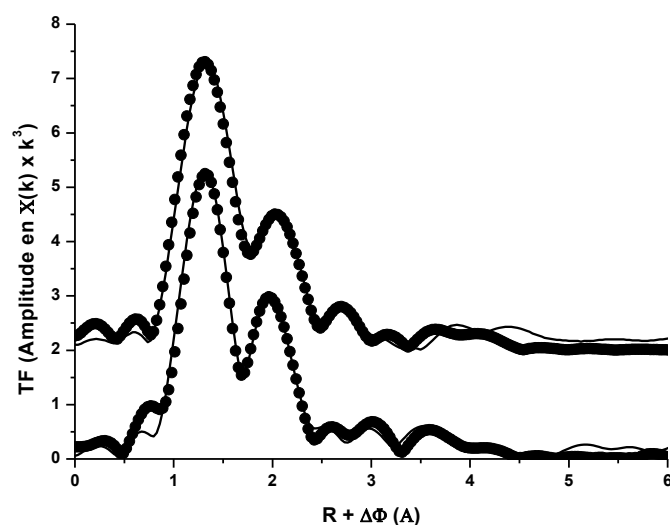


Figure 9 : Transformées de Fourier des données EXAFS obtenues pour le complexe $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-U}^{\text{VI}}$ à des pH différents. (en bas : pH 3 ; en haut pH 6). Les lignes représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.

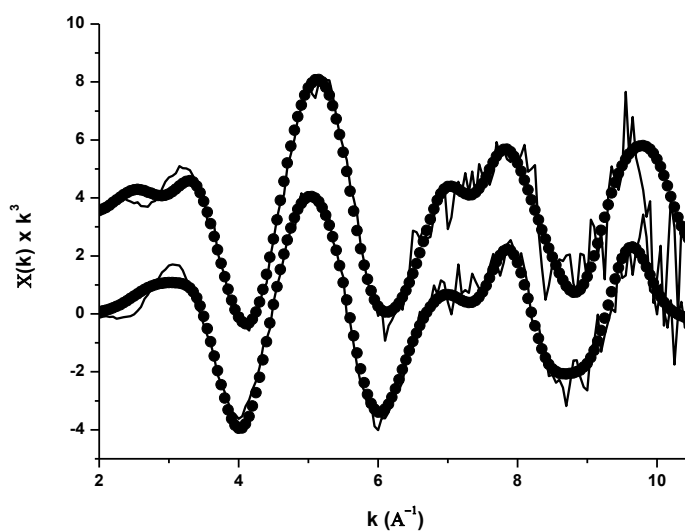


Figure 10 : Spectres EXAFS en k^3 du niveau d'énergie U L_{III} pour les complexes $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-U}^{\text{VI}}$ à différents pH (pH 3 en bas ; pH 6 en haut). Les lignes noires représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.

Les données EXAFS pour les deux échantillons présentent des différences dans les oscillations reportées dans les figures ci-dessus. En effet, en plus d'un décalage de k ($0,2 \text{ \AA}^{-1}$) sur les trois premières oscillations, il y a une différence claire entre $k=8,5 \text{ \AA}^{-1}$ et $k=9,5 \text{ \AA}^{-1}$. Ces différences ajoutées au décalage observé suggèrent une modification de la sphère de coordination de l'uranyle. Pour les deux complexes, une longueur de $R=$

1,78 Å pour les liaisons axiales U-O a été déterminée ce qui est typique pour un ion uranyle (17). Concernant les facteurs Debye-Waller, les résultats reportés dans le **Tableau 5** pour U-O_{ax} ($\sigma^2 = 0,004 \text{ \AA}^2$) sont cohérents avec les valeurs trouvées dans la littérature pour l'uranyle (0,002-0,004 Å²) (17-19). La sphère de coordination est similaire pour les deux complexes, cependant, l'ajustement des données expérimentales montre une contraction des distances entre l'uranyle et les atomes d'oxygène provenant de la protéine pour l'échantillon à pH 3. On voit ainsi l'oxygène du carboxylate monodente situé à 2,29 Å pour l'expérience à bas pH alors que le même oxygène est situé à 2,32 Å à pH 6. Bien que la différence ne soit pas très grande (erreur sur la distance : 0,02 Å (limite haute)), la même tendance est observée pour tous les atomes coordinants de la protéine ce qui confirme que le changement de pH a une influence sur la sphère de coordination de l'uranyle. La différence principale vient de la distance courte présente à pH 6. Cette absence de distance courte pour l'expérience réalisée à pH 3 est visible sur la **Figure 9**, où l'on constate une meilleure résolution entre les deux premières couches à bas pH qu'à plus haut pH. Cette distance courte (2,20 Å) peut être attribuée à un hydroxyde présent dans la sphère de coordination avec une relative certitude. De plus la distance uranyle-hydroxyde trouvée correspond à celles précédemment reportée dans la littérature (2,19 Å) (20). Cet hydroxyde est lié de manière bien plus forte à l'uranyle qu'une molécule d'eau, et, par conséquent, il repousse les autres atomes coordinants fournis par la protéine ce qui explique les distances plus importantes observées à plus haut pH. A pH 3, l'absence de distance courte traduit un environnement différent pour l'uranyle, c'est donc une molécule d'eau qui vient compléter la sphère de coordination du métal. Ces résultats d'EXAFS confirment l'hypothèse évoquée après l'étude SLRT indiquant la présence de deux complexes différents dans la gamme de pH 3-7, l'un incluant une molécule d'eau dans sa sphère de coordination l'autre un hydroxyde. L'augmentation du pH semble causer l'hydrolyse de l'uranyle à l'intérieur de la protéine ce qui entraîne la présence d'un hydroxyde et par conséquent d'une distance courte dans la sphère de coordination du métal.

Les mêmes tendances sont observées entre les résultats expérimentaux et les résultats des calculs DFT. En effet, on constate aussi dans les résultats théoriques que la présence de l'hydroxyde dans la sphère de coordination cause une augmentation de

toutes les autres distances oxygène-métal. Ceci s'explique par la forte liaison covalente qui existe entre l'hydroxyde et l'uranyle, ce qui induit un affaiblissement des interactions entre l'uranyle et les autres atomes d'oxygène présents dans la sphère de coordination. La valeur des énergies de liaison obtenues par DFT et les informations qu'il peut en être déduit sur la stabilité des complexes seront traitées plus tard dans ce chapitre.

2.3 Analyse des données EXAFS du Np^{V}

Le neptunyle n'est pas aussi sensible à l'hydrolyse que l'uranyle, par conséquent, les expériences ont été réalisées à pH 7 (simulation des conditions physiologiques) et à pH 9. La seconde valeur de pH a été choisie afin de vérifier si l'augmentation du pH avait un effet sur la sphère de coordination comme c'est le cas pour l'uranyle. Bien qu'à pH 9 le pourcentage de neptunyle hydrolysé soit faible (moins de 5%) l'expérience n'a pas pu être réalisée à plus haut pH car une précipitation de la protéine a été observée au-delà de pH 9. Même si la proportion de neptunyle hydrolysé est faible, grâce aux équilibres thermodynamiques se passant à ce pH, si la protéine a une affinité beaucoup plus élevée pour le neptunyle hydrolysé, des changements devraient être visibles sur le spectre EXAFS de l'échantillon concerné.

Comme ce fut le cas pour l'uranyle à pH 3, le modèle le plus stable calculé par DFT inclus deux atomes d'oxygène axiaux (O_{ax}) et trois couches d'oxygènes équatoriaux (i.e. O_{mono} , O_{carb} , et O_{eq}). De la même manière que pour l'échantillon d'uranyle analysé à pH 3, les oxygènes de la fonction carboxylate bidente et celui de la molécule d'eau furent regroupés dans la même couche (O_{eq}). Une couche supplémentaire représentant l'atome de carbone de la fonction carboxylate bidente (C_{bi}) a été ajoutée ainsi que deux autres couches, C_{mono} et C_{carb} , représentant respectivement les atomes de carbone des fonctions carboxylate monodente et carbonyle.

Lors de la procédure d'ajustement, les chemins de diffusion triple et quadruple liés aux deux oxygènes axiaux ont été pris en compte comme ce fut le cas pour l'ion

uranyle. Les chemins de diffusion triple Np-O_{mono}-C_{mono}, Np-C_{carb}-O_{carb}, et Np-C_{bi1}-C_{bi2} furent également nécessaires à l'ajustement des données expérimentales.

Le facteur Debye-Waller (σ) des trois chemins de diffusion multiple relatifs aux oxygènes axiaux a été contraint à deux fois la valeur du facteur correspondant au chemin de diffusion simple (σ_1). Pour les autres chemins de diffusion multiple, la même procédure que pour l'ion uranyle a été suivie, la linéarité (ou quasi-linéarité) des chemins pris en compte ne nécessitait pas l'introduction de nouveaux facteur Debye-Waller et les σ sont par conséquent les mêmes que ceux des atomes d'oxygènes leur correspondant (ces approximations sont faite afin de minimiser le nombre de paramètres et ainsi contraindre la contribution des différents groupes). Le ΔR (différence de distance entre le modèle calculé par DFT et les données expérimentales) fut défini de la même manière que pour l'uranyle.

Chemin	R _{DFT} (Å)	ΔR	σ	N _{deg}	R _{ajust} (Å)	σ (x 10 ⁻³ Å ²)
Np-O _{ax}	1,83	ΔR_1	σ_1^2	2	1,82	3
Np-O _{mono}	2,33	ΔR_2	σ_2^2	1	2,32	5
Np-O _{carb}	2,41	ΔR_3	σ_3^2	1	2,46	3
Np-O _{eq}	2,57	ΔR_4	σ_4^2	3	2,53	5
Np-C _{bi}	3,05	ΔR_5	σ_5^2	1	3,00	3
Np-C _{mono}	3,46	0,90 x ΔR_2	σ_2^2	1	3,45	5
Np-C _{carb}	3,59	0,95 x ΔR_3	σ_3^2	1	3,63	3
Np-O _{ax1} -Np-O _{ax1}	3,68	2 x ΔR_1	2 x σ_1^2	2	3,64	6
Np-O _{ax2} -Np-O _{ax1}	3,68	2 x ΔR_1	2 x σ_1^2	2	3,64	6
Np-O _{ax2} -O _{ax1}	3,68	2 x ΔR_1	2 x σ_1^2	2	3,64	6
Np-O _{mono} -C _{mono}	3,56	0,95 x ΔR_2	σ_2^2	2	3,55	5
Np-O _{carb} -C _{carb}	3,69	0,98 x ΔR_3	σ_3^2	2	3,64	3
Np-C _{bi1} -C _{bi2}	4,55	ΔR_5	σ_5^2	2	4,50	3

Tableau 6 : Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-N^V déterminé à

$$pH\ 7. S_o^2=1,05 ; \Delta E_o=9\ eV. R=0,001 ; \chi^2_{i/n}=5,8$$

Chemin	R _{DFT} (Å)	ΔR	σ	N _{deg}	R _{ajust} (Å)	σ (x 10 ⁻³ Å ²)
Np-O _{ax}	1,83	ΔR ₁	σ ₁ ²	2	1,83	3
Np-O _{mono}	2,33	ΔR ₂	σ ₂ ²	1	2,33	5
Np-O _{carb}	2,41	ΔR ₃	σ ₃ ²	1	2,48	3
Np-O _{eq}	2,57	ΔR ₄	σ ₄ ²	3	2,52	5
Np-C _{bi}	3,05	ΔR ₅	σ ₅ ²	1	2,99	3
Np-C _{mono}	3,46	0,90 x ΔR ₂	σ ₂ ²	1	3,47	5
Np-C _{carb}	3,59	0,95 x ΔR ₃	σ ₃ ²	1	3,65	3
Np-O _{ax1} -Np-O _{ax1}	3,68	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,66	6
Np-O _{ax2} -Np-O _{ax1}	3,68	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,66	6
Np-O _{ax2} -O _{ax1}	3,68	2 x ΔR ₁	2 x σ ₁ ²	2	3,66	6
Np-O _{mono} -C _{mono}	3,56	0,95 x ΔR ₂	σ ₂ ²	2	3,55	5
Np-O _{carb} -C _{carb}	3,69	0,98 x ΔR ₃	σ ₃ ²	2	3,66	3
Np-C _{bi1} -C _{bi2}	4,55	ΔR ₅	σ ₅ ²	2	4,50	3

Tableau 7 :Description des chemins utilisés pour l'ajustement des données EXAFS du complexe CaM-N^V déterminé à

$$pH 9. S_0^2=1,05 ; \Delta E_0= 9 eV. R=0,004 ; \chi^2_{i ln}= 8$$

Une fenêtre d'ajustement Hanning en k³ (2 ; 12) a été utilisée et l'ajustement des spectres s'est fait en R (1 ; 5). Les paramètres d'ajustement tel que l'amplitude (S₀²) et ΔE₀ sont donnés pour chaque expérience. Le facteur R (r) de l'ajustement et le facteur de qualité χ²-réduit (χ²_{i ln}) sont tous les deux fournis en tant qu'indicateur de la qualité de l'ajustement.

En prenant en considération le nombre de chemins ainsi que les contraintes géométriques, le nombre de paramètres flottants est de 10. Tous les résultats sont résumés dans le **Tableau 6** et le **Tableau 7**. Les spectres EXAFS en k³ et leur transformée de Fourier correspondante sont visibles dans les **Figure 11** et **Figure 12**.

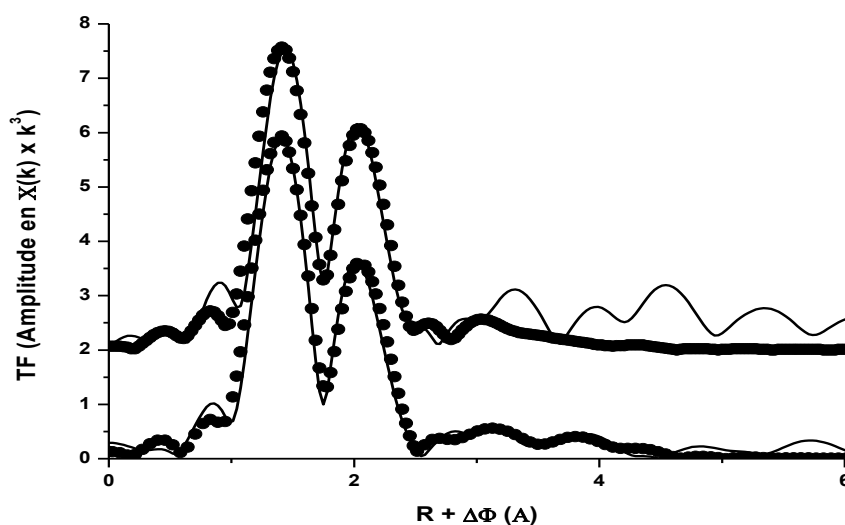


Figure 11 : Transformées de Fourier des données EXAFS obtenues pour le complexe $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-Np}^{\text{V}}$ à des pH différents. (en bas : pH 7 ; en haut pH 9). Les lignes représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.

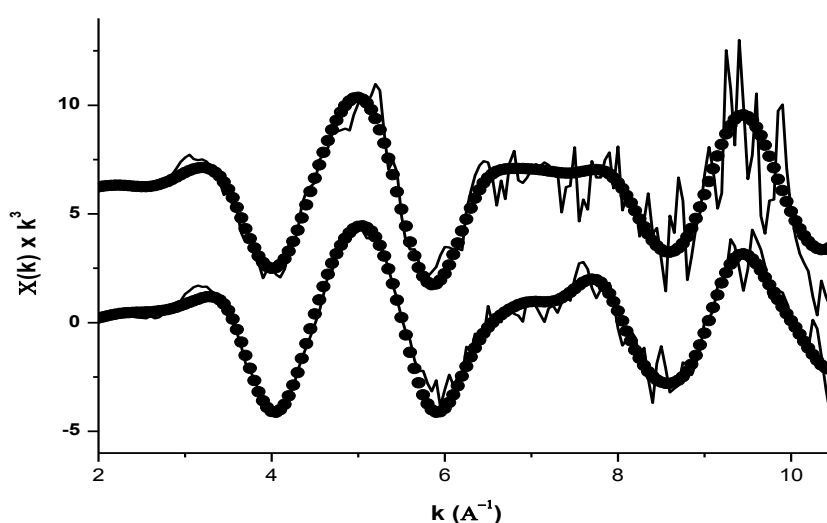


Figure 12 : Spectres EXAFS en k^3 du niveau d'énergie $\text{Np } L_{\text{III}}$ pour les complexes $\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-Np}^{\text{V}}$ à différents pH (pH 7 en bas ; pH 9 en haut). Les lignes noires représentent les données expérimentales et les points représentent les ajustements correspondants.

Pour l'expérience réalisée à pH 7 et à pH 9 une longueur de liaison de 1,82 Å et 1,83 Å respectivement (associée au deux oxygènes axiaux) a été déterminée ce qui est caractéristique de l'ion neptunyle (1,82-1,85 Å (21, 22)). La sphère de coordination des deux complexes est constituée d'un oxygène venant d'une fonction carboxylate monodente (2,32 Å), d'un oxygène carbonyle (2,46 Å) et est complétée par une couche

de trois oxygènes (2,53 Å) qui regroupe les deux oxygènes d'une fonction carboxylate bidente et une molécule d'eau. Les distances obtenues tout comme les facteurs Debye-Waller sont cohérents avec les valeurs reportées dans la littérature (23–25). La première chose relevée lors de la comparaison des données obtenues à pH 7 et pH 9 est la similarité des oscillations EXAFS pour les deux échantillons. Ce qui signifie que contrairement à l'expérience réalisée en présence d'uranyle, il n'y a pas de distance courte et par conséquent pas d'hydroxyde dans la sphère de coordination. Le faible pourcentage d'espèce hydrolysée lorsque le neptunyle est seul en solution explique probablement les similarités observées et l'absence de changement des oscillations EXAFS. Aucun effet du pH sur la sphère de coordination n'est donc observé, le métal possède le même environnement aux deux pH de travail et les distances neptunium-métal obtenues sont équivalentes (dans la gamme d'erreur (0,02 Å)) à pH 7 et pH 9 (*Tableau 6* et *Tableau 7*).

Les légères différences d'oscillation EXAFS entre les deux expériences s'explique par le niveau de bruit plus important lors de l'acquisition des données pour l'échantillon à pH 9 (Des interférences électroniques (glitches en énergie et jump glitches) nous ont empêché d'utiliser toutes les données enregistrées pendant cette expérience, entraînant l'obtention d'un spectre moyen bruyant comme le montrent les *Figure 11* et *Figure 12*). La concentration en métal relativement faible utilisée lors de cette expérience nous conforte dans l'idée que le signal observé au-delà de 3,5 Å ne peut pas être attribué au complexe et peut par conséquent considéré avec certitude comme du bruit.

2.4 Analyse de la densité électronique des modèles

La densité électronique pour chaque complexe est représentée sur la *Figure 8* pour chaque complexe optimisé par DFT. On peut constater en analysant cette figure que les liaisons entre le métal et la protéine sont plus covalentes (les nuages d'électrons se chevauchent) pour les complexes d'uranyle que pour les complexes de neptunyle (à sphère de coordination identique). De plus, on voit que les liaisons sont plus covalentes lorsqu'une molécule d'eau est dans la sphère de coordination que lorsqu'elle y est remplacée par un hydroxyde ce qui est confirmé par les résultats

expérimentaux. En effet, les distances expérimentales observées entre l'uranyle et les atomes coordinants de la protéine en présence d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination sont plus courtes qu'en présence d'un hydroxyde. Ceci indique une complexation plus forte de l'actinide par la protéine en présence de la molécule d'eau qu'en présence d'un groupe OH^- , on voit d'ailleurs bien sur la figure la perte de covalence des liaisons entre la CaM et les actinyles. Cet affaiblissement des liaisons est sans doute causé par la présence du groupe OH^- dans la sphère de coordination. En effet, l'interaction covalente très forte entre ce groupement et le métal a tendance à affaiblir les autres liaisons et donc engendrer une augmentation des autres distances métal-ligand. Ainsi, lorsque le groupe OH est présent dans la sphère de coordination, la nature de toute liaison tend à être moins covalente. Le même comportement est observé pour les complexes de neptunium, cependant, les liaisons métal protéine semblent être plus faibles dans le cas du neptunyle que dans celui de l'uranyle, ce qui peut être expliqué par la charge globale du neptunyle (+1) plus faible que celle de l'uranyle (+2). Cette charge plus faible de l'ion neptunyle implique que la contribution électrostatique de la liaison est plus faible que pour l'uranyle rendant le complexe final moins stable. La charge plus faible peut également expliquer l'absence de complexe hydrolysé dans les conditions étudiées. En effet, la présence d'un groupement OH^- affaiblirait les liaisons déjà faibles existant entre le neptunyle et la protéine. Le neptunyle hydrolysé est une espèce neutre tandis que l'uranyle possède toujours une charge positive malgré l'hydrolyse. La contribution électrostatique de la complexation entre l'uranyle hydrolysé et la CaM est donc toujours présente et la protéine a toujours suffisamment d'affinité pour $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ et peut ainsi former un complexe stable qui est par ailleurs la seule espèce présente à pH 6 comme le montrent les résultats d'EXAFS et de SLRT.

Un complexe entre la CaM et le neptunyle hydrolysé pourrait théoriquement exister à plus haut pH (au-delà de pH 10) malheureusement les expériences n'ont pas pu être menées dans de telles conditions expérimentales car la protéine précipite au-delà de pH 9. Le comportement du complexe CaM-neptunyle vis-à-vis de l'hydrolyse n'a donc pas pu être étudié.

2.5 Comparaison de l'énergie de liaison des complexes

Sur la base des calculs DFT dont il est question plus tôt dans le chapitre, les énergies de liaison des quatre systèmes étudiés ($\text{CaM}_{\text{WT}}\text{-[M-OH}_2\text{/OH]}$) ont été estimées afin de comparer la force des interactions entre la CaM et les ions actinyles. Les énergies de liaison (E_l reporté dans le **Tableau 3**) entre les ions et le site 1 de la CaM_{WT} ont été calculées avec la formule suivante :

$$E_L = E(AB) - (E(A) + E(M))$$

Où :

- AB : complexe
- A : protéine
- B : MO_2 (avec H_2O ou OH^-)

Une énergie de liaison négative correspond à un complexe stable.

Les résultats obtenus donnent des informations supplémentaires sur les études expérimentales menées montrant une absence d'affinité de la CaM pour le neptunyle hydrolysé. En effet, bien que présent en faible quantité en solution le neptunyle hydrolysé existe aux côtés du neptunyle libre, il pourrait par conséquent interagir avec la protéine. Cependant, seulement le complexe contenant une molécule d'eau fut observé. Les valeurs d'énergie de liaison calculées peuvent expliquer en partie les résultats expérimentaux obtenus. On constate en effet que le complexe contenant une molécule d'eau est plus stable ($E_l = -2,17$ eV) que son homologue contenant un groupement OH^- ($E_l = -1,65$ eV). Cela ne signifie pas que le complexe de neptunyle hydrolysé est absolument impossible à obtenir mais que dans les conditions de notre étude, (i.e. à pH 7 et pH 9) il n'est pas suffisamment stable pour être observé. Il pourrait cependant être majoritaire à plus haut pH ou la proportion de neptunyle hydrolysé devient prédominante. Cette partie de la gamme de pH est cependant en dehors de la région d'intérêt (conditions physiologiques), de plus, la protéine précipite au-delà de pH 9.

Le cas des complexes d'uranyle est différent puisque les deux espèces ont été observées lors des expériences d'EXAFS et de SLRT. Cependant, le complexe comportant la molécule d'eau dans sa sphère de coordination est là aussi plus stable ($E_1 = -3,28$ eV) que son homologue hydrolysé ($E_1 = -1,71$ eV). Cependant, la stabilité de ces deux espèces n'est pas directement comparable car elles ne sont pas majoritaires dans la même gamme de pH. L'espèce contenant la molécule d'eau existe à bas pH (EXAFS à pH 3) alors que les données EXAFS montrent que l'espèce hydrolysée est la plus stable à plus haut pH (EXAFS à pH 6).

La comparaison des complexes formés par la protéine avec les différents métaux doit se faire dans la gamme d'intérêt pour des études physiologiques. C'est par conséquent les résultats obtenus à pH 6 pour l'uranyle et pH 7 pour le neptunyle qu'il faut comparer (i.e. le neptunyle avec la molécule d'eau dans sa sphère de coordination et l'uranyle avec le groupement OH^- dans sa sphère de coordination). Les énergies de liaison des deux complexes sont sensiblement les mêmes, néanmoins on constate que le complexe entre la CaM et le neptunium possède une énergie de liaison légèrement plus faible ($E_1 = -2,17$ eV) que celui formé entre la protéine et l'uranyle ($E_1 = -1,71$ eV) à pH physiologique. Les résultats des calculs DFT suggèrent que le système neptunyle-CaM serait plus stable ce qui est contraire aux résultats expérimentaux obtenus. Il faut cependant être prudent avec les comparaisons inter-systèmes car les résultats obtenus ne sont comparables que pour un métal donné. En effet, les potentiels associés à chaque ion métallique ne sont pas définis de la même manière ce qui peut expliquer les différences de stabilité observées.

3. Complexation des actinides trivalents par la CaM

L'américium (Am^{3+}) ou le plutonium (Pu^{3+}) étant hautement radioactif nous sommes dans l'impossibilité de réaliser les expériences SLRT avec ces éléments. C'est donc avec un homologue que nous travaillerons. C'est l'euprium, un lanthanide qui possède la même charge, le même rayon ionique (26, 27) et des propriétés chimiques semblables à l'américium, qui sera étudié. De plus, les similarités de structure électronique entre lanthanides et actinides (**Figure 14**) nous permettent d'utiliser les lanthanides en tant que modèles pour les actinides qui malgré leurs bonnes propriétés fluorescente sont trop radiotoxiques pour être utilisés dans ce montage expérimental.

L'euprium est un ion trivalent et sphérique, de taille similaire au calcium (**Figure 13**), qui comme les ions actinyles étudiés précédemment est susceptible de remplacer le calcium dans les sites de complexation de la calmoduline.

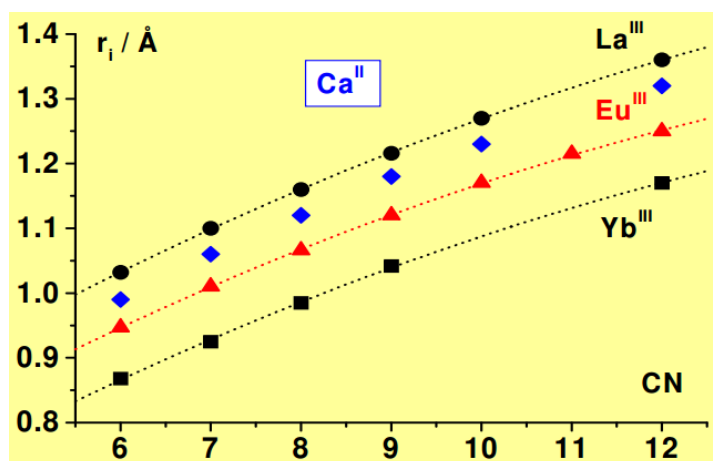


Figure 13 : Rayon ionique du calcium et de l'euprium en fonction de leur nombre de coordination

L'euprium dont le spectre de fluorescence et le temps de vie ($110 \pm 10 \mu\text{s}$ pour l'espèce libre en solution) sont bien connus (28, 29) sera étudié ici par fluorescence résolue en temps (SLRT) afin de déterminer s'il peut être complexé par la CaM. Dans le but de déterminer les meilleures conditions pour les expériences à venir, il a été décidé de réaliser une étude en pH.

La concentration en euprium des échantillons mesurés est de 5×10^{-5} M et celle en CaM est de 1×10^{-4} M. Comme lors des expériences SLRT réalisées avec l'uranyle, le pH est la seule variable lors des mesures, la concentration des deux composés présents en solution restant constante. La longueur d'onde d'excitation choisie pour l'euprium

est de 395 nm. La position des bandes présentes sur le spectre de fluorescence n'est pas influencée par l'environnement de l'ion et seulement l'intensité de ces bandes est susceptible d'être modifiée.

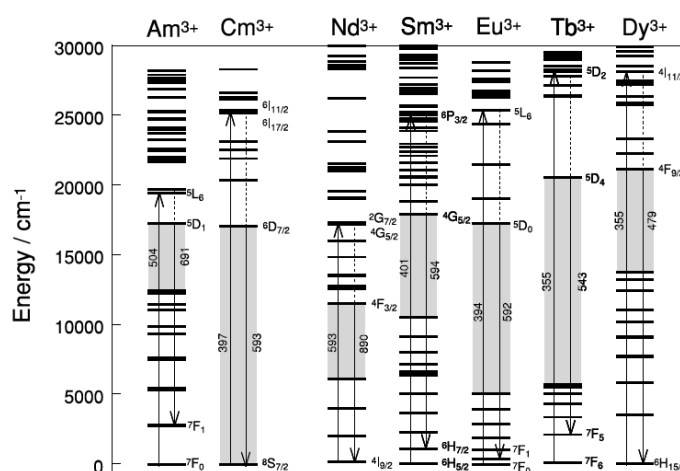


Figure 14 : Structure des niveaux d'énergie pour les actinides et les lanthanides (30)

Les échantillons ont été préparés avec l'hybride de la calmoduline (CaM_{WT}) qui ne possède qu'un seul site actif. Contrairement à l'uranyle, l'euporium possède l'avantage de n'être que peu sensible à l'hydrolyse (constantes d'hydrolyse données en Annexe).

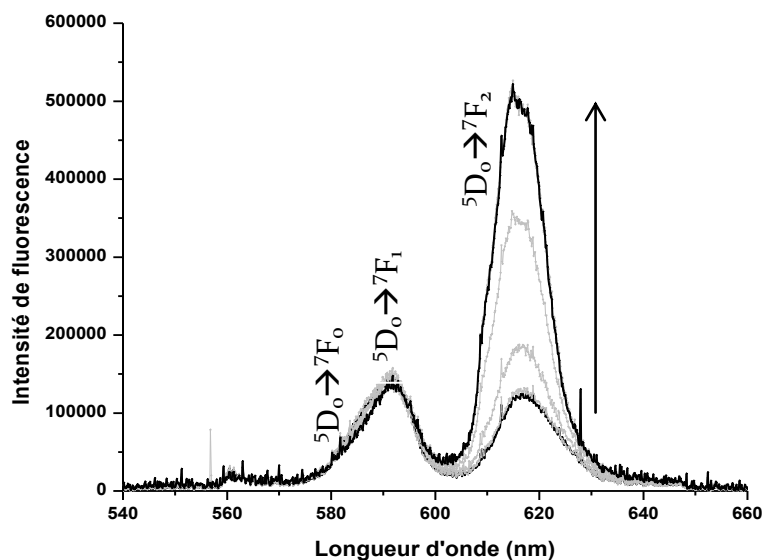


Figure 15 : Spectre de fluorescence de l'euporium en présence de CaM à des pH différents (pH 2,3-7,5)

Le pic observé à 590 nm qui correspond aux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (transition interdite) et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ n'est pas modifié par le changement de pH. On constate en revanche une augmentation de l'intensité de fluorescence à 615 nm (transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$) lorsque le pH de la solution augmente (**Figure 15**) ce qui indique une complexation de l'euporium par la CaM. Cette complexation s'explique par la déprotonation progressive des acides aminés qui participent à la complexation du métal.

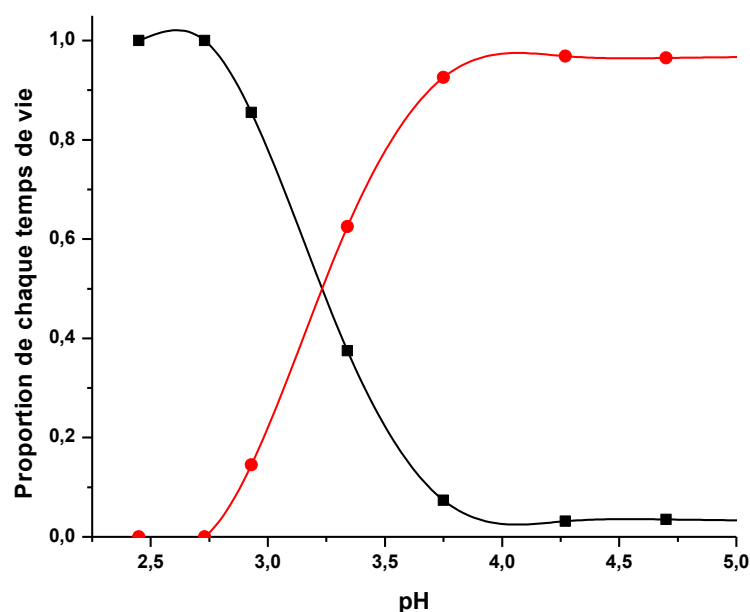


Figure 16 : Évolution de la proportion des temps de vie (rapport des intensités de fluorescence) des espèces d'euporium en fonction du pH

Grâce à une étude résolue en temps qui a également été menée (**Figure 16**), on peut confirmer l'hypothèse formulée précédemment, on voit que la proportion d'euporium libre décroît à partir de pH 2,5 et on constate une augmentation parallèle de la proportion du temps de vie de $430 \pm 20 \mu\text{s}$ qui est attribué au complexe formé avec la CaM. Au-delà de pH 3,5 la totalité de l'euporium est complexé par la protéine et il n'y a pas de changement spectral jusqu'à pH 7,5. Les expériences à venir peuvent donc être menées à pH physiologique sans qu'il n'y ait d'interférence. L'augmentation du temps de vie de l'euporium suggère une diminution de la quantité de molécule d'eau présente dans la sphère de coordination du cation ce qui est cohérent avec une complexation de l'euporium par la protéine.

$$n_{H_2O} = \frac{1,07}{\tau} (Eu) - 0,62$$

La formule précédente avec τ (ms) qui correspond au temps de vie mesuré du complexe d'euporium nous permet de calculer le nombre de molécules d'eau présente dans la sphère de coordination de l'euporium. On trouve un $n_{H_2O} = 1,8$ soit deux molécules d'eau dans la sphère de coordination du métal. L'euporium étant un ion sphérique ayant quasiment le même rayon ionique que le calcium, il est supposé utiliser le même site de complexation que le calcium comme c'est le cas pour le Pu^{3+} qui remplace le calcium dans la CaM lors d'une contamination (31). Les mêmes acides aminés sont donc certainement impliqués lors de la complexation de l'euporium que lors de la complexation du calcium. L'ion calcium possédant un nombre de coordination de 7 quand complexé à la calmoduline (une molécule d'eau incluse), cela peut confirmer que le site occupé est le même et qu'une molécule d'eau supplémentaires vient compléter la sphère de coordination et satisfaire la coordinance de 8 de l'ion euporium.

4. Conclusion

Ce chapitre a présenté les premiers résultats obtenus lors de cette thèse. Ils démontrent une affinité importante de la calmoduline pour les ions actinyles suggérant qu'ils ont la possibilité d'entrer en compétition avec le calcium pour l'occupation des sites de complexation de la protéine malgré leurs différences structurales avec l'ion divalent.

La combinaison des calculs DFT aux mesures EXAFS a permis la caractérisation de la sphère de coordination des métaux dans le site de complexation de la protéine. Cette approche expérimentale/théorique s'est révélée très intéressante pour comparer les propriétés de coordination des métaux en solution ainsi que l'influence du pH sur la sphère de coordination du métal et la stabilité des complexes.

Les modèles structuraux ont été construits en accord avec les données thermodynamiques et structurales connues. Les modèles obtenus après optimisation par DFT ont ensuite été utilisés pour l'ajustement des données EXAFS. Les résultats obtenus suite à l'étude de la structure fine du complexe d'uranyle montrent que le métal est complexé par un carboxylate bidenté, un carboxylate monodenté et un carbonyle. La sphère de coordination est complétée soit par une molécule d'eau (à pH 3) ou un groupe OH^- (à pH 6) en fonction du pH auquel les échantillons ont été préparés.

Bien que les données EXAFS obtenues pour le neptunyle aient mené à des résultats similaires (distances métal-oxygène légèrement supérieures), on n'observe pas de changement dans la sphère de coordination lors de l'augmentation du pH et une molécule d'eau vient compléter la sphère de coordination du neptunyle quel que soit le pH de l'échantillon mesuré. La faible proportion de neptunyle hydrolysé à pH 9 explique probablement les résultats semblables obtenus dans les deux cas.

La capacité de la calmoduline à former un complexe avec l'uranyle hydrolysé peut s'expliquer par la charge supérieure (+2) de l'oxo-cation. Même lorsqu'hydrolysé l'uranyle possède toujours une charge positive et est donc capable de se lier à la protéine. N'ayant qu'une seule charge positive, le neptunyle hydrolysé, qui serait

neutre, peut difficilement former un complexe dans les conditions de notre étude. Cette hypothèse est soutenue par les énergies de liaison obtenues lors des calculs DFT. La charge des ions est donc essentielle à la compréhension de la complexation des actinyles par la CaM.

Les énergies de liaison calculées pour les différents modèles construits confirment la plus grande stabilité des complexes avec la molécule d'eau dans leur sphère de coordination. Lorsque nous comparons la stabilité des complexes présents à pH physiologique (i.e. le complexe d'uranyle possédant un groupement OH^- dans sa sphère de coordination et celui de neptunyle possédant une molécule d'eau) on remarque que, étonnamment, le complexe de neptunyle est celui possédant l'énergie de liaison la plus faible et est donc par conséquent plus stable que le complexe CaM-uranyle. Les comparaisons inter-système sont cependant difficiles puisque le potentiel de chaque ion métallique n'est pas défini de la même manière et peut ainsi causer les légères différences observées. Il est généralement plus sage de s'en tenir aux comparaisons avec un métal donné (i.e. comparaison de stabilité entre les deux systèmes de l'uranyle proposés).

L'uranyle et le neptunyle n'étant pas les seuls métaux toxiques susceptibles d'être rejeté lors d'un accident nucléaire, une étude d'affinité portant sur les actinides trivalent a également été menée (en utilisant un homologue non radioactif de l'américium : l'euporium). Les données de fluorescence obtenues démontrent une affinité importante de ce métal pour la CaM comme précédemment reporté (32). De plus n'étant que faiblement sensible à l'hydrolyse, le métal reste totalement complexé entre pH 4 et pH 7,5 ce qui est dans la zone d'intérêt pour des études en condition physiologiques.

La complexation de ces métaux toxiques étant maintenant avérée et leur sphère de coordination connue, le prochain chapitre décrira les effets de cette complexation sur les fonctions de la calmoduline. Les expériences seront menées à la fois sur les ions actinyles mais également sur l'euporium. La structure différente de l'euporium (sphérique pour l'euporium et structure en bâtonnet pour les ions actinyles) devrait engendrer une action différente de l'ion sur la structure de la protéine et sur sa

propension à intervenir dans les réactions enzymatiques ayant lieu dans le corps humain.

Références bibliographiques : Chapitre 2

1. R. Pardoux *et al.*, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS ONE*.**7**, e41922 (2012).
2. V. Eliet, G. Bidoglio, N. Omenetto, L. Parma, I. Grenthe, Characterisation of hydroxide complexes of uranium(VI) by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.***91**, 2275 (1995).
3. V. Eliet, I. Grenthe, G. Bidoglio, Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence of Uranium(VI) Hydroxo-Complexes at Different Temperatures. *Appl. Spectrosc.***54**, 99–105 (2000).
4. B. Drobot *et al.*, Combining luminescence spectroscopy, parallel factor analysis and quantum chemistry to reveal metal speciation – a case study of uranyl(VI) hydrolysis. *Chem Sci.* **6**, 964–972 (2015).
5. C. Moulin, P. Decambox, V. Moulin, J. G. Decaillon, Uranium Speciation in Solution by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Anal. Chem.***67**, 348–353 (1995).
6. C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation. *Appl. Spectrosc.***52**, 528–535 (1998).
7. A. Kirishima, T. Kimura, O. Tochiyama, Z. Yoshida, Speciation study on uranium(VI) hydrolysis at high temperatures and pressures. *J. Alloys Compd.***374**, 277–282 (2004).
8. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*.**43**, 1739–1753 (1996).
9. L. Soderholm, M. R. Antonio, C. Williams, S. R. Wasserman, XANES Spectroelectrochemistry: A New Method for Determining Formal Potentials. *Anal. Chem.***71**, 4622–4628 (1999).
10. Z. Yoshida, S. G. Johnson, T. Kimura, J. R. Krsul, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 699–812.
11. O. Nemirovskiy, D. E. Giblin, M. L. Gross, Electrospray ionization mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange for probing the interaction of calmodulin with calcium. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***10**, 711–718 (1999).
12. O. Pible, C. Vidaud, S. Plantevin, J.-L. Pellequer, E. Quéméneur, Predicting the disruption by UO₂₂₊ of a protein-ligand interaction. *Protein Sci.***19**, 2219–2230 (2010).

13. G. Montavon, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, U. Repinc, A. Morgenstern, 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).
14. F. Brulfert *et al.*, Structural Environment and Stability of the Complexes Formed Between Calmodulin and Actinyl Ions. *Inorg.Chem.***55**, 2728–2736 (2016).
15. S. Safi *et al.*, Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem. – Eur. J.***19**, 11261–11269 (2013).
16. S. Safi *et al.*, in *Actinides and Nuclear Energy Materials*, D. Anderson et al., Eds. (Materials Research Soc, Warrendale, 2012), vol. 1444, pp. 199–209.
17. H. A. Thompson, G. E. Brown, G. A. Parks, XAFS spectroscopic study of uranyl coordination in solids and aqueous solution. *Am. Mineral.***82**, 483–496 (1997).
18. S. D. Kelly *et al.*, X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions. *Geochim.Cosmochim.Acta.***66**, 3855–3871 (2002).
19. P. G. Allen *et al.*, EXAFS Determinations of Uranium Structures: The Uranyl Ion Complexed with Tartaric, Citric, and Malic Acids. *Inorg.Chem.***35**, 784–787 (1996).
20. D. L. Clark *et al.*, Chemical Speciation of the Uranyl Ion under Highly Alkaline Conditions. Synthesis, Structures, and Oxo Ligand Exchange Dynamics. *Inorg.Chem.***38**, 1456–1466 (1999).
21. S. Skanthakumar, M. R. Antonio, L. Soderholm, A Comparison of Neptunyl(V) and Neptunyl(VI) Solution Coordination: The Stability of Cation–Cation Interactions. *Inorg.Chem.***47**, 4591–4595 (2008).
22. F. Heberling, B. Brendebach, D. Bosbach, Neptunium(V) adsorption to calcite. *J. Contam. Hydrol.***102**, 246–252 (2008).
23. K. Balasubramanian, Z. Cao, Theoretical Studies on Structures of Neptunyl Carbonates: $\text{NpO}_2(\text{CO}_3)_m(\text{H}_2\text{O})_n$ ($m = 1-3$, $n = 0-3$) in Aqueous Solution. *Inorg.Chem.***46**, 10510–10519 (2007).
24. J. Zeng *et al.*, A computational study on the complexation of Np(V) with N,N,N',N'-tetramethyl-3-oxa-glutaramide (TMOGA) and its carboxylate analogs. *Phys. Chem. Chem. Phys.***16**, 16536 (2014).
25. S. Sachs *et al.*, EXAFS study on the neptunium(V) complexation by various humic acids under neutral pH conditions. *Radiochim Acta.***Radiochim.Acta.****93**, 17–25 (2005).
26. W. H. Runde, W. W. Schulz, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010; http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0211-0_8), pp. 1265–1395.

27. C. N. P. L. Manuel Sturzbecher-Hoehne, 3,4,3-LI(1,2-HOPO): In vitro formation of highly stable lanthanide complexes translates into efficacious in vivo europium decorporation. *Dalton Trans. Camb.Engl.* 2003.**40**, 8340–6 (2011).
28. C. Moulin *et al.*, Europium complexes investigations in natural waters by time-resolved laser-induced fluorescence. *Anal.Chim.Acta.***396**, 253–261 (1999).
29. G. Planckue, V. Moulin, P. Toulhoat, C. Moulin, Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence. *Anal.Chim.Acta.***478**, 11–22 (2003).
30. T. Kimura, R. Nagaishi, Y. Kato, Z. Yoshida, Luminescence study on solvation of americium(III), curium(III) and several lanthanide(III) ions in nonaqueous and binary mixed solvents. *Radiochim.Acta Int. J. Chem. Asp.Nucl.Sci. Technol.***89**, 125 (2009).
31. P. A. Seeger *et al.*, Neutron Resonance Scattering Shows Specific Binding of Plutonium to the Calcium-Binding Sites of the Protein Calmodulin and Yields Precise Distance Information. *J. Am. Chem. Soc.***119**, 5118–5125 (1997).
32. Y.-Y. Song *et al.*, Biological effects of rare earth protein complexes: Influence of lanthanide ions Eu^{3+} , Tb^{3+} on secondary structure of calmodulins. *Biospectroscopy.* **5**, 371–377 (1999).

Chapitre 3 : Effets des actinides sur les fonctions de la calmoduline

Chapitre 3

1. Suivi d'une réaction enzymatique en présence d'An	123
1.1. La phosphodiesterase.....	123
1.2. Mise au point de la méthode calorimétrique.....	125
1.3. Effet de l'uranium sur l'activité enzymatique	129
1.4. Effet du neptunium sur l'activité enzymatique	133
1.5. Effet des actinides trivalents sur l'activité enzymatique	136
2. Étude spectroscopique des complexes CaM-An.....	139
2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier	139
2.2. Spectroscopie Raman	142
2.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	143
3. Chélation des ions actinyles.....	146
3.1. Etude de l'effet du 5-LIO(Me-3,2-HOPO) sur la réaction enzymatique	146
3.2. Complexation des actinyles par le 5-LIO(Me-3,2-HOPO)	147
3.3. Réversibilité de l'inhibition.....	149
4. Conclusion.....	152

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la calmoduline possède une affinité importante pour les actinides. Les trois métaux considérés lors de cette thèse (europium, uranyle, neptunyle) ayant des rayons et des propriétés différents du calcium on peut s'attendre à ce que les fonctions de la CaM soient affectées et que les métaux soient à l'origine de troubles pour l'organisme. La calmoduline est impliquée dans un très grand nombre de processus enzymatiques et la complexation de métaux toxiques peut, entre autres, impacter les interactions protéine-enzyme. Afin de déterminer de quelle manière la présence d'actinide peut affecter les propriétés de la protéine une méthode calorimétrique (ITC : isothermal titration calorimetry) a été développée en utilisant la phosphodiesterase comme enzyme de référence. Cette enzyme fonctionne également en absence de la calmoduline(1, 2), mais elle voit son activité multipliée par un facteur trois en présence du complexe protéine-calcium(2-5). La réaction enzymatique produit de la chaleur et peut ainsi être suivie par calorimétrie(6, 7). L'expérience sera également réalisée en présence et en absence des trois métaux étudiés. Plusieurs concentrations d'actinide seront utilisées afin d'étudier leurs effets sur la réaction enzymatique choisie.

Des études spectroscopiques (DLS, IR, Raman) seront ensuite menées afin d'expliquer les résultats obtenus par ITC. La DLS (Dynamic Light Scattering) permettra de déterminer la taille de la protéine après complexation des différents métaux étudiés (uranyle, neptunyle, calcium). La spectroscopie infrarouge et Raman auront quant à elle pour objectif d'étudier les différences de structure engendrées par la complexation des ions actinyles par la CaM.

Une étude supplémentaire visant à investiguer la réversibilité des effets causés par les actinides sur la calmoduline et les réactions enzymatiques qui lui sont associées sera menée en utilisant un ligand chélatant (5-LIO(Me-3,2-HOPO)). Ce ligand fait actuellement l'objet d'études afin de déterminer sa viabilité en tant que décorporant *in vivo*. Son affinité élevée pour les actinides et sa faible affinité pour les métaux divalents tels que le calcium et le magnésium en font un ligand parfaitement adapté à notre système.

Le neptunium étant un élément hautement radioactif, il n'a pas pu être utilisé sur tous les systèmes expérimentaux si ceux-ci ne répondaient pas aux normes nécessaires à l'utilisation de matériel radioactif (spectromètre Raman).

1. Suivi d'une réaction enzymatique en présence d'An

1.1. La phosphodiesterase

La calmoduline a la possibilité d'interagir avec un grand nombre de molécules protéiques et d'enzymes et par là même de régir de nombreuses fonctions essentielles au bon fonctionnement du corps humain. La phosphodiesterase (PDE) est l'une des enzymes fonctionnant en binôme avec la CaM qui a fait l'objet du plus d'études (8-10). La phosphodiesterase (~ 60 - 70 kDa) fait partie d'un large groupe d'enzyme qui permet de réguler les signaux intracellulaire des molécules cAMP et cGMP en les convertissant respectivement en 5'AMP et 5'GMP(4). Tout comme la CaM cette enzyme est présente de manière ubiquitaire dans un grand nombre d'organismes tels que les mammifères et autres eucaryotes(11-14). La superfamille des phosphodiesterases comporte 11 membres ayant chacun des variantes. Malgré cette hétérogénéité, il y a un surprenant degré de ressemblance dans leurs domaines catalytiques. Cependant, les légères différences qui existent déterminent si la PDE réagit spécifiquement avec le cAMP (PDE4, PDE7, PDE8), le cGMP (PDE5, PDE6, PDE9) ou si elle réagit avec les deux (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11). En revanche, un seul membre de la famille des PDE a la possibilité d'interagir avec la CaM : PDE1 (2).

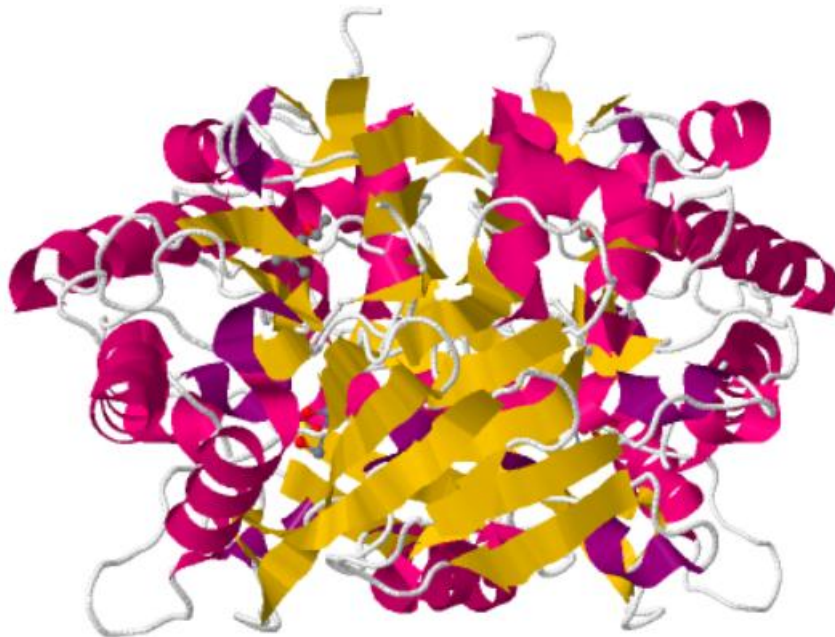
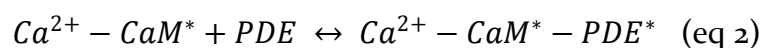
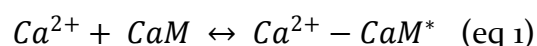


Figure 1 : Structure de la phosphodiesterase PDE1 (PDB 4OJV(10))

La PDE₁ a été identifiée pour la première fois en 1970 dans le cerveau du rat en compagnie de la calmoduline(5) et a fait l'objet de nombreuses études(5, 8, 15, 16). La sous famille PDE₁ est composée de trois variantes (PDE₁A, PDE₁B et PDE₁C)(15-19). Chacune de ces variantes possède des propriétés régulatrices, des activités spécifiques, des distributions tissulaires et des masses moléculaires différentes. Ces isoformes montrent également de larges différences d'affinité pour la CaM, ce qui souligne également leur différence de sensibilité pour le calcium. Malgré cette hétérogénéité, la structure globale de ces isoformes est similaire. Ils sont tous constitués de quatre domaines : deux domaines responsables de l'interaction avec la CaM, un domaine responsable de l'interaction avec les inhibiteurs et un domaine catalytique(1).

Afin de comprendre comment le complexe CaM-Ca active l'enzyme, il est nécessaire de considérer la manière dont la complexation du Ca affecte la structure de la calmoduline. La complexation de quatre calciums par la CaM pousse la protéine à non seulement changer de conformation (Chapitre 1) mais augmente également sa flexibilité et ainsi son affinité pour la PDE. Ce changement de conformation dévoile une large zone hydrophobe qui lui permet de former des liaisons de Van der Waals forte avec la protéine cible(20, 21).

En l'absence du couple CaM-Ca dans le milieu d'étude, la PDE₁ est auto-inhibée comme c'est le cas pour beaucoup d'enzymes régulées par la calmoduline(22-24). L'enzyme est donc maintenue dans un état de faible activité en l'absence de calcium et l'activité enzymatique maximale est restaurée par la présence de CaM-Ca(1). La suppression de l'auto inhibition fait passer l'enzyme dans un état de haute activité et accroît son affinité pour son substrat (soit le cAMP soit le cGMP). Les différentes étapes sont résumées dans les équations ci-dessous (les conformations actives sont marquées d'une étoile) :



Lors de la réaction enzymatique, la liaison phosphodiester de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) est hydrolysée par la PDE₁ pour former l'adénosine monophosphate (**Figure 2**).

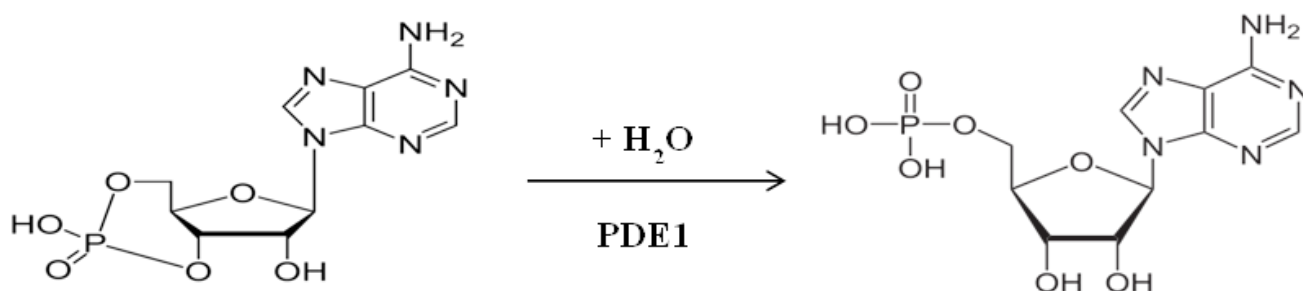


Figure 2 : Hydrolyse de l'adénosine monophosphate cyclique par la PDE1

Dans le cas de l'utilisation d'une méthode de détection UV-vis, l'addition d'une seconde enzyme est nécessaire (5' nucleotidase (venin de crotale)) pour séparer le groupement PO_4 de l'adénosine monophosphate. Une analyse UV-vis permet alors de mesurer la concentration de PO_4 en solution et ainsi de remonter à l'activité enzymatique. Cette méthode présente toutefois plusieurs inconvénients majeurs. Le premier est le nombre de solutions et d'analyses nécessaires pour réaliser une étude complète et le second est l'erreur sur les résultats obtenus avec cette méthode (dilutions successives, utilisation de plusieurs enzymes, et mesure indirecte de l'activité).

1.2. Mise au point de la méthode calorimétrique

L'analyse par UV-visible ne pouvant pas être utilisée ici, une autre méthode doit donc être employée afin d'obtenir des résultats plus fiables. La réaction menant à la rupture de la liaison P-O par l'enzyme étant exothermique (production de chaleur), l'ITC semble donc être une méthode tout indiquée pour le suivi de l'activité enzymatique. De plus, la mesure de la chaleur développée par la réaction enzymatique est une mesure directe qui nous permet d'augmenter la fiabilité des données obtenues.

La valeur directement mesurée par l'appareil est le flux de chaleur ($\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$), développée par l'hydrolyse du substrat (**Figure 3**), qui est directement proportionnel à la cinétique de la réaction. Pour calculer la cinétique de la réaction, l'enthalpie de la réaction (ΔH_r) et le volume de la cellule de mesure (V) sont nécessaires. L'enthalpie de la réaction est calculée en mesurant la chaleur totale libérée et le nombre de moles qui sont converties de substrat en produit :

$$\Delta H_r = \frac{1}{n_{sub}} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ}{dt} dt$$

Où n_{sub} est le nombre de moles de substrat convertit en produit et dQ/dt est la puissance générée. La valeur mesurée de ΔH_r est de -57 kJ.mol^{-1} ce qui est proche des valeurs précédemment reportées dans la littérature (6, 7).

Ainsi, la mesure de la puissance thermique générée par l'enzyme permet le calcul de la cinétique de réaction (R) :

$$R = \frac{1}{V * \Delta H_r} \frac{dQ}{dt}$$

Comme évoqué au début de ce chapitre, l'enzyme est active, bien qu'inhibée, en absence de calmoduline et de calcium. La première étape de cette étude consistera donc à nous placer dans les conditions optimales à l'obtention de la plus grande quantité de chaleur, et donc de signal, lors du suivi de la réaction enzymatique. L'ajout de la calmoduline dans le milieu réactionnel est supposé entraîner une augmentation significative de l'activité enzymatique (augmentation d'un facteur compris entre 2,5 et 3).

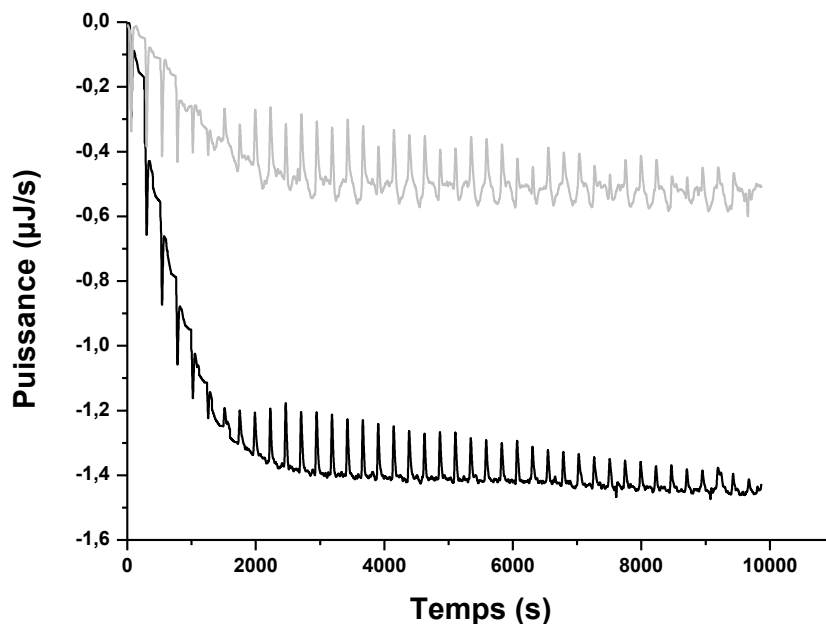


Figure 3 : Données brutes de l'hydrolyse du cAMP par la PDE1 (2 nM) avec la CaM (160 nM) (ligne noire) et sans la CaM (ligne grise)

Le changement de puissance thermique relevée par l'appareil après chaque addition de substrat indique une augmentation de l'activité enzymatique (**Figure 3**). La cinétique de la réaction est obtenue en mesurant la différence entre la ligne de base originale et la nouvelle ligne de base obtenue après une addition de substrat. Les valeurs obtenues sont ensuite corrigées en utilisant l'enthalpie de la réaction et sont reportées en tant que constante catalytique (k_{cat} (s^{-1}) sur la **Figure 4**). L'ensemble des données est ensuite ajusté en utilisant l'équation de Michaelis-Menten (méthode des moindres carrés) afin de déterminer les paramètres cinétiques, k_{cat} et K_M , de la réaction enzymatique :

$$R = \frac{k_{cat} * [E_{Tot}] * [S]}{K_M + [S]}$$

Avec $[S]$ correspondant à la concentration de substrat, K_M représentant la constante de Michaelis-Menten, $[E]$ la concentration en enzyme et k_{cat} la constante catalytique.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_{Tot}]}$$

La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la concentration en cAMP suit l'équation cinétique de Michaelis-Menten comme le montre la **Figure 4** (Augmentation de l'activité enzymatique à la suite des additions de substrat). Les valeurs de concentrations de l'enzyme et du substrat ont été corrigées en prenant en compte la dilution causée par les injections successives de substrat.

Plusieurs études préliminaires ayant pour but de déterminer les conditions optimales ont été nécessaires pour mener à bien ces investigations. Les concentrations en calcium (10 μ M) et magnésium (1 mM) ont été choisies pour leur proximité avec les concentrations intracellulaires. La concentration en enzyme très faible (2 nM) s'explique par les contraintes imposées à la fois par l'ITC et par les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique. La concentration en calmoduline (160 nM) est l'une des variables les plus importantes à prendre en compte. En effet, si la concentration est trop faible, l'activation de l'enzyme ne sera pas totale, mais si la concentration est trop élevée les quatre sites de la protéine ne seront pas occupés par

le calcium et par conséquent la CaM ne sera pas dans sa conformation active. Les différents tests menés pour définir les conditions idéales sont détaillés en annexe.

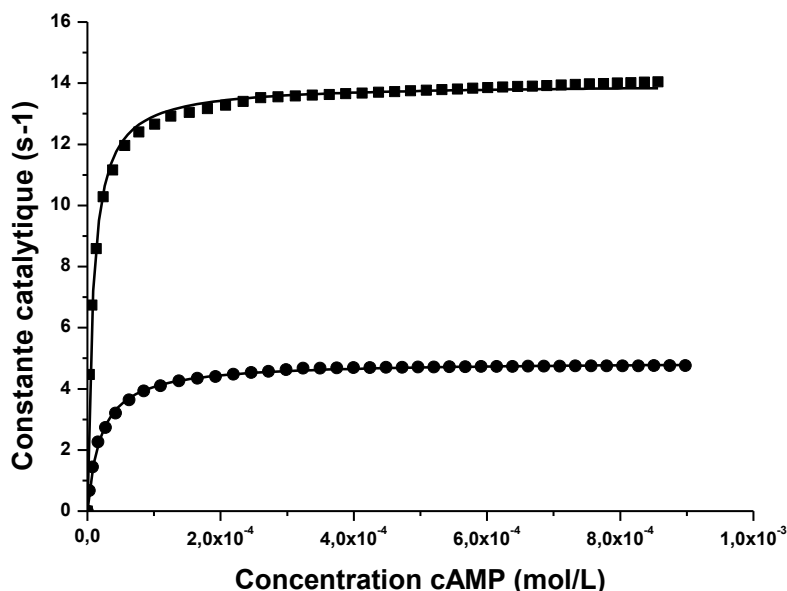


Figure 4 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM (■) et sans CaM (●), pH 7.4 ;
T=30°C.

	Sans CaM	Avec CaM
K_M (μM)	$20,3 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,2$
k_{cat} (s^{-1})	$4,9 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,3$

Tableau 1 : paramètres cinétiques obtenus avec et sans la calmoduline en solution

Lorsqu'ajoutée dans les bonnes proportions, la calmoduline augmente l'activité enzymatique d'un facteur de $\sim 2,8$, ce qui est similaire aux valeurs reportées dans la littérature pour les phosphodiesterases activées par la CaM (4). Les paramètres cinétiques suivants ont été obtenus sans la CaM : $k_{\text{cat}} = 4,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ et $K_M = 20,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Comme évoqué, l'ajout de la calmoduline augmente sensiblement l'activité enzymatique de la PDE1, ceci est reflété par les paramètres cinétiques : $k_{\text{cat}} = 14,0 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ et $K_M = 8,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Comme mentionné au début de ce chapitre, de nombreuses variantes de la PDE1 existent, chacune de ces variantes de l'enzyme possède ses paramètres cinétiques propres. Néanmoins, les valeurs obtenues ici sont dans la gamme attendue pour une PDE1 (2, 4). La diminution de la constante de Michaelis-

Menten lors de l'ajout de la CaM dans le milieu indique une meilleure réactivité de l'enzyme. En effet, ceci montre qu'une concentration moindre en substrat est nécessaire pour atteindre l'activité enzymatique maximale. Ces valeurs serviront de référence pour les expériences à venir et seront comparées à celles obtenues lors de l'ajout d'actinide dans le milieu d'étude.

1.3. Effet de l'uranium sur l'activité enzymatique

L'étude préliminaire d'ultrafiltration montre une occupation moyenne de 2,6 sites sur quatre par l'uranyle dans la protéine. Bien que tous les sites de complexation ne soient pas remplis, cette complexation peut avoir un effet sur les réactions enzymatiques dans lesquelles la calmoduline est impliquée. Les effets de la présence d'uranyle dans le milieu seront étudiés ici, et particulièrement les effets de l'ion sur l'activité enzymatique et les paramètres cinétiques comme K_M et k_{cat} . Il a été démontré dans le chapitre précédent qu'il y a compétition entre les ions actinyles et le calcium pour l'occupation des sites de complexation de la CaM. Le remplacement du calcium par l'uranyle peut donc avoir des effets à la fois sur la protéine mais aussi sur la réaction enzymatique dans laquelle elle est impliquée.

Avant d'évaluer l'effet de la compétition entre l'uranyle et le calcium pour l'occupation des sites de la protéine, il est important de vérifier que l'uranyle n'a pas d'impact direct sur l'enzyme. Afin d'exclure un possible effet du métal sur l'enzyme, l'expérience a été réalisée en absence de calmoduline mais en présence d'uranyle à une concentration de 500 nM. Comme le montre la **Figure 5**, on constate que l'ajout d'uranyle à la solution ne modifie ni l'activité enzymatique ni les paramètres cinétiques associés à l'enzyme (**Tableau 2**). L'uranyle n'a donc pas d'impact direct sur la PDE1, n'inhibe pas l'enzyme ni ne semble interagir avec.

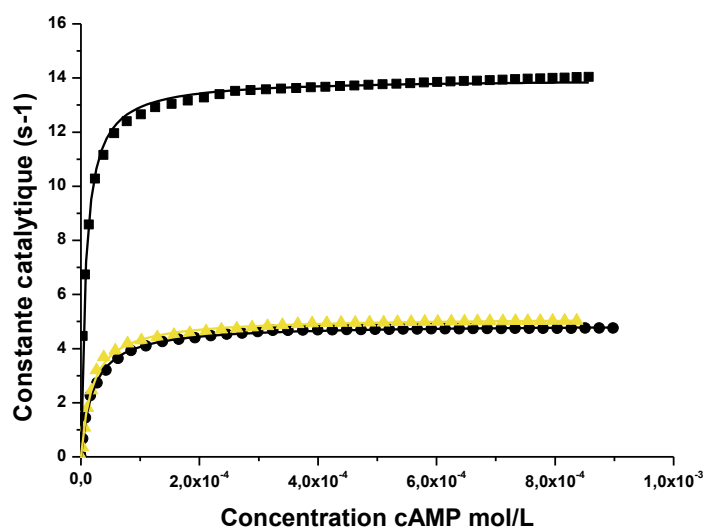


Figure 5 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM(■), avec l'enzyme seule (●) et avec l'enzyme seule en présence d'uranyle (▲), pH 7.4 ; T=30°C.

	Avec CaM	Enzyme seule	Enzyme + U (500 nM)
K_M (μM)	8,1 ± 0,2	20,3 ± 0,4	19,7 ± 0,4
k_{cat} (s ⁻¹)	14,0 ± 0,3	4,9 ± 0,1	5,1 ± 0,2

Tableau 2 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence d'uranyle

En revanche, lorsque l'ajout de l'uranyle se fait en présence de calmoduline on constate une diminution progressive de l'activité enzymatique (constante catalytique) parallèle à l'augmentation de la concentration en uranyle (**Figure 6**). Il semble donc que la substitution du calcium par l'uranyle dans certains sites de complexation de la CaM ait pour effet de diminuer l'activité enzymatique. Une fois l'uranyle complexé par la calmoduline, celle-ci, au lieu d'activer la réaction enzymatique semble l'inhiber. Le complexe CaM-uranyle agit comme un poison à l'égard de la réaction enzymatique. De plus, l'expérience réalisée avec la concentration la plus élevée en uranyle dévoile une activité enzymatique encore plus faible que celle obtenue avec l'enzyme seule, ce qui implique que non seulement le complexe CaM-uranyle n'est pas capable d'activer l'enzyme mais surtout que ce complexe l'empêche de fonctionner correctement (inhibition) et a une action toxique sur l'activité enzymatique. Les valeurs des constantes cinétiques pour les différentes expériences (**Tableau 2**) démontrent bien l'aspect nocif de l'uranyle dans les cas étudiés.

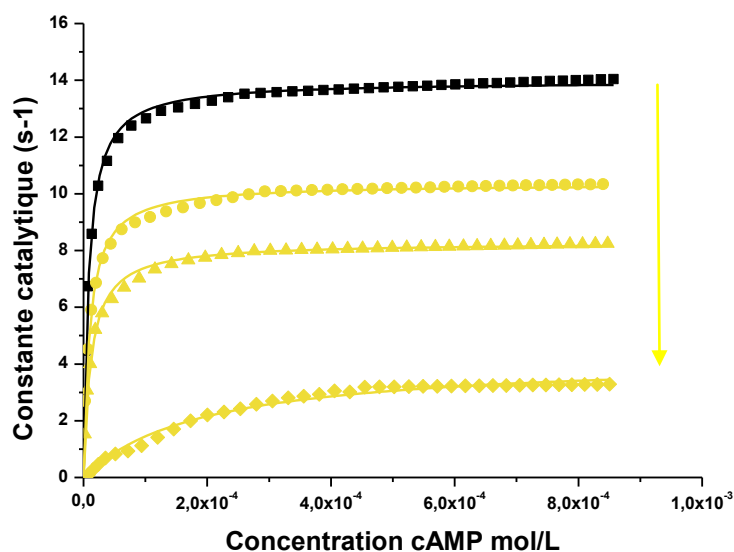


Figure 6 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante d'uranium. 0 nM (■), 50 nM (●), 100 nM (▲), 500 nM (◆). pH 7.4 ; T=30°C.

	0 nM Uranyle	50 nM Uranyle	100 nM Uranyle	500 nM Uranyle
K_M (μM)	8.1 ± 0.2	9.9 ± 0.3	11.9 ± 0.4	191.8 ± 12.2
k_{cat} (s^{-1})	14.0 ± 0.3	10.3 ± 0.2	8.3 ± 0.2	4.2 ± 0.2

Tableau 2 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'uranyle

On constate tout d'abord une augmentation du K_M lors de l'ajout d'uranyle dans le milieu, cette augmentation démontre une réactivité de l'enzyme plus faible en présence du métal. La constante augmente faiblement lors des deux premiers tests en présence d'uranium (50 nM et 100 nM). Par contre, à haute concentration, elle augmente radicalement pour atteindre 192 μM . Cette augmentation de la constante de Michaelis-Menten couplée à la baisse de l'activité enzymatique révèle un comportement différent de l'enzyme lorsque le milieu est contaminé par de l'uranyle.

La constante catalytique (k_{cat}), qui représente l'activité enzymatique, diminue également avec l'augmentation de la concentration en uranium. La diminution de l'activité enzymatique n'est cependant pas linéaire (*Figure 7*) ce qui peut s'expliquer par le fait qu'à pH physiologique, l'uranyle forme des hydroxydes (comme $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ ou le $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ (25, 26)) qui ne sont pas biologiquement disponibles et par conséquent incapables d'être complexés par la CaM. Un effet de saturation de la

protéine, qui ne peut complexer que 2,6 uranyle (en moyenne), pourrait également être la cause de cette diminution non linéaire.

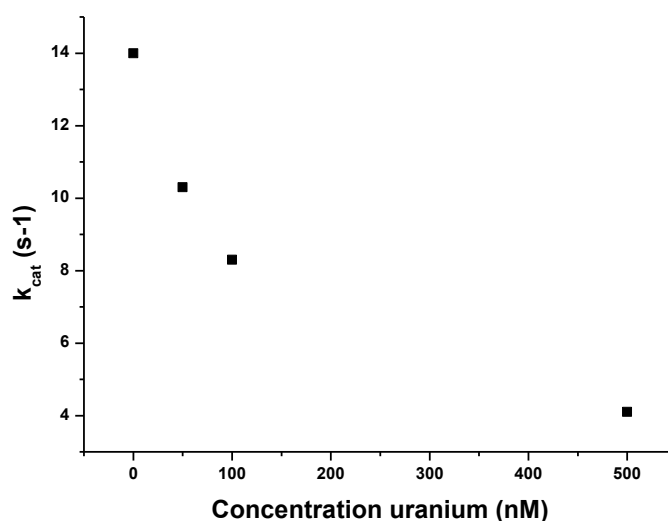


Figure 7 : Activité enzymatique maximale en fonction de la concentration d'uranium en solution

En outre, la spéciation de l'uranyle dépendant également de la concentration du métal en solution, plus la concentration en métal est élevée plus la proportion d'hydroxyde incomplexable est importante ce qui diminue la quantité d'uranyle disponible pour réagir avec la CaM (Voir les diagrammes de spéciation de l'uranyle en Annexe). Cette spécificité au niveau de la spéciation de l'uranyle explique la non linéarité de la diminution de l'activité enzymatique.

Les résultats obtenus lors de cette étude calorimétrique montrent dans un premier temps que l'uranyle bien qu'occupant le même site de complexation que le calcium dans la CaM est incapable d'activer la protéine comme le calcium le fait. L'autre constat important de cette étude est l'observation d'une activité nettement plus faible en présence d'une concentration d'uranium importante (k_{cat} plus faible que celui de l'enzyme seule et K_M beaucoup plus élevé) ce qui démontre que le complexe CaM-uranyle interagit avec l'enzyme mais qu'au lieu de l'activer il l'inhibe davantage.

Les expériences supplémentaires (DLS, IR, Raman) qui seront traitées plus tard dans ce chapitre auront pour objectif de fournir une explication à cette diminution d'activité en étudiant la structure de la protéine après la formation du complexe avec l'uranyle.

1.4. Effet du neptunium sur l'activité enzymatique

Le neptunyle et l'uranyle ont la même structure et il a été démontré dans le chapitre précédent que ces deux ions partagent le même site de complexation que le calcium lorsque complexé par la calmoduline. Tout comme pour l'uranyle il y a compétition entre le neptunyle et le calcium pour l'occupation des sites de complexation de la CaM. Les mêmes analyses calorimétriques ont été menées avec le neptunyle afin de déterminer l'effet du neptunyle sur l'activité enzymatique. Tout comme pour l'uranyle nous avons dans un premier temps vérifié que le neptunyle n'affectait pas directement la réaction enzymatique (**Figure 8**). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec l'uranyle, on constate une activité semblable à celle de l'enzyme seule et un K_M également du même ordre de grandeur. Comme le montre donc les constantes cinétiques (**Tableau 4**) il n'y a pas d'effet négatif du neptunyle sur l'enzyme.

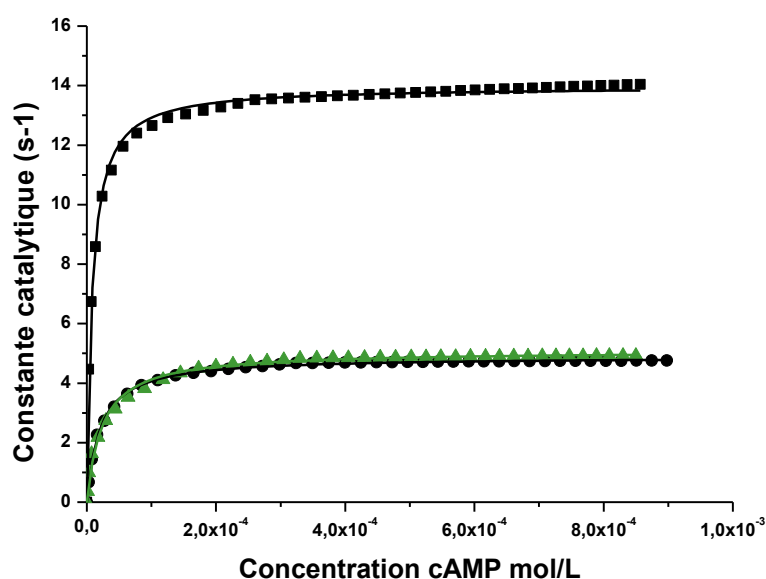


Figure 817 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat, avec CaM(■), avec l'enzyme seule (●) et avec l'enzyme en présence de neptunyle (▲), pH 7.4 ; T=30°C.

	Avec CaM	Enzyme seule	Enzyme + Np (200 nM)
K_M (μM)	$8,1 \pm 0,2$	$20,3 \pm 0,4$	$22,4 \pm 0,5$
k_{cat} (s^{-1})	$14,0 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$

Tableau 4 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence de neptunyle

L'effet de la complexation du neptunyle par la CaM a été étudié en utilisant la même procédure que pour l'uranyle. On observe d'ailleurs des résultats similaires (**Figure 9**). En effet, on constate une diminution de l'activité enzymatique (k_{cat}) lors de l'augmentation de la concentration de neptunyle en solution. En revanche, la perte d'activité enzymatique est bien plus rapide avec le neptunyle et on atteint une très faible activité avec une concentration en actinyle beaucoup plus faible. En effet, lorsque l'expérience est réalisée avec une concentration en neptunyle de 120 nM l'activité enzymatique ($k_{cat} = 2,3 \text{ s}^{-1}$) est déjà en dessous de l'activité de référence pour l'enzyme seule ($k_{cat} = 4,9 \text{ s}^{-1}$). Comme c'était le cas avec l'uranyle, le complexe CaM-neptunyle ne lève pas l'auto-inhibition de la PDE₁ mais l'augmente davantage. La concentration nécessaire pour inhiber complètement l'activité de l'enzyme est plus faible pour le neptunyle que pour l'uranyle indiquant que ce dernier est beaucoup plus toxique vis-à-vis de la réaction enzymatique.

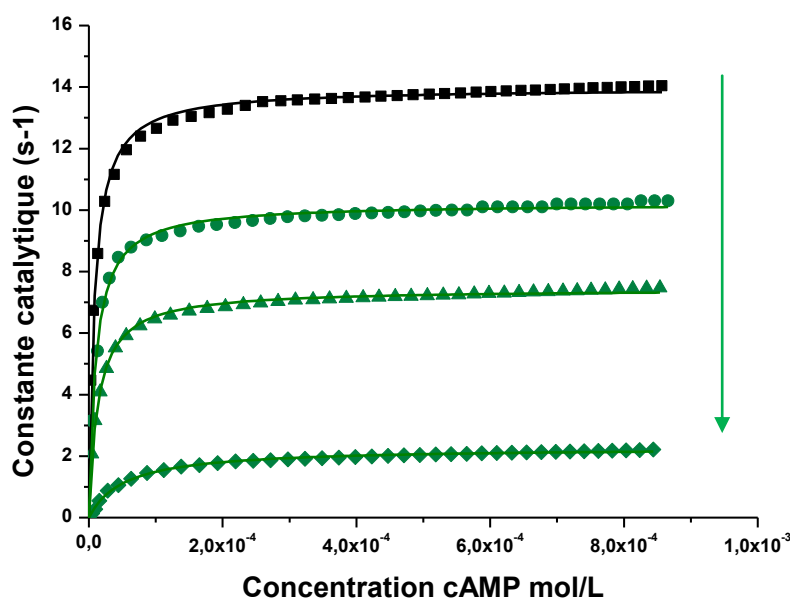


Figure 9 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante de neptunium. 0 nM (■), 30 nM (●), 50 nM (▲), 120 nM (◆). pH 7.4 ; $T=30^{\circ}\text{C}$.

	0 nM	30 nM	50 nM	120 nM
K_M (μM)	$8,1 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,3$	$13,5 \pm 0,3$	$53,0 \pm 3,5$
k_{cat} (s^{-1})	$14,0 \pm 0,3$	$10,2 \pm 0,2$	$7,43 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$

Tableau 5 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'uranyle

Un autre paramètre de comparaison est la constante de Michaelis-Menten. On constate qu'elle augmente également lors de l'ajout de neptunyle à la solution. L'augmentation est moins spectaculaire qu'avec l'uranyle, cependant, la valeur de K_M atteint 53 μM pour l'expérience réalisée avec une concentration de neptunyle de 120 nM ce qui est 2,5 fois plus élevé que la valeur de K_M obtenue pour l'enzyme seule ($K_M = 20,3 \mu\text{M}$). Cette augmentation de la constante de Michaelis-Menten démontre la baisse de réactivité de l'enzyme et un comportement différent de celle-ci suite à l'ajout du neptunyle.

Les résultats reportés sur la **Figure 8** démontrent que l'enzyme n'est pas affectée directement par la présence du neptunyle, mais que, tout comme pour l'uranyle c'est le complexe CaM-An qui a un effet toxique sur la réaction enzymatique et non pas l'ion actinyle seul.

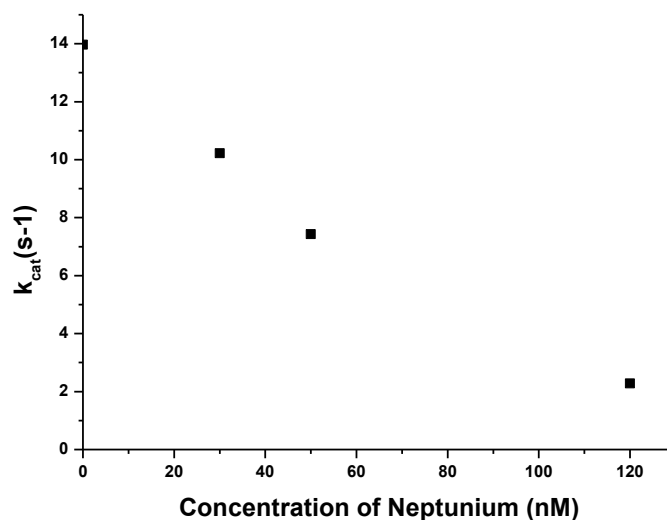


Figure 10 : Activité enzymatique maximale en fonction de la concentration en neptunyle dans le milieu

Contrairement à l'expérience réalisée en présence d'uranyle qui nous a montré une diminution non-linéaire de l'activité enzymatique (**Figure 7**), pour le neptunyle,

l'activité enzymatique diminue de manière quasi-linéaire (**Figure 10**). Contrairement à l'uranyle, le neptunyle ne s'hydrolyse pas à pH 7,4, par conséquent, la totalité du métal présent en solution est disponible à la complexation et à concentration égale une quantité de neptunyle plus importante peut participer à la compétition avec le calcium. Ceci peut expliquer pourquoi une quantité inférieure de neptunium est nécessaire pour inhiber complètement la réaction enzymatique.

Les différences de spéciation à pH physiologique pour les deux métaux rendent les résultats difficiles à comparer. Les expériences mettant en jeu de l'uranyle pourraient être menées à plus bas pH pour augmenter la quantité d'uranyle disponible à la complexation, cependant, l'activité enzymatique étant elle aussi dépendante du pH les résultats ne seraient toujours pas comparables. Malgré les inconvénients évoqués, il a toutefois été décidé de mener toutes les expériences à pH physiologique (pH = 7,4) pour s'approcher le plus possible des conditions réelles d'une contamination interne.

La conformation et la structure de la calmoduline après complexation du neptunyle seront étudiées plus tard dans ce chapitre afin de déterminer l'impact du métal sur les fonctions de la protéine. Ces analyses spectroscopiques pourront nous donner des informations sur les raisons de la baisse d'activité constatée lors de l'étude ITC et nous permettre également de valider les hypothèses formulées jusqu'alors.

1.5. Effet des actinides trivalents sur l'activité enzymatique

Comme lors de l'étude SLRT, l'américium ne pouvant pas être utilisé dans les conditions de notre étude, c'est son homologue, l'euprium qui sera étudié.

Il a déjà été prouvé que les lanthanides trivalents étaient capables de remplacer le calcium dans les sites de complexation de la calmoduline(27–29). L'euprium contrairement à l'uranyle et au neptunyle est sphérique et est ainsi similaire au calcium (même rayon ionique). Une action différente de celle des actinyles précédemment étudiés est donc attendue. Des analyses enzymatiques utilisant une détection UV-visible ont déjà été menées et les résultats reportés dans la littérature suggèrent une activation de la PDE₁ par le complexe CaM-Eu(27). Cependant comme mentionné au début de ce chapitre, la précision des résultats des études enzymatiques couplées à la détection UV-visible est médiocre. Les expériences ont donc été réalisées en utilisant la

méthode calorimétrique développée pour l'analyse des actinides et les résultats seront reportés ici. Pour cette première étude, le calcium est absent de la solution et il est remplacé par l'euporium à une concentration de 800 nM afin de vérifier que le complexe formé entre la CaM et Eu^{3+} est capable d'activer la PDE₁ de la même manière que le calcium (*Figure 11*).

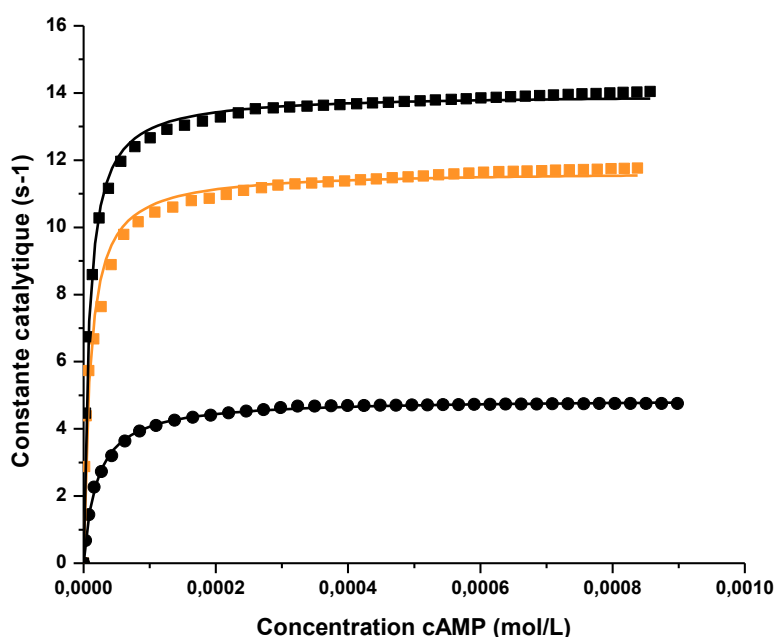


Figure 11 : Activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Avec CaM et Ca (■), enzyme seule (●) et avec CaM et Eu (■).

	CaM + Ca	Enzyme seule	Sans Ca, avec Eu (800 nM)
K_M (μM)	$8,1 \pm 0,2$	$20,3 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,3$
k_{cat} (s^{-1})	$14,0 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,4$

Tableau 6 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la CaM et le Ca, avec l'enzyme seule et avec l'enzyme en présence d'euporium

Les résultats démontrent que l'euporium est capable d'activer l'enzyme en formant un complexe avec la CaM, cependant, les constantes cinétiques sont légèrement différentes de celles obtenues avec le Ca (*Tableau 6*). L'augmentation de l'activité par rapport à l'enzyme seule démontre que la présence d'euporium mène à l'activation de l'enzyme, cependant, le k_{cat} ($11,9 \text{ s}^{-1}$) légèrement plus faible ainsi que le K_M légèrement plus élevé démontrent que le complexe CaM-Eu n'active pas aussi bien l'enzyme que le calcium. Les données disponibles dans la littérature donnent des résultats légèrement différents, en effet, si une activation de la PDE₁ est également

observée lors de l'ajout de l'euporium, l'activité semble être légèrement supérieure à celle observée en présence de calcium(27). Les conditions de l'étude menée par *Song et al.* sont légèrement différentes. De plus, la mesure de l'activité enzymatique étant réalisée *via* une analyse UV-visible de la concentration en phosphate, l'erreur sur le résultat reportée par leur étude est importante.

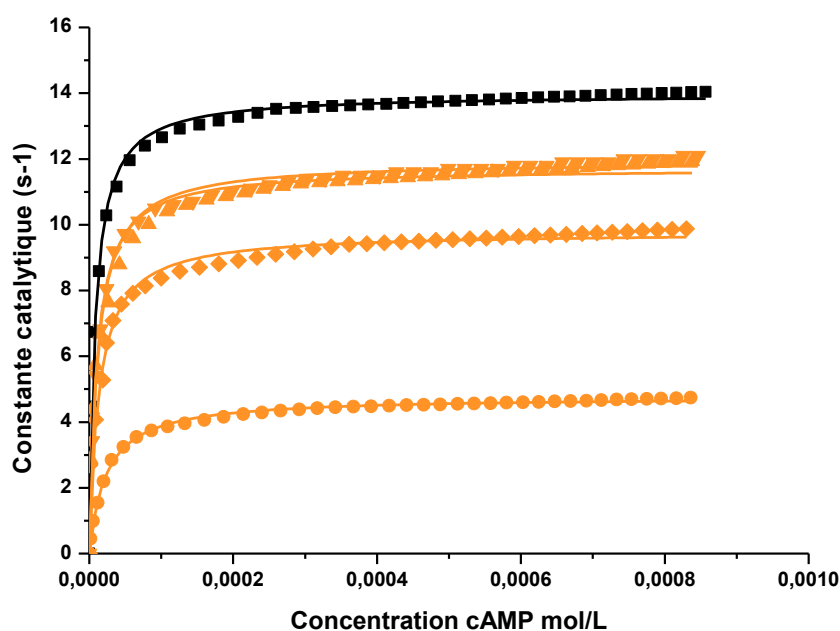


Figure 12 : Evolution de l'activité enzymatique en présence d'une concentration croissante d'euporium. 0 nM (■), 630 nM (▼), 1000 nM (▲), 2000 nM (◆), 5000 nM (●). pH 7.4 ; T=30°C.

	0 nM	630 nM	1000 nM	2000 nM	5000 nM
K_M (μM)	$8,1 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,5$	$13,5 \pm 0,6$	$23,2 \pm 0,7$
k_{cat} (s^{-1})	$14,0 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,4$	$12,1 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$

Tableau 7 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'euporium

L'étude de la compétition entre le calcium et l'euporium s'effectue à différentes concentrations d'Eu(III) (**Figure 12**). Aux plus faibles concentrations étudiées (630 nM et 1000 nM) l'activité est la même que celle observée sur la **Figure 11** en absence de calcium. En revanche, quand la concentration en Eu augmente et dépasse 2000 nM, une diminution de l'activité enzymatique est observée. Ces résultats sont une nouvelle fois comparables à ceux obtenus par *Song et al.* qui reportent une baisse d'activité enzymatique lorsque la concentration en lanthanide devient trop importante. Il a été

observé au cours des diverses expériences réalisées qu'en présence d'une forte concentration en europium la CaM pouvait précipiter et par conséquent empêcher la protéine de remplir sa fonction d'activateur enzymatique. Bien qu'elle diminue, on constate néanmoins que l'activité enzymatique reste égale à l'activité enzymatique de l'enzyme seule (mêmes constantes cinétiques **Tableau 7**). Cette observation nous démontre une absence d'interaction entre le complexe CaM-Eu et l'enzyme à haute concentration de métal et renforce l'hypothèse d'une précipitation de la protéine. En effet, si la protéine précipite suite à l'augmentation de la concentration en europium, elle se retrouvera dans l'incapacité soit d'activer soit d'inhiber davantage l'enzyme ce qui explique les constantes cinétiques obtenues, similaires, à l'enzyme seule.

2. Étude spectroscopique des complexes CaM-An

2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier

La **Figure 13** présente les spectres infrarouges de différence du complexe CaM-Np(V) à différents ratio en neptunyle (de 1 : 1 à 1 : 8) moins la calmoduline pure. A cause de la basse fréquence du mode de vibration du neptunyle, sous 850 cm^{-1} , les expériences ont été menées dans de l'eau lourde (D_2O)(30). Par conséquent, la bande intense présente à 1200 cm^{-1} est attribuée au solvant D_2O (31). Malheureusement les régions spectrales relatives aux modes de vibration des amide-I et amide-II ne peuvent pas être interprétées précisément car une contribution résiduelle des contaminants, H_2O ou HDO, dans l'échantillon doit être prise en compte. Néanmoins, les petites bandes observées dans la gamme spectrale au-delà de 1500 cm^{-1} concernent probablement des changements de conformation de la protéine suite à la complexation de l'ion neptunyle NpO_2^+ . Ces bandes sont significativement différentes de celles observées lors de l'ajout du calcium ou d'uranyle ce qui suggère que la conformation de la protéine diffère en fonction du métal qui occupe ses sites de complexation.

Les différences obtenues peuvent être une première raison aux effets toxiques des actinides observés par ITC.

Les bandes observées entre 980 cm^{-1} et 1060 cm^{-1} dans les spectres de différence des complexes de neptunyle sont causées par la présence d'HEPES dans l'échantillon.

Ces bandes sont absentes des spectres concernant les complexes CaM-uranyle et CaM-calcium car un tampon différent a été utilisé.

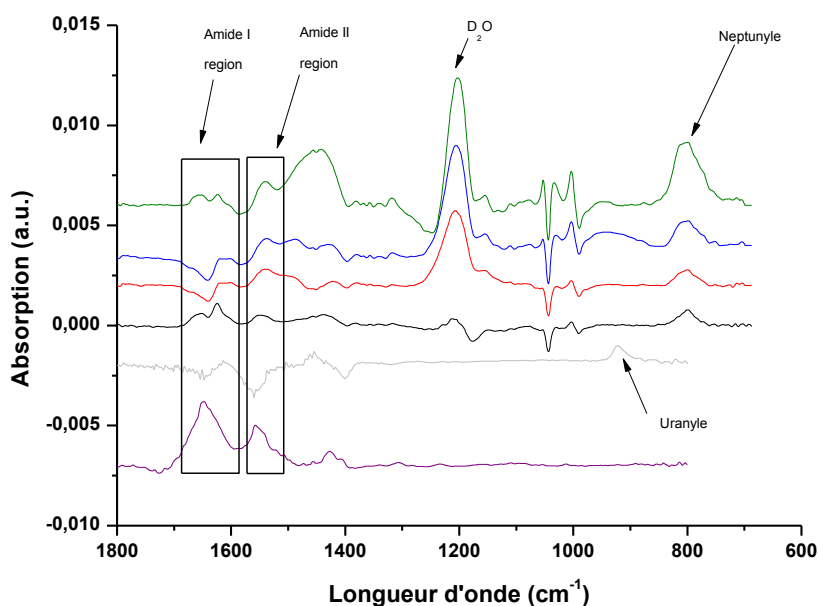


Figure 13 : Spectre infrarouge de différence du complexe CaM-Np(V) moins la CaM pure à différents ratio de métal. pH 7 dans le D₂O. (1 : 1 (noir), 1 : 2 (rouge), 1 : 4 (bleu), 1 : 8 (vert)). Comparaison avec le spectre infrarouge de différence du complexe CaM-U(VI) moins la CaM pure à pH 6 dans H₂O (ratio de 1 : 4 (gris)) et le spectre de différence du complexe CaM-Ca moins la CaM pure (violet).

La bande correspondant au mode de vibration $\nu_3(\text{NpO}_2)$ est observée dans la gamme spectrale en dessous de 850 cm^{-1} . En faisant varier la stœchiométrie, on remarque un léger changement de position et de forme de la bande étudiée. La déconvolution du pic a été réalisée en utilisant les fréquences caractéristiques des espèces obtenues à partir de la dérivée seconde des spectres enregistrés. A partir du spectre de l'échantillon préparé à la stœchiométrie 1 : 1, une seule espèce possédant un maximum à 798 cm^{-1} est observée (**Figure 14**). L'espèce aqueuse de l'ion neptunyle est attendue à 820 cm^{-1} (30), par conséquent, la bande observée à faible fréquence implique que le neptunyle est complexé par la calmoduline. Lorsque le ratio CaM : Np augmente, une seconde espèce avec un maximum à 816 cm^{-1} est observée. La contribution de cette espèce augmente clairement lorsque la concentration de neptunyle en solution s'élève. Ce pic est donc attribué à la présence de neptunyle non-coordonné en solution. La constante de stabilité relativement faible entre la

calmoduline et le neptunyle ($\log \beta = 4,9$) peut expliquer la présence de neptunyle libre en solution. De plus, comme l'a montré l'expérience d'ultrafiltration mentionnée dans le chapitre 2, le neptunyle, structurellement similaire à l'uranyle, n'occupe probablement pas tous les sites de complexation du calcium de la protéine ce qui explique donc l'accroissement de la quantité de neptunyle libre en solution dans les conditions de cette étude.

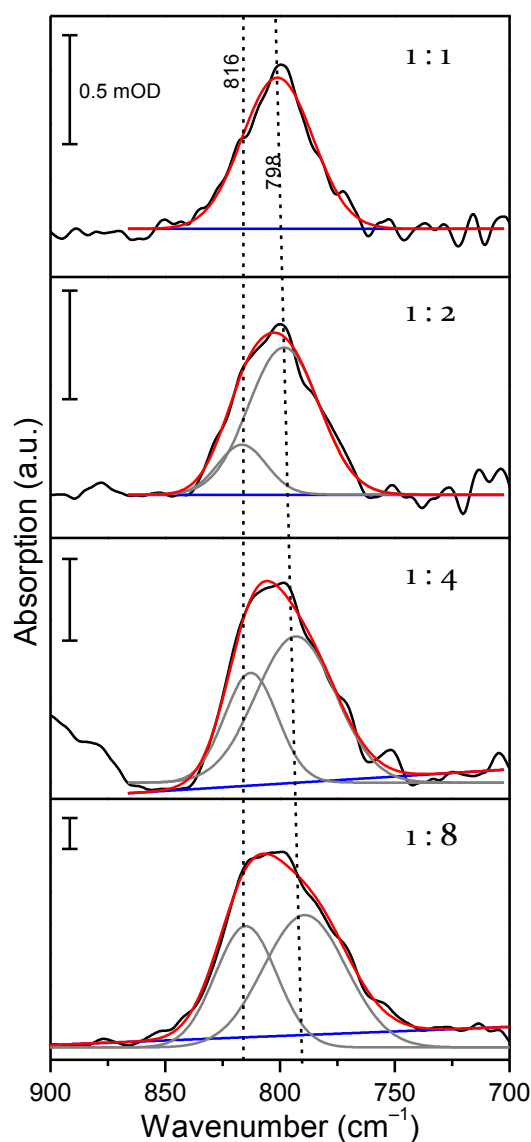


Figure 14 : spectre infrarouge du complexe CaM-neptunyle avec soustraction du spectre de la calmoduline pure. (Spectre expérimental (noire), somme des contributions du fit (rouge), contributions du fit (gris).

2.2. Spectroscopie Raman

Comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman (FT-Raman) peut apporter des informations sur la structure des protéines et les changements structuraux induits par la complexation des métaux(32-34). Les changements principaux sont généralement observés dans la région spectrale des amides (Amide-I 1630-1680 cm^{-1} , Amide-II 1400-1470 cm^{-1} et Amide III 1250-1350 cm^{-1}) (35).

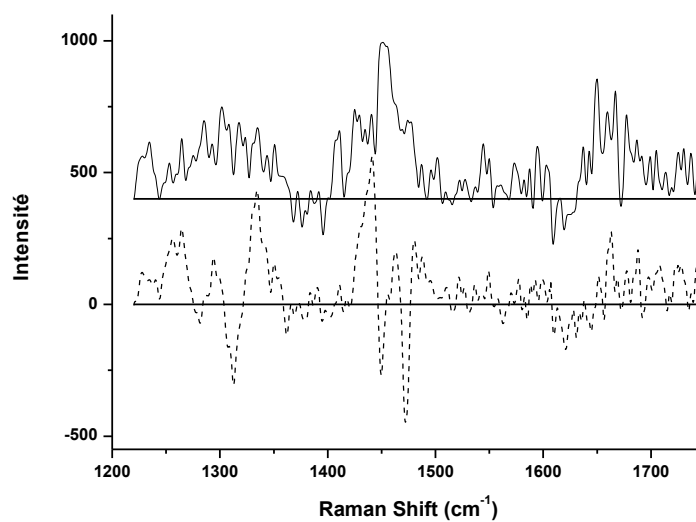


Figure 15 : Spectre Raman du complexe CaM-Ca moins la CaM pure (ligne noire) et du complexe CaM-U moins la CaM pure (ligne pointillée). Le zéro est également représenté pour chaque spectre de différence.

Les résultats de l'expérience Raman sont exposés ici (**Figure 15**) en tant que spectres de différences (échantillon étudié moins la calmoduline pure). La présence du tampon (HEPES), qui possède également un spectre Raman, à une concentration bien supérieure (50 mM) à celle de la protéine ($10 \text{ g.L}^{-1} \approx 0,6 \text{ mM}$) explique le bruit conséquent observé sur les spectres de différence. Une répétition des expériences en absence d'HEPES ou en utilisant un tampon différent pourrait nous permettre d'obtenir des résultats plus significatifs et en particulier d'avoir un ratio signal sur bruit plus important. On observe néanmoins des changements induits par la complexation du calcium par la protéine qui se traduisent principalement par la présence de bandes positives dans les trois régions des amines évoquées précédemment. Cette observation suggère un accroissement de la quantité d'hélice- α et de feuillet- β de la protéine (33). Ces résultats sont en accord avec les études de dichroïsme circulaire, réalisées sur le

système calmoduline-calcium, présentes dans la littérature (36), qui montrent une augmentation de la quantité d'hélice- α , impliquant un changement de conformation couplé à une ouverture de la protéine. Bien que les spectres Raman des systèmes CaM-Ca et CaM-U aient des caractéristiques similaires (pics positifs entre 1650 cm^{-1} et 1680 cm^{-1}) dans la région de l'amide-I (concerne principalement l'élongation de la liaison C=O et l'ossature de la protéine (33)), les deux autres zones d'intérêt révèlent des différences. La région de l'amide-II, qui est généralement sensible aux changements concernant l'ossature de la protéine, dévoile des différences entre les deux systèmes. Malgré la présence d'un large pic positif situé à 1440 cm^{-1} deux pics négatifs sont visibles à 1440 cm^{-1} et 1470 cm^{-1} . Ces différences suggèrent une conformation globale, et une ouverture, différente de la protéine lors de la complexation de l'uranyle par la CaM et ainsi une structure également différente. Des différences sont également présentes dans la région de l'amide-III (déformation N-H et C-H), deux pics positifs à 1250 cm^{-1} et 1335 cm^{-1} sont respectivement reliés à l'augmentation de la quantité de feuillet- β et d'hélice- α (37). Les différences de spectre énoncées ici (spécialement dans la zone de l'ossature de la protéine et de l'amide-III) montrent clairement que malgré quelques similarités (augmentation de la quantité d'hélice- α suggérant une ouverture de la protéine pour les deux systèmes) il existe des différences flagrantes qui impliquent une structure générale de la protéine différente. Le métal complexé par la CaM influe donc sur la structure de la protéine, une structure différente engendre une interaction enzyme-protéine différente, ce qui peut expliquer les résultats ITC observés (absence d'activation de l'enzyme) et l'effet toxique des ions actinyles sur la réaction enzymatique.

2.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière permet de déterminer le rayon hydrodynamique de la protéine étudiée et par conséquent de vérifier son ouverture lors de l'ajout du métal en solution. Les rayons hydrodynamiques obtenus après l'analyse de l'intensité de la lumière diffusée (**Figure 16**) sont reportés dans le **Tableau 8**. Bien que quelques impuretés soient présentes en solution (quantité d'impureté négligeable (moins de 0,01 % en volume), à quantité égale, une particule 10 fois plus

grosse qu'une autre diffusera une lumière plus intense d'un facteur 1 million (38, 39)), il a été possible d'obtenir des données convenables. Les résultats obtenus pour la protéine native et pour le complexe CaM-Ca (4,6 nm et 6,1 nm respectivement) sont similaires à ceux disponibles dans la littérature pour ces systèmes (40). Aucune référence n'est en revanche disponible pour les deux complexes formés avec les actinides. Nos résultats montrent une augmentation du diamètre hydrodynamique de la protéine lors de l'ajout des ions actinyles ce qui démontre que la calmoduline s'ouvre suite à la complexation des métaux. Des différences sont cependant observées. En effet, le diamètre hydrodynamique de la protéine lors de l'ajout des actinyles est plus élevé qu'après l'ajout de calcium. Comme évoqué lors des études spectroscopiques (IR et Raman), l'ajout d'uranyle ou de neptunyle entraîne l'ouverture de la CaM, cependant comme le suggère à la fois le diamètre obtenu et les différences observées en spectroscopie Raman et IR, la structure de la protéine est différente selon le métal complexé (Ca ou An). De plus, le diamètre hydrodynamique de la protéine après avoir formé un complexe avec le neptunyle est plus grand qu'après avoir complexé l'uranyle, ceci peut également expliquer l'inhibition plus importante de la réaction enzymatique.

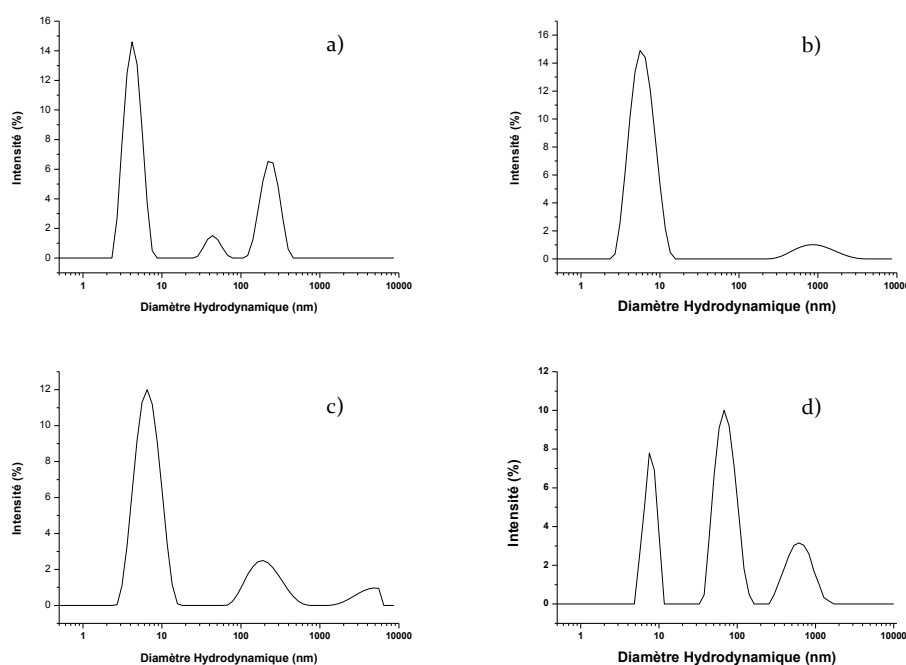


Figure 16 : Intensité de la lumière diffusée en fonction du diamètre hydrodynamique (nm) pour la protéine native a), CaM-Ca b), CaM-U c) et CaM-Np d).

Échantillon	Diamètre hydrodynamique (nm)
CaM pure	4.6 ± 0.1
CaM-Ca	6.1 ± 0.2
CaM-U	6.9 ± 0.2
CaM-Np	8.0 ± 0.4

Tableau 8 : Diamètre hydrodynamique des échantillons de calmoduline mesurés

Bien que l'ouverture de la protéine puisse mener à une interaction avec l'enzyme ou des protéines cibles, le diamètre hydrodynamique mesuré ici et les différences observées sur les spectres IR et Raman laissent penser que l'interaction entre le complexe CaM-An et l'enzyme est différente de celle entre le complexe CaM-Ca et l'enzyme ce qui expliquerait l'absence d'activation et l'inhibition supplémentaire observées en ITC.

Les différentes méthodes spectroscopiques utilisées pour essayer d'expliquer l'effet toxique des deux ions actinyles ont dans un premier temps permis de déterminer les différences de structure entre les complexes formés par la CaM avec le Ca et ceux formés avec les ions actinyles. Des nettes différences existent au niveau des bandes relatives aux amides (I, II et III) observées en spectroscopie Raman. Ces différences démontrent que la conformation et donc les propriétés de la protéine sont influencées par le métal qui occupe les sites de complexation. L'expérience de DLS prouve que la protéine s'ouvre lors de l'addition de métaux tels que l'uranyle ou le neptunyle, leur diamètre hydrodynamique est cependant plus grand que celui obtenu lors de l'ajout de calcium ce qui confirme l'hypothèse d'une conformation et d'une structure différente en fonction du métal complexé. La calmoduline ayant besoin de se trouver dans une conformation bien précise (ouverte avec les quatre sites occupés par un ion calcium) pour activer la PDE₁, la compétition entre le calcium et l'uranyle ou le neptunyle pousse sans doute la protéine à adopter une conformation différente qui a non pas une absence d'effet sur la réaction enzymatique mais un effet négatif qui entraîne une inhibition plus prononcée comme constaté lors des études calorimétriques.

La réversibilité des effets de l'uranyle et du neptunyle sera étudiée dans la partie suivante en utilisant le 5-LIO(Me-3,2-HOPO), un chélatant, utilisé comme agent décorporant, capable d'extraire les ions actinyles de la protéine.

3. Chélation des ions actinyles

3.1. Etude de l'effet du 5-LIO(Me-3,2-HOPO) sur la réaction enzymatique

Comme les expériences précédentes l'ont démontré, la présence d'actinide dans l'organisme est fortement toxique, il est donc important de trouver un moyen de les extraire du corps humain en cas de contamination interne. Plusieurs ligands ont été développés dans l'optique d'accomplir cet objectif (41-45). Les expériences suivantes ont été conçues afin de déterminer si l'ajout d'un ligand décorporant permet à l'enzyme de fonctionner de nouveau normalement et de récupérer l'activité enzymatique obtenue en l'absence de contaminant. Le ligand sélectionné pour cette étude est le 5-LIO(Me-3,2-HOPO), connu pour son affinité envers l'uranyle et le neptunyle (46, 47). Les différentes propriétés d'un bon ligand décorporant ont été évoquées dans le chapitre 1 et sont également disponibles dans la littérature (43). L'une des propriétés majeures est évidemment l'affinité importante du ligand pour les actinides considérés mais aussi sa faible affinité envers les métaux divalents (le calcium notamment) qui sont indispensables à une large gamme de processus biologiques. Le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) possède une faible affinité pour le calcium, qui est essentiel à notre système puisqu'il active la calmoduline. Il est néanmoins nécessaire de vérifier que le ligand n'interfère pas avec l'enzyme et ne cause pas une diminution de l'activité enzymatique.

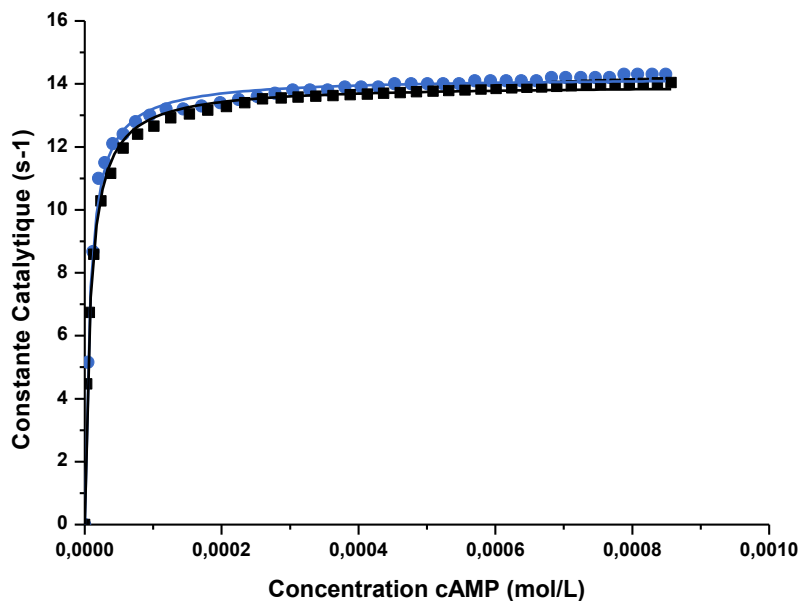


Figure 17 : Effet du 5-LIO(Me-3,2-HOPO sur la réaction enzymatique

	Sans ligand	Avec ligand
K_M (μM)	$8,1 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,3$
K_{cat} (s^{-1})	$14,0 \pm 0,3$	$14,1 \pm 0,3$

Tableau 9 : paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence et en absence de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)

On observe sur la **Figure 17** que les résultats de l'expérience en absence et celle en présence du ligand décorporant sont similaires. De plus, les constantes cinétiques calculées sont également très proche (**Tableau 9**) ce qui confirme que le ligand a une très faible affinité pour le calcium et ne perturbe pas la réaction enzymatique. Ce ligand peut par conséquent être utilisé dans notre système afin d'essayer d'extraire les contaminants de la protéine.

3.2. Complexation des actinyles par le 5-LIO(Me-3,2-HOPO)

Le ligand 5-LIO(Me-3,2-HOPO) est le plus efficace pour l'extraction *in vivo* de l'uranyle dans les reins⁽⁴³⁾ et est également très efficace pour l'extraction du neptunyle⁽⁴⁷⁾.

Cependant, selon la littérature, un des problèmes posés par la décorporation du neptunyle est la nécessité d'utiliser un ligand multidentate capable de former des

complexes suffisamment stable avec le Np(IV) et ainsi faciliter la réduction du Np(V) en Np(IV). Une titration UV-visible, avec une concentration constante de neptunyle et une concentration croissante de ligand, a donc été réalisée afin de connaître la valeur de la constante de complexation entre le ligand et le neptunium mais aussi de vérifier si une réduction de ce dernier de Np(V) en Np(IV) est observée.

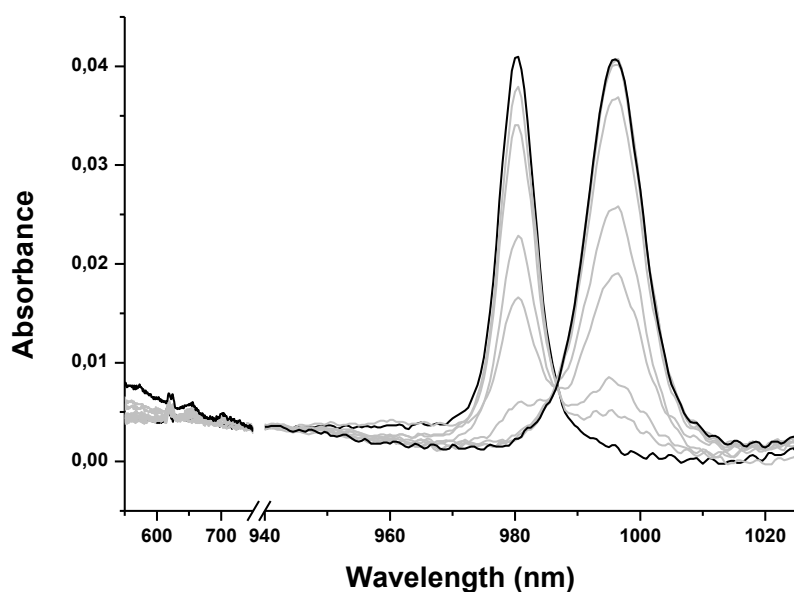


Figure 18 : Titration du neptunium (V) par le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,7 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 10 équivalents de ligand)

La titration UV-vis (**Figure 18**) montre une diminution de l'absorbance à 980 nm (caractéristique du neptunyle libre en solution) et une augmentation concomitante de l'absorbance à 996 nm (attribué au complexe formé entre le neptunium et le ligand). Le point isobestique situé à 987 nm a permis de calculer la constante de stabilité entre le métal et le ligand ($\log \beta = 7,9 \pm 0,1$ dans nos conditions, avec une stœchiométrie 1 : 1). La complexation du métal par le ligand est complète après l'ajout d'1,5 équivalent de ligand, cependant aucune réduction n'est observée sur le spectre UV et ce même à forte concentration de ligand (jusqu'à 10 équivalents). En effet, le Np(IV) possède une bande caractéristique intense située à 700 nm (48) qui est absente ici, dans les conditions de notre étude. Le neptunium est donc complexé sous sa forme Np(V) par le 5-LIO(Me-3,2-HOPO). Le degré d'oxydation du neptunium n'a que peu d'importance pour notre étude tant que le métal est extrait de la calmoduline. La constante de complexation entre le neptunyle et le ligand ($\log \beta = 7,9 \pm 0,1$) étant bien

plus importante que celle entre le neptunyle et la protéine ($\log \beta = 4,9 \pm 0,2$), le ligand devrait complexer sans difficulté le métal présent dans les sites de complexation de la CaM.

La constante de stabilité entre le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) et l'uranyle est connue et est très élevée à pH physiologique ($\log \beta = 14,9$ (49)). La complexation de cet actinide par le ligand ne devrait pas être problématique malgré la spéciation particulière de l'uranyle.

3.3. Réversibilité de l'inhibition

Deux expériences différentes ont été conduites, l'une en présence d'uranyle et l'autre en présence de neptunyle. Afin de simuler correctement les conditions de la décorporation, le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) est le dernier élément ajouté à la solution. Les concentrations en actinides utilisées sont égales aux concentrations maximales utilisées lors des premières études enzymatiques (i.e. 500 nM pour l'uranyle et 120 nM pour le neptunyle).

Les **Figure 19** et **Figure 20** montrent qu'avec les deux ions actinyles étudiés nous sommes capables de récupérer l'activité enzymatique de référence en augmentant la quantité de ligand disponible. Comme attendu le ligand est donc capable d'extraire les métaux toxiques de la protéine. De plus ces résultats démontrent que l'effet des actinyles sur la protéine (conformation et structure différentes suite à la complexation des métaux) est réversible et qu'une fois les métaux extraits de la protéine le calcium peut à nouveau occuper les quatre sites de la calmoduline qui peut ainsi activer la PDE₁ comme elle est censée le faire.

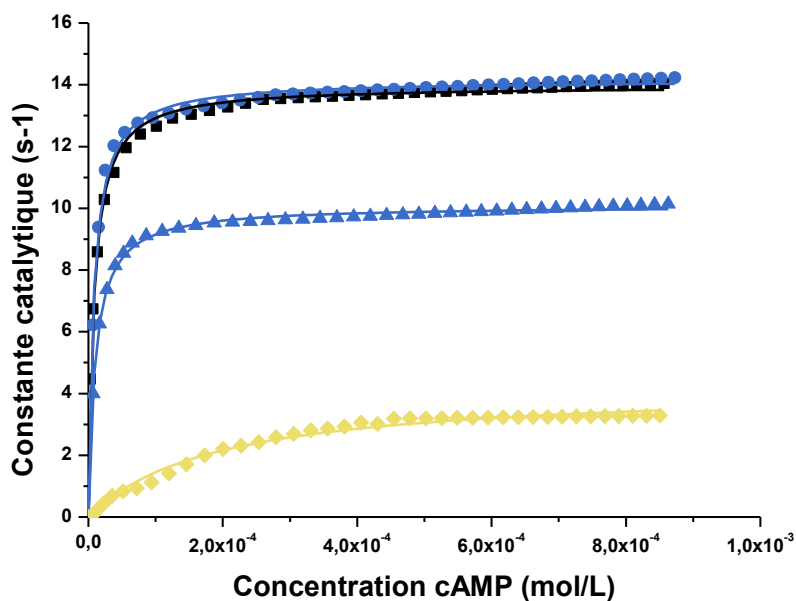


Figure 19 : activité enzymatique en présence de 500 nM d'uranyle et d'une concentration variable de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) : 0 nM (♦), 300 nM (▲) et 600 nM (●). L'activité enzymatique de référence est également représentée ici (■).

	Référence	0 nM 5-LIO	300 nM 5-LIO	600 nM 5-LIO
K_M (μM)	8.1 ± 0.2	191.8 ± 12.2	10.2 ± 0.3	8.0 ± 0.3
k_{cat} (s^{-1})	14.0 ± 0.3	4.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	14.2 ± 0.3

Tableau 10 : paramètres enzymatiques obtenus en présence d'uranyle et de différentes concentrations de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)

Les valeurs des constantes cinétiques (**Tableau 10** et **Tableau 11**) montrent également qu'aucune séquelle n'est présente, aussi bien pour la protéine que pour l'enzyme. Les constantes cinétiques calculées (K_M et k_{cat}) après l'ajout du décorporant sont égales aux valeurs de références obtenues en l'absence de contamination et montrent ainsi un retour à la normale pour la réaction enzymatique.

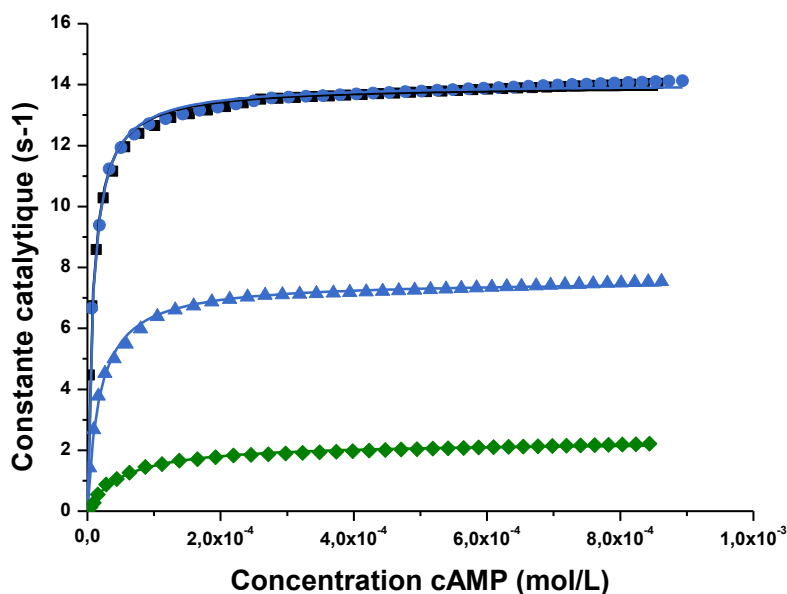


Figure 20 : activité enzymatique en présence de 500 nM d'uranyle et d'une concentration variable de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) : 0 nM (◆), 300 nM (▲) et 600 nM (●). L'activité enzymatique de référence est également représentée ici (■).

	Référence	0 nM	100 nM 5-LIO	300 nM 5-LIO
K_M (μM)	8.1 ± 0.2	53.0 ± 3.5	18.5 ± 0.5	8.3 ± 0.3
k_{cat} (s^{-1})	14.0 ± 0.3	2.3 ± 0.1	7.5 ± 0.2	14.1 ± 0.2

Tableau 11 : paramètres enzymatiques obtenus en présence de neptunyle et de différentes concentrations de 5-LIO(Me-3,2-HOPO)

Grâce à la grande affinité du ligand pour les ions actinyles, la quantité de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) nécessaire à la récupération totale de l'activité enzymatique est relativement faible. En effet, pour la solution contenant du neptunyle, une concentration en ligand de seulement 300 nM est nécessaire pour récupérer l'activité de référence, et seulement 600 nM sont nécessaires pour la solution contenant de l'uranyle. Ces résultats de l'étude calorimétrique *in vitro* ne sont bien sûr pas comparables à un système *in vivo* dans lequel les actinides ne sont pas directement accessibles à la complexation par le ligand. Le résultat de notre étude, qui peut cependant être extrapolé à un système biologique complexe, est le retour à un fonctionnement normal de la protéine et donc par extension de l'enzyme.

4. Conclusion

Le développement d'une méthode calorimétrique (ITC) a permis de mesurer directement l'activité enzymatique de la PDE₁ suite à son activation par la calmoduline. L'effet d'actinides tels que l'uranyle, le neptunyle et l'américium (utilisation d'un homologue : l'euporium) sur la réaction enzymatique a été étudié en utilisant la même méthode calorimétrique. La combinaison de l'ITC avec d'autres méthodes d'analyse spectroscopique (IR, Raman, DLS) s'est révélé être très utile pour étudier l'effet de ces métaux toxiques sur la réaction enzymatique mais aussi pour obtenir des informations complémentaires sur la structure et la conformation de la calmoduline une fois les actinides complexés. L'étude enzymatique a montré que la présence des ions actinyle diminue la chaleur produite par la réaction et par conséquent l'activité de la PDE₁. Le neptunyle semble avoir un effet plus négatif que l'uranyle sur la réaction enzymatique, ce qui peut s'expliquer par les différences de spéciation existant entre des deux ions. En effet l'uranyle est largement hydrolysé à pH physiologique et une grande partie de l'uranyle n'est pas disponible à la complexation par la calmoduline. L'ajout d'une quantité importante d'actinyle semble avoir un effet toxique sur la réaction enzymatique car l'activité mesurée est plus faible que celle de l'enzyme seule. Les métaux n'ayant pas d'effet direct sur l'enzyme on en déduit que c'est le complexe formé entre les ions actinyles et la calmoduline qui ont un effet toxique sur la réaction enzymatique.

L'euporium a un comportement différent puisqu'il est capable d'activer l'enzyme quasiment de la même manière que le calcium. Cependant, quand la concentration en euporium devient trop importante la protéine précipite, l'activation de l'enzyme devient ainsi impossible et seulement l'activité de l'enzyme inactivée est visible.

La mesure du diamètre hydrodynamique de la protéine par DLS a permis de démontrer l'ouverture de la calmoduline lors de l'ajout d'uranyle ou de neptunyle. Les résultats obtenus par spectroscopie Raman et infrarouge montrent en revanche que malgré une ouverture de la protéine la conformation de la calmoduline suite à la complexation des ions actinyles est différente de sa conformation quand elle complexe le calcium. Ces différences notables de conformation et de structure peuvent expliquer

l'effet toxique des complexes CaM-An. Les mesures spectroscopiques des complexes CaM-An en sont restées au stade d'étude préliminaire. Des expériences complémentaires permettraient d'obtenir des résultats plus précis et des informations supplémentaires sur la structure de la protéine.

Bien que largement toxique pour la réaction enzymatique, l'effet des actinides est réversible en ajoutant un ligand décorporant à la solution. Le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) est capable d'extraire les ions actinyles de la CaM et ainsi permettre au calcium d'occuper les quatre sites de la protéine qui peut ainsi retrouver sa conformation habituelle et activer l'enzyme.

Références Bibliographiques : Chapitre 3

1. W. K. Sonnenburg *et al.*, Identification of Inhibitory and Calmodulin-binding Domains of the PDE_{1A1} and PDE_{1A2} Calmodulin-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.***270**, 30989–31000 (1995).
2. T. A. Goraya, D. M. F. Cooper, Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE₁): Current perspectives. *Cell. Signal.***17**, 789–797 (2005).
3. T. S. Teo, J. H. Wang, Mechanism of Activation of a Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase from Bovine Heart by Calcium Ions Identification of the protein activator as a Ca²⁺ binding protein. *J. Biol. Chem.***248**, 5950–5955 (1973).
4. T. A. Goraya *et al.*, Kinetic properties of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphodiesterase isoforms dictate intracellular cAMP dynamics in response to elevation of cytosolic Ca²⁺. *Cell. Signal.***20**, 359–374 (2008).
5. S. Kakiuchi, R. Yamazaki, Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***41**, 1104–1110 (1970).
6. P. Greengard, S. A. Rudolph, J. M. Sturtevant, Enthalpy of Hydrolysis of the 3' Bond of Adenosine 3',5'-Monophosphate and Guanosine 3',5'-Monophosphate. *J. Biol. Chem.***244**, 4798–4800 (1969).
7. R. N. Goldberg, Y. B. Tewari, Thermodynamics of the hydrolysis reactions of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphate(aq) and phosphoenolpyruvate(aq); the standard molar formation properties of 3',5'-(cyclic)phosphate(aq) and phosphoenolpyruvate(aq). *J. Chem. Thermodyn.***35**, 1809–1830 (2003).
8. C. Y. Huang, V. Chau, P. B. Chock, J. H. Wang, R. K. Sharma, Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca²⁺ to calmodulin for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***78**, 871–874 (1981).
9. R. Kakkar, R. V. S. Raju, R. K. Sharma, Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE₁). *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.***55**, 1164–1186 (1999).
10. Y. Tian *et al.*, Dual Specificity and Novel Structural Folding of Yeast Phosphodiesterase-1 for Hydrolysis of Second Messengers Cyclic Adenosine and Guanosine 3',5'-Monophosphate. *Biochemistry (Mosc.)***53**, 4938–4945 (2014).
11. J. A. Beavo, J. G. Hardman, E. W. Sutherland, Hydrolysis of Cyclic Guanosine and Adenosine 3',5'-Monophosphates by Rat and Bovine Tissues. *J. Biol. Chem.***245**, 5649–5655 (1970).

12. M. M. Appleman, W. J. Thompson, Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry (Mosc.)*.**10**, 311–316 (1971).
13. J. Nikawa, P. Sass, M. Wigler, Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.***7**, 3629–3636 (1987).
14. D. R. Repaske, J. V. Swinnen, S. L. Jin, J. J. V. Wyk, M. Conti, A polymerase chain reaction strategy to identify and clone cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNAs. Molecular cloning of the cDNA encoding the 63-kDa calmodulin-dependent phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.***267**, 18683–18688 (1992).
15. C. Yan, J. K. Bentley, W. K. Sonnenburg, J. A. Beavo, Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *J. Neurosci.***14**, 973–984 (1994).
16. J. Yu *et al.*, Identification and Characterisation of a Human Calmodulin-Stimulated Phosphodiesterase PDE1B1. *Cell. Signal.***9**, 519–529 (1997).
17. S. P. Wang, P. L. Sharma, P. V. Schoenlein, B. Ely, A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.***90**, 630–634 (1993).
18. R. K. Sharma, J. H. Wang, Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.***82**, 2603–2607 (1985).
19. C. Yan, A. Z. Zhao, J. K. Bentley, J. A. Beavo, The Calmodulin-dependent Phosphodiesterase Gene PDE1C Encodes Several Functionally Different Splice Variants in a Tissue-specific Manner. *J. Biol. Chem.***271**, 25699–25706 (1996).
20. J. J. Chou, S. Li, C. B. Klee, A. Bax, Solution structure of Ca²⁺-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.***8**, 990–997 (2001).
21. Y. S. Babu *et al.*, Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature*.**315**, 37–40 (1985).
22. M. Ito, V. Guerriero, X. Chen, D. J. Hartshorne, Definition of the inhibitory domain of smooth muscle myosin light chain kinase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry (Mosc.)*.**30**, 3498–3503 (1991).
23. H. Tokumitsu, M. Muramatsu, M. Ikura, R. Kobayashi, Regulatory Mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.***275**, 20090–20095 (2000).

24. C. R. Nishida, P. R. O. de Montellano, Autoinhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase IDENTIFICATION OF AN ELECTRON TRANSFER CONTROL ELEMENT. *J. Biol. Chem.***274**, 14692–14698 (1999).
25. C. Moulin, P. Decambox, V. Moulin, J. G. Decaillon, Uranium Speciation in Solution by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Anal. Chem.***67**, 348–353 (1995).
26. C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation. *Appl. Spectrosc.***52**, 528–535 (1998).
27. Y.-Y. Song *et al.*, Biological effects of rare earth protein complexes: Influence of lanthanide ions Eu³⁺, Tb³⁺ on secondary structure of calmodulins. *Biospectroscopy***5**, 371–377 (1999).
28. M.-C. Kilhoffer, J. G. Demaille, D. Gerard, Terbium as luminescent probe of calmodulin calcium-binding sites. *FEBS Lett.***116**, 269–272 (1980).
29. M.-C. Kilhoffer, D. Gerard, J. G. Demaille, Terbium binding to octopus calmodulin provides the complete sequence of ion binding. *FEBS Lett.***120**, 99–103 (1980).
30. L. H. Jones, R. A. Penneman, Infrared Spectra and Structure of Uranyl and Transuranium (V) and (VI) Ions in Aqueous Perchloric Acid Solution. *J. Chem. Phys.***21**, 542–544 (1953).
31. S. Y. Venyaminov, F. G. Prendergast, Water (H₂O and D₂O) Molar Absorptivity in the 1000–4000 cm⁻¹ Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions. *Anal. Biochem.***248**, 234–245 (1997).
32. J. T. Pelton, L. R. McLean, Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Anal. Biochem.***277**, 167–176 (2000).
33. Z.-Q. Wen, Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.***96**, 2861–2878 (2007).
34. J. George J. Thomas, Raman Spectroscopy of Protein and Nucleic Acid Assemblies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.***28**, 1–27 (1999).
35. B. A. Seaton, J. F. Head, R. C. Lord, G. A. Petsko, Studies of calmodulin structure: laser Raman spectroscopy of biomolecules. XVII. *Biochemistry (Mosc.)*. **22**, 973–978 (1983).
36. S. R. Martin, P. M. Bayley, The effects of Ca²⁺ and Cd²⁺ on the secondary and tertiary structure of bovine testis calmodulin. A circular-dichroism study. *Biochem. J.***238**, 485–490 (1986).
37. P. Carey, *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies.* (New York, Academic Press., 1982).

38. Malvern Instruments, Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes, (available at <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>).
39. S. R. Aragón, R. Pecora, Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *J. Chem. Phys.* **64**, 2395–2404 (1976).
40. A. L. Papish, L. W. Tari, H. J. Vogel, Dynamic Light Scattering Study of Calmodulin–Target Peptide Complexes. *Biophys. J.* **83**, 1455–1464 (2002).
41. R. J. Abergel *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).
42. É. Ansoborlo *et al.*, Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chim.* **10**, 1010–1019 (2007).
43. P. W. Durbin, B. Kullgren, J. Xu, K. N. R. (invited), Development of Decorporation Agents for the Actinides. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **79**, 433–443 (1998).
44. C. N. P. L. Manuel Sturzbecher-Hoehne, 3,4,3-LI(1,2-HOPO): In vitro formation of highly stable lanthanide complexes translates into efficacious in vivo europium decorporation. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003**, 40, 8340–6 (2011).
45. F. Paquet, V. Chazel, P. Houpert, R. Guilmette, B. Muggenburg, Efficacy of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) for decorporation of Pu, Am and U from rats injected intramuscularly with high-fired particles of MOX. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **105**, 521–525 (2003).
46. A. E. V. Gorden, J. Xu, K. N. Raymond, P. Durbin, Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides. *Chem. Rev.* **103**, 4207–4282 (2003).
47. B. Kullgren, E. E. Jarvis, D. D. An, R. J. Abergel, Actinide chelation: biodistribution and in vivo complex stability of the targeted metal ions. *Toxicol. Mech. Methods.* **23**, 18–26 (2013).
48. Z. Yoshida, S. G. Johnson, T. Kimura, J. R. Krsul, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 699–812.
49. M. Sturzbecher-Hoehne, G. J.-P. Deblonde, R. J. Abergel, Solution thermodynamic evaluation of hydroxypyridinonate chelators 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2-HOPO) for UO₂(VI) and Th(IV) decorporation. *Radiochim. Acta Int. J. Chem. Asp. Nucl. Sci. Technol.* **101**, 359–366 (2013).

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude du devenir des actinides en cas de contamination interne. La calmoduline, une protéine ubiquitaire, est présente dans toutes les cellules et est par conséquent impliquée dans un grand nombre de processus biologiques qui peuvent être perturbés en cas de contamination. L'objectif de ce travail était double. Dans un premier temps, l'étude microscopique des interactions entre les actinides et la CaM a eu pour but de déterminer la composition de la sphère de coordination des métaux étudiés (neptunyle et uranyle) lorsque complexés par la protéine.

Des études préliminaires utilisant la spectroscopie UV-visible (neptunyle) et la SLRT (uranyle) ont permis de s'assurer de l'existence d'une interaction entre les métaux et la protéine. Des expériences utilisant la spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) ont ensuite permis de sonder l'environnement des métaux lorsque complexés à la protéine. Des modèles théoriques basés sur le site de complexation du calcium ont tout d'abord été créés puis optimisés énergétiquement par DFT avant d'être utilisés pour l'ajustement des données obtenues en EXAFS. Ces expériences ont démontré que l'environnement de l'uranyle dans la protéine est sensible au pH de la solution dans laquelle il est préparé. En effet, en plus des oxygènes venant des acides aminés composant la protéine, une molécule d'eau est présente dans la sphère de coordination du métal à bas pH puis s'hydrolyse pour faire place à un groupement OH^- lorsque le pH augmente. Le neptunyle qui est beaucoup moins sensible à l'hydrolyse que l'uranyle conserve la même sphère de coordination quel que soit le pH auquel la mesure est effectuée. Le même phénomène pourrait néanmoins être observé pour le neptunyle à plus haut pH mais la précipitation de la protéine au-delà de pH 9 nous a empêchés de vérifier cette hypothèse.

L'interaction protéine-actinyle constatée et la composition de la sphère de coordination des métaux déterminée, l'étude s'est donc portée dans un second temps sur l'effet de cette complexation sur les propriétés de la calmoduline et plus particulièrement sur sa capacité à participer aux réactions biochimiques, auxquelles elle est indispensable, en cas de contamination. Afin d'étudier cet aspect, une méthode basée sur la titration calorimétrique isotherme (ITC) a été mise au point afin de suivre la chaleur produite par une réaction enzymatique (phosphodiesterase) activée par la

calmoduline. Cette étude enzymatique a été réalisée avec le neptunyle et l'uranyle, évoqués précédemment, mais également avec l'europlum (analogue de l'américium). Ces trois métaux possédant des caractéristiques différentes (charge, rayon ionique, structure, sensibilité à l'hydrolyse), leur effet sur la réaction enzymatique est donc variable. Après vérification de l'absence d'effet direct des métaux sur l'enzyme, les expériences ont pu être menées en présence de la calmoduline et avec des concentrations variables de contaminants. Les deux actinyles ont un effet similaire sur la réaction enzymatique. En effet, plus la concentration en uranyle ou neptunyle est importante dans le milieu, plus l'activité enzymatique diminue. Aux plus hautes concentrations étudiées, l'activité enzymatique devient même moins importante que l'activité de l'enzyme seule. Ces résultats, couplés à l'absence d'effet négatif des métaux sur l'enzyme seule, suggèrent que c'est le complexe formé entre la calmoduline et les actinyles qui au lieu d'activer l'enzyme l'inhibe davantage. La diminution d'activité observée est plus importante lors de l'ajout de neptunyle que lors de l'ajout d'uranyle ce qui peut s'expliquer par la propension de l'uranyle à s'hydrolyser et par conséquent diminue la proportion de métal disponible à la complexation. Le neptunyle qui ne s'hydrolyse pas avant pH 10 est totalement complexé par la protéine et est par conséquent plus toxique à concentrations égales.

L'europlum qui est un ion sphérique similaire au calcium peut occuper les sites de complexation de la calmoduline sans détériorer sa structure. L'activité obtenue lors de l'ajout d'europlum, bien que légèrement plus faible que celle obtenue en présence du seul ion calcium, démontre qu'il est capable d'activer la phosphodiesterase contrairement aux actinyles. A très haute concentration, cependant, on constate une baisse d'activité qui s'explique par la précipitation de la protéine en présence d'une telle quantité d'europlum.

Des études spectroscopiques sur les complexes calmoduline-actinyle ont par la suite été menées afin de déterminer la raison de la baisse d'activité observée par ITC. Ces expériences (Spectroscopie IR, DLS et Raman) montrent que la protéine s'ouvre lors de la formation des complexes avec les actinyles mais que la structure de la calmoduline est différente de celle observée en présence de calcium. Bien qu'ouverte, la protéine, n'ayant pas la conformation requise, est alors incapable d'activer l'enzyme et l'inhibe davantage.

L'ajout d'un agent chélatant, comme le 5-LIO(Me-3,2-HOPO), à la solution étudiée par ITC nous a montré qu'un tel ligand, connu pour son affinité élevée pour les actinides, était capable d'extraire les actinides de la protéine et ainsi permettre la récupération de l'activité enzymatique attendue. Ceci montre que malgré l'effet néfaste des ions actinyles sur la réaction enzymatique étudiée, cet effet est réversible.

Afin de compléter les travaux menés lors de cette thèse, une étude spectroscopique plus approfondie de la structure des complexes CaM-An pourrait se révéler intéressante. En effet, cette partie en est restée au stade de l'étude préliminaire et les résultats obtenus ne nous ont pas permis de pointer de manière certaine les raisons de la baisse d'activité enregistrée lors de l'étude ITC. Des calculs de dynamique moléculaire pourraient également compléter les résultats présentés ici en permettant d'observer de manière plus précise les changements de conformations de la protéine après complexation de différents métaux par ses sites de complexation. Enfin, une étude ITC complémentaire en utilisant une enzyme différente pourrait être réalisée afin de déterminer si les complexes CaM-An ont le même effet que celui observé sur la phosphodiesterase. La protéine kinase qui n'est pas activée par la CaM de la même manière (l'enzyme est activée par la CaM mais elle reste ensuite active un moment malgré le départ de la protéine) semble être une candidate crédible pour une étude supplémentaire.

Un passage à l'échelle macroscopique en étudiant la capacité des cellules, contenant la calmoduline, à se multiplier en présence des actinides d'intérêt pourrait s'avérer intéressant.

Annexe A

1. Préparation des solutions mères

Toutes les solutions aqueuses sont préparées à partir d'eau MilliQ ultra-pure (18 M Ω .cm⁻¹).

- **Solution mère de calcium**

La solution mère de calcium(II) à 2 mM a été préparée par dissolution de 4,4 mg de CaCl₂ (Sigma) dans 20 mL d'une solution de tampon (HEPES 50 mM et NaCl 100 mM) à pH 7,4.

- **Solution mère de magnésium**

La solution mère de magnésium(II) à 100 mM a été préparée par dissolution de 190,4 mg de MgCl₂ (Sigma) dans 20 mL d'une solution de tampon (HEPES 50 mM et NaCl 100 mM) à pH 7,4.

- **Solution mère d'uranium(VI)**

Les solutions mères d'uranyle à 10 mM ont été préparées par dissolution de 5 mg de nitrate d'uranyle UO₂(NO₃)₂.6H₂O dans 1 mL d'acide chlorhydrique (1 M Sigma) ou 1 mL d'acide nitrique (1 M Sigma)

Une solution commerciale de nitrate d'uranyle (1000 ppm, Inorganic Venture) a été utilisée pour la préparation des échantillons analysés par ITC.

- **Solution mère d'euporium(III)**

Une solution commerciale d'euporium (1000 ppm, Inorganic Venture) a été utilisée pour la préparation des échantillons analysés par ITC et SLRT.

- **Solution mère de neptunium(V)**

La solution mère de neptunyle à 10 mM a été préparée par dissolution de 25 mg de NpO₂OH.2,5H₂O dans 7,55 mL d'acide chlorhydrique (1 M Sigma). La couleur verte de la solution est caractéristique du neptunium(V), le degré d'oxydation du métal est néanmoins confirmé par analyse UV-visible avant chaque utilisation.

2. Préparation des ligands et des protéines

2.1. Calmoduline

a) *Hybride de la CaM*

La variante à un site du domaine N-terminal de la calmoduline a été synthétisée par Catherine Berthomieu et Sandrine Sauge-Merle (CEA/DSV). Elle a été exprimée et purifiée comme reporté dans la littérature par Pardoux et al.

La protéine a ensuite été lyophilisée dans un tampon d'HEPES (50 mM) à pH 7 avant conservation à -20°C. Le solide est décongelé puis repris dans un volume d'eau MilliQ ultra-pure avant utilisation.

b) *Calmoduline entière*

Une calmoduline commerciale (Sigma Aldrich) a été utilisée pour la préparation des solutions analysées par ITC. Cette protéine est dissoute dans une solution d'HEPES à pH physiologique à la concentration voulue avant utilisation.

Les autres expériences ont été menées en utilisant une CaM recombinante. Cette protéine a été produite par Catherine Berthomieu et Sandrine Sauge-Merle (CEA/DSV), plusieurs dizaines de milligrammes ont également été produits lors d'un séjour au HZDR (Dresde, Allemagne) avec l'aide de Björn Drobot et Johannes Raff.

Le protocole pour l'expression de la protéine et sa purification est également disponible dans la littérature (1).

Comme pour l'hybride, la protéine a été lyophilisée dans un tampon d'HEPES (50 mM) à pH 7 avant conservation à -20°C. La poudre obtenue est décongelée puis reprise dans de l'eau MilliQ ultra-pure avant utilisation.

2.2. Phosphodiesterase (PDE₁)

L'enzyme commerciale (Sigma Aldrich) utilisée pour les études a été dissoute dans une solution d'HEPES à pH 7,4 à la concentration voulue avant son utilisation pour les expériences de calorimétrie.

2.3. Agent chélatant 5-LIO(Me-3,2-HOPO)

Une solution mère de 5-LIO(Me-3,2-HOPO) (1 mM) a été préparée en dissolvant 10,2 mg de solide dans une solution d'HEPES (50 mM).

Annexe B :
Méthodes Expérimentales

1. Spectrophotométrie UV-visible

1.1 Principe

La plupart des métaux possèdent des bandes d'absorption caractéristiques sur un spectre UV-visible. Le neptunium, qui est le seul élément à avoir été étudié par spectrophotométrie UV-visible lors de cette thèse, ne fait pas exception et possède plusieurs bandes spécifiques qui varient en fonction du degré d'oxydation du métal (*Figure 1*).

En plus de permettre la détermination du degré d'oxydation du neptunium, la spectroscopie UV-visible permet également de suivre la complexation du métal par un ligand ou une protéine. En effet, la modification de la sphère de coordination et des niveaux électroniques qui suivent la formation d'un complexe génère des changements sur le spectre d'absorption.

Les travaux menés pendant cette thèse se sont focalisés sur le neptunium au degré d'oxydation 5. Une analyse UV-Vis était donc nécessaire pour vérifier la pureté de notre échantillon avant son utilisation. Le neptunyle (neptunium V) possède une bande spécifique à 980 nm (*Figure 1*), en cas de réduction en neptunium(IV), une bande intense située aux alentours de 700 nm fait son apparition.

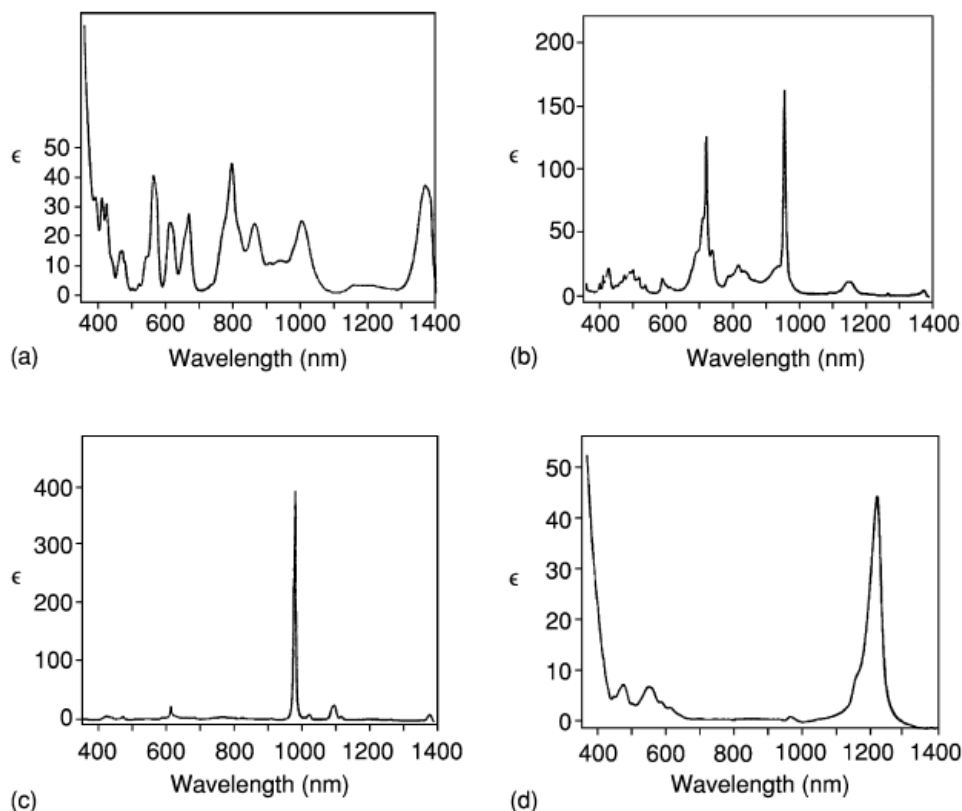


Figure 1 : Spectre d'absorption du neptunium en solution dans du HClO_4 2M : a) Np(III) , b) Np(IV) , c) Np(V) , d) $\text{Np(VI)}(2)$.

La spectrophotométrie UV-visible permet d'obtenir le spectre d'absorption de l'espèce étudiée en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident. L'intensité de ce rayon de lumière est appelé I_0 et l'intensité du faisceau de lumière transmise par l'échantillon d'épaisseur l est appelé I . Il est alors possible de tracer le spectre d'absorbance en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident grâce à la formule suivante :

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I(\lambda)}\right)$$

La concentration de l'échantillon mesuré peut être déterminée par la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot c$. Avec ϵ_λ le coefficient d'absorption molaire, l le chemin optique et c la concentration de l'échantillon. Pour les espèces pures, dont le coefficient d'absorption à une longueur d'onde donnée est connu, on est ainsi capable de déterminer la concentration de l'espèce en solution.

1.2. Instrumentation

Les spectres UV-visible des échantillons de neptunium ont été acquis sur un spectromètre Shimadzu UV-3150 à double faisceau spécialement adapté à la manipulation des échantillons radioactifs en boîte à gants. Des cuvettes en quartz avec un chemin optique de 1 cm ont été utilisées et la gamme de longueur d'onde d'intérêt était de 200 - 1100 nm avec des pas de 0,5 nm et une largeur de fente de 1 nm.

Une ligne de base tampon-tampon a été réalisée avant chaque mesure afin d'annuler toute contribution du tampon sur le spectre d'absorption de nos échantillons.



Figure 2 : Montage expérimental (boîte à gants) pour l'analyse en UV-visible

1.3. Échantillons

Tous les échantillons mesurés par spectrophotométrie UV-visible ont été préparés à pH 7,4 et mesurés à température ambiante (20°C). Une concentration en neptunium de 1×10^{-4} M a été utilisée ainsi qu'une concentration en calmoduline variable. Un tampon HEPES (50 mM) a été utilisé dans chacun de ces échantillon ainsi qu'un sel de fond (NaCl 100 mM).

2. Spectroscopie Laser Résolue en Temps (SLRT)

La SLRT est une technique très utilisée pour l'analyse des lanthanides et des actinides fluorescents. Elle possède plusieurs avantages comme la rapidité d'analyse, la sensibilité (limite de détection très faible pour l'uranium et l'euporium, de l'ordre du μM) et la sélectivité (chaque élément fluorescent est caractérisé par son spectre d'absorption, son spectre de fluorescence et le temps de vie d'un de ses niveaux émetteurs).

2.1. Principe

La luminescence est l'émission d'une radiation en réponse à une absorption d'énergie induite par une excitation. De nombreux types de luminescence existent et se distinguent par la nature de l'excitation et de l'émission radiative. La fluorescence est une forme de luminescence définie par « l'émission de radiation électromagnétique sous l'exposition d'une radiation de même type ayant soit la même énergie (résonance) soit une énergie plus grande ». Dans le cas des An ou des Ln, les temps caractéristiques des émissions sont de l'ordre de la microseconde ou supérieur. La phosphorescence est un processus plus long que la fluorescence qui se produit après un transfert d'énergie vers un état de spin plus élevé (état triplet).

La fluorescence et la phosphorescence sont des processus de relaxation radiatifs qui ont lieu lors de la transition des électrons depuis le niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité dans lequel ils se trouvent vers les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental. Les états électroniques donnant lieu à ces processus sont appelés niveaux émetteurs.

La fluorescence correspond à des transitions entre des états de même spin, son échelle de temps se situe entre 10^{-12} et 10^{-6} s. La phosphorescence est plus lente (typiquement de la milliseconde à la seconde) car elle implique un changement de spin. Dans le cas des An et des Ln, l'émission de radiation s'accompagne d'un changement de spin comme c'est le cas pour la phosphorescence, cependant, les temps de vie sont inférieurs aux temps de vie caractéristiques de la phosphorescence. Le terme luminescence semble plus approprié aux éléments f, néanmoins, c'est le terme fluorescence qui est communément employé.

2.2. Propriété de luminescence de l'euporium

Les bandes d'émission correspondant aux transitions f-f de l'Eu(III) sont étroites et d'intensité relativement faible. L'état fondamental d'Eu(III) est 7F_0 . L'ion libre à une symétrie sphérique, lorsqu'il se trouve en solution. Il subit un abaissement de la symétrie sous l'influence du champ de ligand (champ cristallin) ce qui induit une levée de dégénérescence des niveaux spectroscopiques (*Figure 3*).

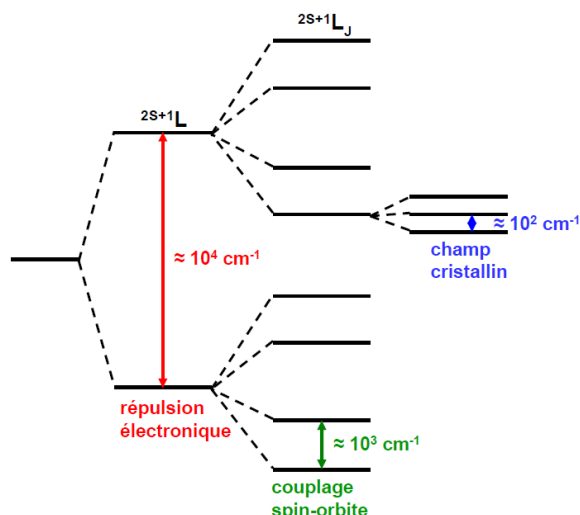


Figure 3 : Diagramme d'énergie et levée de dégénérescence pour un ion Ln^{3+}

Les orbitales 4f des lanthanides sont généralement peu sensibles à la perturbation générée par un champ de ligand, toutefois, certaines transitions (hypersensibles) montrent de grande variation d'intensité en fonction de l'environnement de l'euprium. Les niveaux d'énergie de l'ion Eu^{3+} en solution ainsi que les longueurs d'onde des transitions entre ces mêmes niveaux sont représentés sur la *Figure 4*.

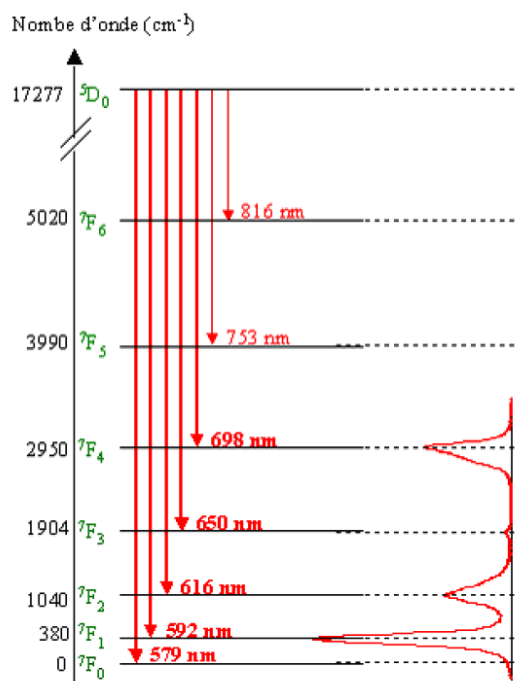


Figure 4 : Niveaux d'énergie de l'ion aquo $Eu(III)$ et transitions associées

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (616 nm) fait partie de ces transitions hypersensibles à l'environnement tout comme la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ (698 nm) mais à un degré moindre.

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (579 nm) est interdite par les règles de sélectivité. Elle possède donc une intensité extrêmement faible.

2.3. Propriétés de luminescence de l'uranium

Tout comme l'euporium, l'uranium possède des propriétés de fluorescence. Ses transitions énergétiques sont représentées sur la **Figure 5**. Le temps de vie de l'uranium en solution (typiquement 2 μ s) est très variable et dépend à la fois de la température (un écart de 5 degrés peut faire varier le temps de vie de 0,5 μ s) mais aussi de la force ionique et la nature du sel de fond. Etant soumis à l'hydrolyse à très bas pH, plusieurs temps de vie peuvent être mesurés même si l'uranyle est seul en solution, les temps de vie des espèces hydrolysées de l'uranyle varient grandement également (voir en Annexe C).

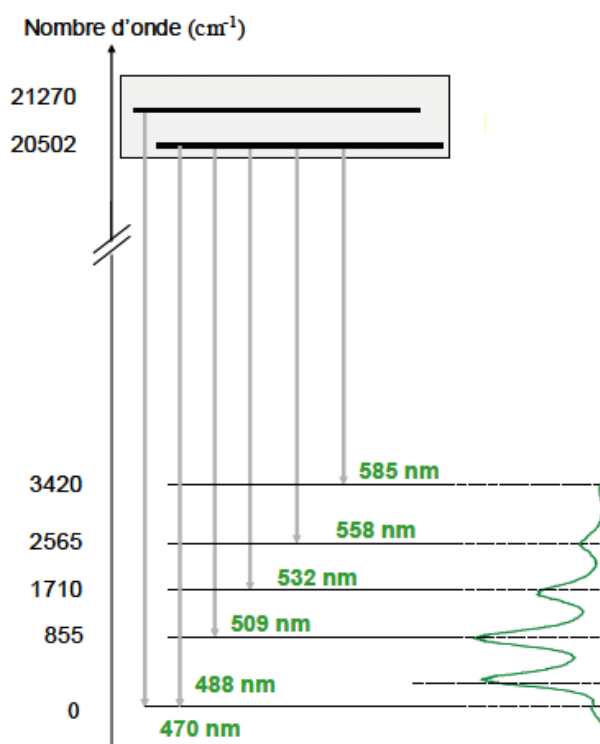


Figure 5 : Emission de fluorescence de l'uranyle

L'aspect particulier du spectre de fluorescence de l'uranyle s'explique par le fait que chaque niveau d'énergie (l'état fondamental compris) se subdivise en plusieurs

niveaux vibrationnels. Le spectre obtenu lors de l'émission de fluorescence qui accompagne le retour à l'état fondamental, reflète la structure vibrationnelle de l'état fondamental de l'uranium que l'on peut observer sur la *Figure 5*.

2.4. Instrumentation

Les expériences SLRT ont été menées en utilisant une source d'excitation laser Nd:YAG (impulsion 7 ns à une fréquence de 10 Hz avec une énergie de 2 mJ) de la société Continuum couplée à un Oscillateur Paramétrique Optique (OPO, Panther, Continuum). La détection est effectuée grâce à un monochromateur Spectra-Pro-300 (Acton Research Corporation) couplé à une caméra CCD (Princeton Instruments). Le faisceau traverse une cuvette en quartz qui contient la solution à analyser avant d'arriver au détecteur. Un système de lentilles et de miroirs focalise le faisceau de fluorescence sur la fente d'entrée du spectrophotomètre qui sélectionne la plage de longueur d'onde à observer. La caméra CCD permet d'ajuster les différents paramètres de mesure pour la résolution en temps : le délai, la largeur de porte, le temps d'intégration et le nombre de spectres. Les spectres sont enregistrés en utilisant le logiciel WINSPEC (Princeton Instruments)

La longueur d'onde d'excitation choisie pour la mesure de l'uranium est de 430 nm et de 395 nm pour la mesure des échantillons d'euporium.

L'erreur sur l'intensité de la fluorescence est inférieure à 5% et la résolution supérieure à 0,2 nm.

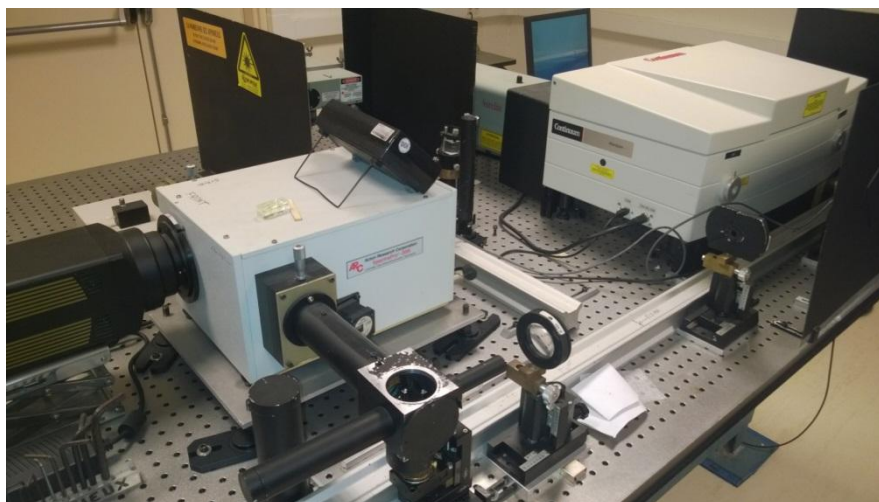


Figure 6 : Montage expérimental utilisé pour les expériences SLRT

2.5. Echantillons

Toutes les mesures d'intensité fluorescente ont été menées sur des échantillons non-aérés et fraîchement préparés à une température ambiante de 20 ± 2 °C. Le pH des solutions a été ajusté à l'aide d'une microélectrode (semimicro, Mettler Toledo, France) et un pH mètre (seven multi, Mettler Toledo, France).

Les échantillons contenant de l'uranyle ont été préparés à une concentration de métal de 4×10^{-5} M et une concentration en protéine de 1×10^{-4} M. Les concentrations en métal et en calmoduline sont constantes pour toute la durée de l'expérience et le pH est la seule variable. Un tampon MES (5 mM) a été utilisé pour la préparation des solutions d'uranyle. Le pH est ajusté à l'aide d'une solution 1 M de NaOH (Sigma).

Les solutions d'euporium sont quant à elles préparées à une concentration en métal de 5×10^{-5} M et une concentration en protéine de 1×10^{-4} M. Tout comme pour l'expérience avec l'uranyle, les concentrations restent constantes lors des mesures et le pH est la seule variable. Le pH est ajusté à l'aide d'une solution 1 M de NaOH (Sigma).

3. Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique utilisée pour l'étude quantitative d'une grande variété d'interactions entre biomolécules. L'ITC est la seule technique capable de déterminer simultanément tous les paramètres de liaison en une seule expérience. La mesure de la chaleur émise par la réaction chimique permet une détermination des constantes de complexation, de la stœchiométrie, de l'enthalpie et de l'entropie de la réaction.

3.1. Principe général

Lors de la réaction chimique, de la chaleur est soit absorbée, soit libérée. Cette quantité de chaleur est directement mesurée grâce à un calorimètre ultrasensible. La chaleur mesurée est associée à un processus donné, ainsi, à pression constante, il est possible d'obtenir l'enthalpie de la réaction chimique suivie (ΔH). Pour des raisons de sensibilité et de précision des résultats les calorimètres utilisés pour ces types de mesures fonctionnent par titration avec une compensation dynamique de puissance, le tout à température constante (isotherme)(3, 4).

De manière générale, la solution contenant la macromolécule est située dans la cellule et la solution de ligand (métal) est située dans la seringue. Le système de contrôle fournit une puissance thermique en continue afin de maintenir la même température dans la cellule de référence et la cellule de mesure. Dès qu'un événement se produit dans la cellule de mesure (complexation, rupture de liaison...), la chaleur à l'intérieur de la cellule est modifiée par le système de contrôle qui va moduler la puissance fournie afin de ramener la température de la cellule de mesure au même niveau que la température de la cellule de référence (remplie par une solution de tampon ou d'eau).

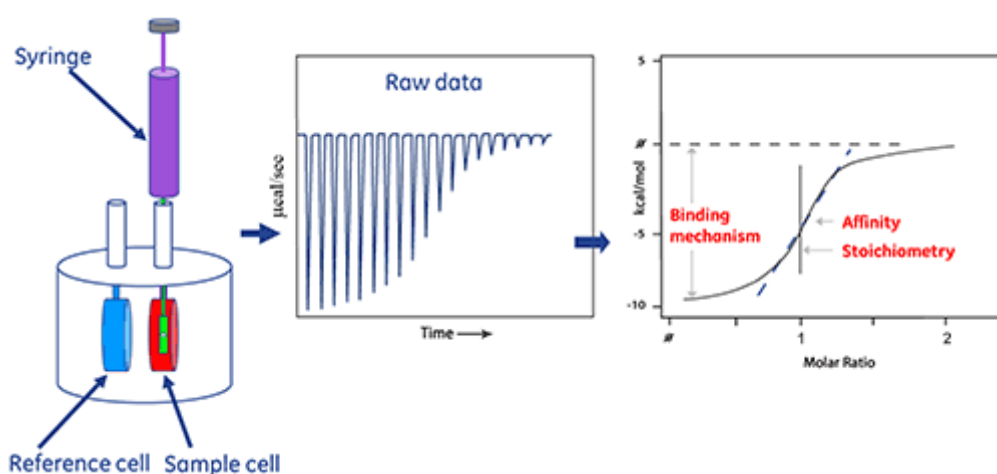


Figure 7 : Principe et fonctionnement de l'ITC

Lors de la mise en place de l'expérience, une séquence d'injection est programmée et la solution de ligand est injectée périodiquement dans la cellule de mesure sous agitation constante. La chaleur associée à chaque injection est proportionnelle à la formation du complexe en solution. La concentration du complexe est calculée en intégrant l'aire située sous la courbe. A la fin de l'expérience, la molécule est saturée par le métal et aucune chaleur n'est produite lors des injections.

En appliquant le modèle approprié lors du traitement des données il est ainsi possible de déterminer la constante d'affinité (K_a), l'enthalpie de liaison (ΔH) et la stœchiométrie en ne réalisant qu'une seule expérience.

3.2. Principe réaction enzymatique

Le même appareil est utilisé pour le suivi de la réaction enzymatique, néanmoins la procédure suivie est différente.

L'activité enzymatique est déterminée en mesurant le changement de puissance thermique fournie par l'instrument à la cellule de mesure après l'addition du substrat (cAMP) par l'intermédiaire de la seringue.

Si la réaction dans la cellule génère de la chaleur (réaction exothermique comme c'est le cas pour notre système) le calorimètre doit fournir moins de puissance pour maintenir la température constante et une déviation négative de la puissance thermique est observée. En revanche, si la réaction consomme de la chaleur, le calorimètre doit fournir de la chaleur supplémentaire pour maintenir les conditions isothermiques et une déviation positive de la puissance thermique est observée (5).

Le changement de puissance observé (dQ/dt) est divisé par le ΔH de la réaction suivie, la concentration enzymatique (qui décroît à chaque ajout) et le volume de la cellule afin d'obtenir la constante catalytique qui correspond à l'activité enzymatique.

Les réactions enzymatiques généralement étudiées par ITC sont des systèmes binaires (Enzyme/substrat), le système étudié lors de cette thèse est un système quaternaire qui met en jeu à la fois le calcium, la protéine (CaM), l'enzyme (PDE₁) et le substrat (cAMP). La concentration de chacun de ces éléments joue sur la chaleur développée par la réaction, d'autant plus que les constantes cinétiques propres à l'enzyme déterminent également quelle concentration en enzyme peut être utilisée en ITC.

Un grand nombre d'expérience sont donc été nécessaires afin d'ajuster la concentration de chaque élément pour déterminer les conditions optimales au suivi de la réaction enzymatique. Les étapes suivantes ont été suivies pour l'optimisation de la réaction enzymatique :

- Les concentrations en magnésium et calcium sont restées constantes (1 mM et 10 μ M respectivement) et ont été choisies afin de se trouver dans des conditions proches des concentrations intra cellulaires pour ces deux métaux.
- La PDE₁ fonctionnant également en l'absence de protéine, la concentration optimale (2 nM) en enzyme a été définie en absence de CaM.

- Plusieurs expériences ont ensuite été nécessaires à l'optimisation de la concentration de protéine. L'ajustement de la concentration en CaM est crucial, en effet, si la concentration est trop faible l'enzyme ne sera pas activé convenablement mais si la concentration est trop élevée les quatre sites de la protéine ne seront pas occupés et la calmoduline ne pourra pas activer l'enzyme.

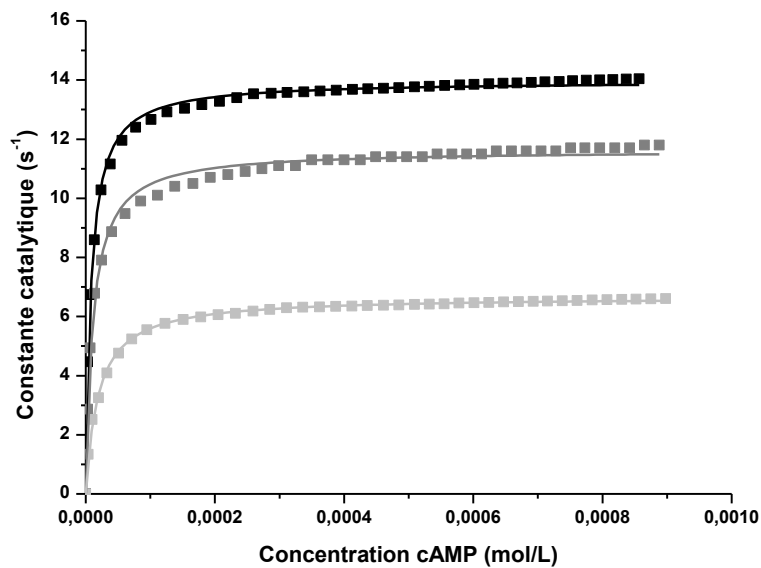


Figure 8 : activité enzymatique en fonction de la concentration en cAMP pour des expériences réalisées à différentes concentration de protéine : 640 nM (gris clair), 320 nM (gris foncé), 160 nM (noir).

	640 nM CaM	320 nM CaM	160 nM CaM
K_M (μM)	$18,5 \pm 0,5$	$11,1 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,2$
k_{cat} (s^{-1})	$6,7 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,3$	$14,0 \pm 0,3$

Tableau 1 : paramètres cinétiques du système avec des concentrations de calmoduline variables

Comme le montre la **Figure 8**, en diminuant la concentration en protéine dans la cellule de mesure, on augmente l'activité enzymatique. Ces résultats indiquent que la concentration en CaM était trop élevée par rapport à la concentration en calcium, et que tous les sites n'étaient pas occupés par le calcium. Par conséquent la protéine ne pouvait pas se retrouver dans la conformation voulue et était donc incapable d'activer l'enzyme. Lorsque que la concentration en protéine diminue, une proportion plus importante de CaM voit ses quatre sites occupés par le calcium d'où une activation de l'enzyme plus importante. L'activité enzymatique la plus élevée est obtenue pour une concentration en CaM de 160 nM et on obtient également un facteur d'activation de

2,9, proche de celui reporté dans la littérature. Une diminution plus importante de la quantité de CaM n'augmente pas davantage l'activité enzymatique et à même tendance à la diminuer, c'est donc une concentration de 160 nM qui sera choisie pour mener la totalité des expériences dont celles en présence d'actinide.

3.3. Echantillons et Instrumentation

Les expériences ont toutes été réalisées sur un NanoITC de chez TA Instruments (Guyancourt, France) installé dans une boîte à gant indispensable à l'utilisation de matière radioactive.

Comme évoqué dans le paragraphe précédent toutes les expériences ont été menées en utilisant les concentrations suivantes :

- 2 nM en enzyme PDE₁
- 160 nM en CaM
- 10 µM en calcium
- 1 mM en magnésium
- Concentration en uranyle variable 50-500 nM
- Concentration en neptunyle variable 30-120 nM
- Concentration en europium variable 630-5000 nM
- Substrat : cAMP 5 mM

Les échantillons ont été préparés à partir des solutions mères décrites dans la première annexe.

Tous les échantillons étudiés par ITC ont été préparés à pH 7,4 dans un tampon composé d'HEPES à 50 mM et d'un sel de fond de NaCl à 100 mM.

La température de mesure fixée par l'appareil est de 30°C pour toutes les mesures.

Une fois l'ITC scellé, il est nécessaire d'attendre la stabilisation du système (30-40 minutes) avant d'entreprendre toute mesure. Le système enzymatique (Ca-CaM-E) étant situé dans la cellule de mesure et le substrat dans la seringue, il a été nécessaire d'ajouter un « bouchon » de tampon (~15 µL) afin d'éviter la diffusion du substrat dans la cellule pendant la phase de stabilisation. De plus, ceci à l'avantage de créer un gradient de concentration à l'intérieur de la seringue ce qui permet d'obtenir un plus

grand nombre de points (meilleure résolution) à basse concentration de substrat qui correspond à la partie la plus importante de la mesure. La concentration réelle ajoutée est ensuite recalculée afin de présenter les résultats représentant l'activité enzymatique en fonction de la concentration de substrat présente en solution.

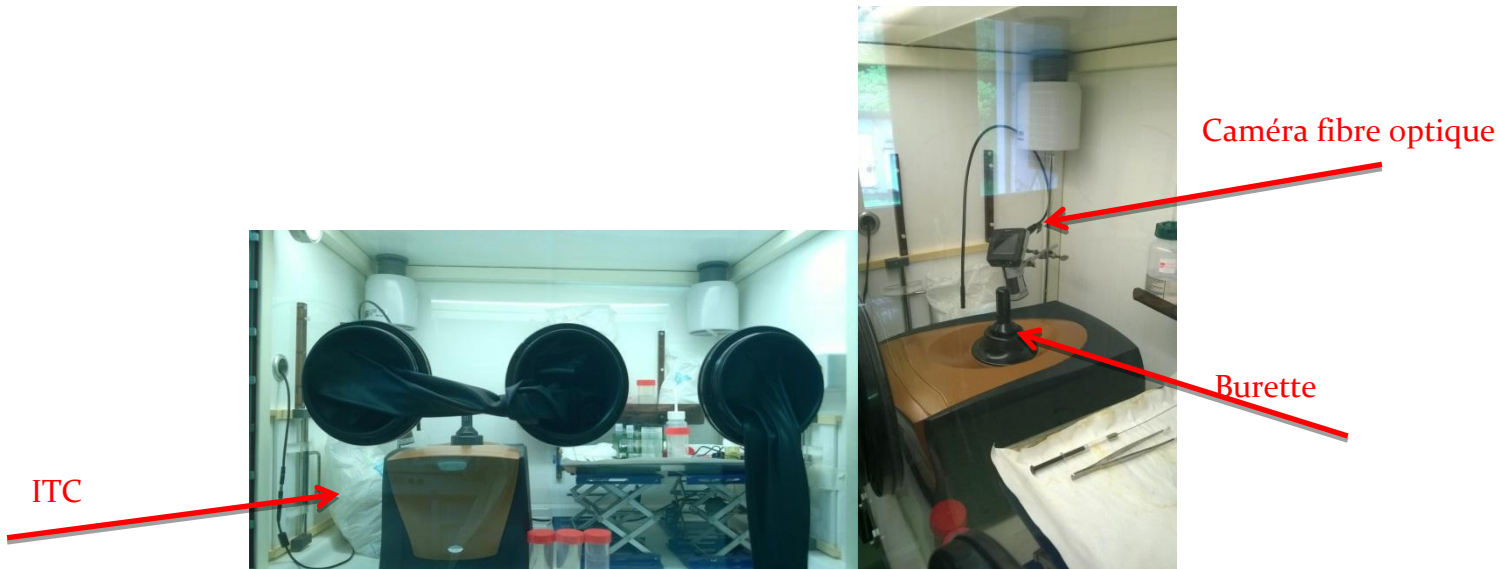


Figure 9 : Montage expérimental et boîte à gants utilisés pour les expériences ITC

Une fois le système stabilisé et à bonne température, des injections de 6 μL de substrat sont effectuées toutes les 240 secondes avec une vitesse d'agitation de 250 rpm.

Les données obtenues sont analysées sur le logiciel NanoAnalysis, et OriginPro est utilisé pour obtenir les paramètres cinétiques relatifs à chacune des réactions enzymatiques étudiées.

4. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

4.1. Principe (6, 7)

La diffusion dynamique de la lumière est une des techniques de diffusion de lumière les plus utilisées car elle est non destructive et permet de connaître la taille de particules de très petite taille (1 nm). C'est la taille (diamètre hydrodynamique), ou la distribution de taille de la CaM qui sera mesurée ici ainsi que le changement de taille observé suite à l'ajout de métal.

Cette méthode utilise la caractéristique ondulatoire de la lumière. Un faisceau lumineux avec une longueur d'onde donnée est envoyé sur l'échantillon contenant les particules à analyser. L'onde électromagnétique va moduler les charges et forcer la particule à se comporter comme un dipôle électromagnétique qui à son tour va générer une nouvelle onde électromagnétique de manière isotropique. Lorsqu'une grande particule est présente en solution, plusieurs dipôles sont générés, chacun émettant une nouvelle onde électromagnétique. Ces ondes peuvent interagir entre elles et soit s'annuler ou s'additionner.

La variation de l'intensité lumineuse diffusée est mesurée au cours du temps en se basant sur le mouvement brownien des particules. Les petites particules en suspension sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement brownien (**Figure 10**). Ce mouvement est modélisé par la relation de Stokes-Einstein (ci-dessous) qui permet le calcul du diamètre hydrodynamique des particules analysées.

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Avec D_h qui représente le diamètre hydrodynamique de la lumière, D_t est le coefficient de diffusion transversal, k_B est la constante de Boltzmann, T correspond à la température et η la viscosité dynamique.

La taille qui est déterminée par diffusion dynamique de la lumière est la taille hydrodynamique, c'est-à-dire la taille d'une sphère qui diffuserait la lumière de la même façon que la particule analysée.

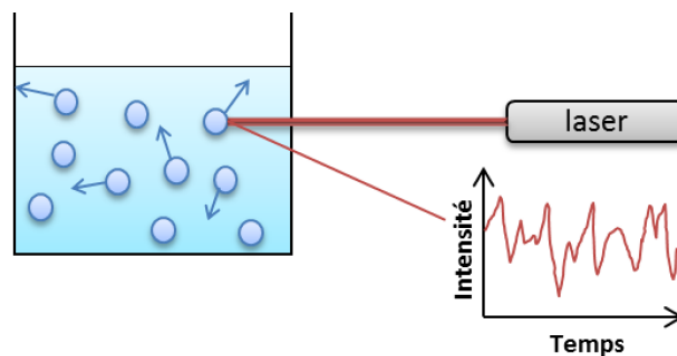


Figure 10 : Principe de la mesure de la diffusion dynamique de la lumière pour un échantillon

Cette technique d'analyse permet une mesure rapide et efficace du diamètre hydrodynamique des particules. Elle est néanmoins très sensible à la présence d'impureté qui peut masquer le signal d'intérêt. En effet, plus une particule est grosse plus l'intensité de la lumière diffusée sera importante, à quantité égale, une particule 10 fois plus grosse qu'une autre diffusera une quantité de lumière plus importante d'un facteur 1 million.

4.2. Instrumentation

Deux appareils différents ont été utilisés lors de cette thèse. Le premier, un Zetasizer Helix (Malvern Instrument) pour analyser les échantillons contenant du neptunyle dont les spécificités vont être décrites ici. Le second, utilisé pour l'analyse des échantillons d'uranyle, est également un Zetasizer Helix mais couplé à un spectromètre Raman. Le principe de la spectroscopie Raman et les spécificités de l'appareil utilisé seront abordés dans le paragraphe suivant.

La source de lumière du Zetasizer Helix est un laser He-Ne (633 nm) avec une puissance maximale de 10 mW. Les échantillons sont déposés dans des cuvettes de 50 μ L en quartz, ou en plastique (pour les échantillons radioactifs), scellées. Chaque mesure est répétée 20 fois pour vérifier la répétabilité des résultats obtenus.

L'analyse des résultats est faite en utilisant le logiciel Zetasizer Helix associé à l'appareil.

4.3. Echantillons

La protéine pure a été préparée dans un tampon d'HEPES (50 mM) à une concentration de 10 mg/mL. Le complexe CaM-Ca a été préparé à la même concentration en protéine et dans les mêmes conditions de pH et de tampon tout en respectant un ratio 1 : 50 en calcium.

Le complexe CaM-neptunyle a été préparé en respectant un ratio de 1 : 8, et une concentration en protéine de 10 mg/mL. L'échantillon a été préparé dans un tampon d'HEPES (50 mM) à pH 7,4 et analysé à une température de 25°C. Un équipement spécifique à la manipulation du neptunium est nécessaire.

Le complexe CaM-uranyle a été préparé en respectant un ratio de 1 : 4 et une concentration en protéine de 10 mg/mL. L'échantillon a été préparé dans un tampon

d'HEPES (50 mM) à pH 6 (afin d'éviter la présence d'un trop grand nombre d'espèce hydrolysée) et analysé à une température de 25°C.

5. Spectroscopie Raman

5.1. Principe

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau par une puissante source lumineuse monochromatique (laser). C'est le principe de diffusion inélastique de la lumière par la matière qui est utilisé ici. L'onde électromagnétique à l'origine de l'excitation du matériau engendre la création d'un dipôle induit. Ce dipôle correspond à une déformation du nuage électronique de l'élément analysé, et c'est cette déformation lors de la vibration qui est à l'origine de la diffusion Raman.

La source d'excitation laser est monochromatique, elle possède une énergie fixe et supérieure à celle des vibrations moléculaires. Suite à l'excitation, la molécule est portée dans un état virtuel (haute énergie et durée de vie courte) comme le montre la **Figure 11**.

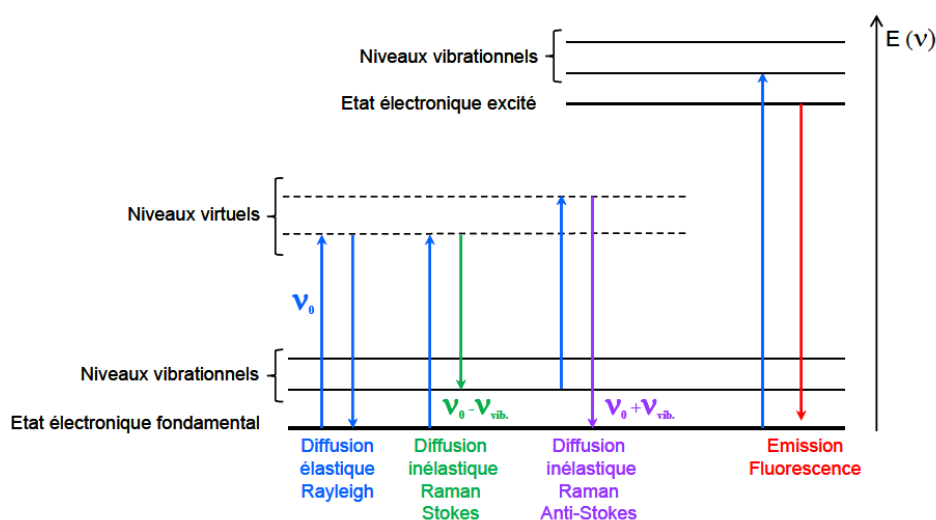


Figure 11 : Différentes transitions énergétiques pouvant avoir lieu lors d'une analyse Raman. ν_0 : fréquence d'excitation laser, ν_{vib} : fréquence de vibration de la molécule analysée.

La radiation réémise par la suite comporte deux types de signaux. Dans le premier cas, largement majoritaire, qui correspond à la diffusion Rayleigh, la radiation incidente est diffusée élastiquement sans changement d'énergie et donc sans changement de longueur d'onde. Dans le deuxième cas, les photons interagissent avec

la matière qui absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes).

Sur un spectre Raman, la bande Rayleigh se situe à la même énergie que le rayon incident, les bandes Stokes se trouvent à plus faibles fréquences tandis que les bandes anti-Stokes sont placés à des fréquences plus élevées.

La variation d'énergie observée nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule étudiée.

5.2. Instrumentation

Un spectromètre Raman couplé à une DLS (Malvern Instruments) a été utilisé pour l'obtention des spectres Raman. Les données ont été collectées en utilisant une source d'excitation laser (785 nm, 280 mW) sur une gamme de 600-1800 cm^{-1} (résolution de 4 cm^{-1}) avec une intégration de 15 secondes et une accumulation de 10 spectres pour chaque mesure.

5.3. Echantillons

Les échantillons qui ont fait l'objet d'analyse par spectrométrie Raman (CaM pure, CaM-Ca et CaM-U) sont les mêmes que ceux analysés par DLS.

6. Spectrométrie Infrarouge

6.1. Principe

La spectroscopie infrarouge est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule. En effet, l'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites « fréquences de groupe » sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée (8).

La spectroscopie infrarouge utilise la capacité des molécules à s'étirer ou à se déformer à des fréquences spécifiques qui correspondent à des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires ou rotationnels (*Figure 12*)). Le champ électromagnétique induit par le rayonnement infrarouge peut interagir avec un moment dipolaire d'une entité moléculaire présente dans le matériau. Lorsque la fréquence de champ coïncide avec la fréquence de vibration d'un mode propre de la molécule, l'interaction créée

engendre la vibration de certaines liaisons et l'absorption de l'énergie de l'onde excitatrice correspondante. La fréquence à laquelle est absorbé le rayonnement dépend de la nature des liaisons, de la masse des atomes concernés et de l'environnement proche du groupement considéré.

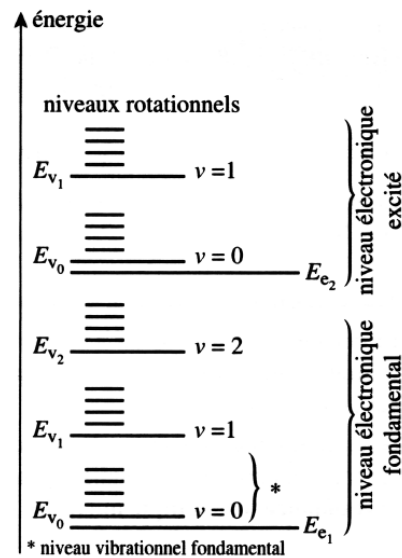


Figure 12 : Niveaux d'énergie d'une molécule

Pour qu'une molécule puisse avoir un spectre infrarouge, elle doit posséder une caractéristique spécifique : un moment électrique dipolaire doit changer lors de l'analyse. Une molécule diatomique hétéronucléaire est donc active vis-à-vis de la spectroscopie infrarouge car son moment dipolaire d'une telle molécule change lorsque la liaison s'étend ou se contracte. Ce n'est pas le cas pour une molécule diatomique homonucléaire car son moment dipolaire reste inchangé.

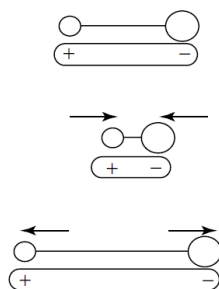


Figure 13 : Changement du moment dipolaire d'une molécule diatomique hétéronucléaire

Pour des molécules plus complexes, il existe deux modes de vibration : les étirements ou élongations (symétriques, antisymétriques) et les déformations (rotation, cisaillement, torsion...). Les étirements sont présents dans la région du spectre allant de 4000 à 1000 cm^{-1} et sont généralement d'intensité élevée. Les vibrations de déformations sont d'intensité plus faible et sont situées dans la région $1000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ du spectre et constituent l'empreinte digitale de la molécule.

Le spectre infrarouge d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau de lumière infrarouge au travers de cet échantillon. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque nombre d'onde.

6.2. Instrumentation

C'est un appareil de type ATR-FTIR (Réflectance Totale Atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier), de modèle Vertex 80/v vacuum spectrometer (Bruker Optics) équipé d'un détecteur mercure/cadmium/tellure qui a été utilisé pour acquérir les spectres infrarouges. L'unité ATR utilisée (DURA SamplIR II de Smiths Inc.) est un diamant horizontal possédant neuf réflexions internes à sa surface et un angle d'incidence de 45° . Une cellule ATR à flux d'un volume de $200\text{ }\mu\text{L}$ a été utilisée pour s'assurer de la soustraction correcte de la ligne de base sans interférence thermique extérieure. Les spectres obtenus sont le résultat de la moyenne de 256 scans et ont été enregistré dans la gamme de nombre d'onde $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

6.3. Échantillons

Les complexes CaM-Np ont été préparés à différents ratio molaire de neptunyle (de 1 : 0 à 1 : 8) avec une concentration en protéine de 5 mg/mL . Tous les échantillons ont été préparés dans du D_2O à pH 7,4 (tampon HEPES 50 mM) à 20°C . La préparation

des solutions s'est faite dans une boîte à gants à atmosphère contrôlée pour éviter toute contamination par H₂O.

Les échantillons de CaM pure et de CaM-Ca (ratio 1 : 50) ont également été préparés à pH 7,4 dans un tampon d'HEPES (50 mM) à une concentration de 10 mg/mL et analysés à 20°C.

Le complexe CaM-U (ratio 1 :4) a lui été préparé dans un tampon d'HEPES (50 mM) à pH 6 (analyse réalisée à 20°C).

7. Ultrafiltration

7.1. Principe

L'ultrafiltration est une méthode de séparation membranaire des molécules en fonction de leur masse moléculaire. La solution contenant les molécules à séparer est disposée sur un filtre possédant un seuil de coupure adapté au système étudié et la séparation s'effectue par centrifugation.

Dans le cas de cette étude, l'ultrafiltration est un moyen de séparer l'uranyle complexé à la protéine (retenu par le filtre) de celui restant en solution (passe à travers le filtre). Le filtrat obtenu est ensuite analysé par ICP-OES, il est donc possible de déterminer le nombre de site de la protéine occupés par les ions actinyles.

7.2. Instrumentation et mode opératoire

Les solutions analysées (500 µl) sont disposées dans des tubes équipés de filtres Microcon (Millipore) avec un seuil de coupure de 10 kDa. Les solutions sont ensuite centrifugées en utilisant une ultracentrifugeuse Minispin plus (Eppendorf) à une vitesse de rotation de 14000 tours par minute pendant 45 minutes. Le filtre est rincé une fois avec 500 µL d'une solution de tampon (HEPES). Cette solution est également centrifugée à 14000 tours par minute pendant 45 minutes.

7.3. Échantillons

Seuls les échantillons contenant de l'uranyle ont été préparés pour cette expérience. Le premier échantillon a été préparé à une concentration de 81 µM en protéine et à un rapport 1 : 2 en uranyle (0,65 mM uranyle).

Une solution ne contenant que de l'uranyle est également préparée dans les mêmes conditions.

8. ICP-OES

8.1. Principe

L'ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy) est une technique analytique à plasma induit qui peut mesurer quantitativement les traces d'un élément en solution. Seuls le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote et les halogènes ne peuvent pas être mesurés par cette technique(9).

L'échantillon (liquide) est vaporisé à l'aide d'un nébuliseur et envoyé dans un plasma d'argon induit à haute température (~8000°C). A cette température, toutes les molécules subissent une atomisation, une ionisation et une excitation thermique ce qui permet leur détection et quantification par un spectromètre à émission optique (OES).

Des longueurs d'ondes caractéristiques sont émises par chaque élément lors de leur retour à l'état fondamental ce qui permet de déterminer la composition de l'échantillon. Une fois émise, la lumière est séparée et mesurée pour donner une mesure d'intensité qui est ensuite convertie en concentration élémentaire (ppm ou ppb) par comparaison avec une droite de calibration établie au préalable (voir plus bas).

8.2. Instrumentation

Toutes les mesures ont été réalisées sur un ICP Agilent 720-ES (Agilent Technology).



Figure 14 : photo de l'ICP Agilent 720-ES utilisé lors de l'analyse

8.3. Échantillons et courbe d'étalonnage

Les solutions obtenues après l'ultrafiltration sont diluées 5 fois dans une solution d'HEPES à pH 6 avant d'être analysées par ICP.

Cinq solutions contenant une quantité connue d'uranium (1-10 ppm) sont préparée puis analysée par ICP afin d'obtenir une courbe d'étalonnage (Figure 14). L'intensité est mesurée pour plusieurs longueurs d'onde caractéristiques (263,5 nm ; 294,2 nm ; 385,5 nm ; 409 nm).

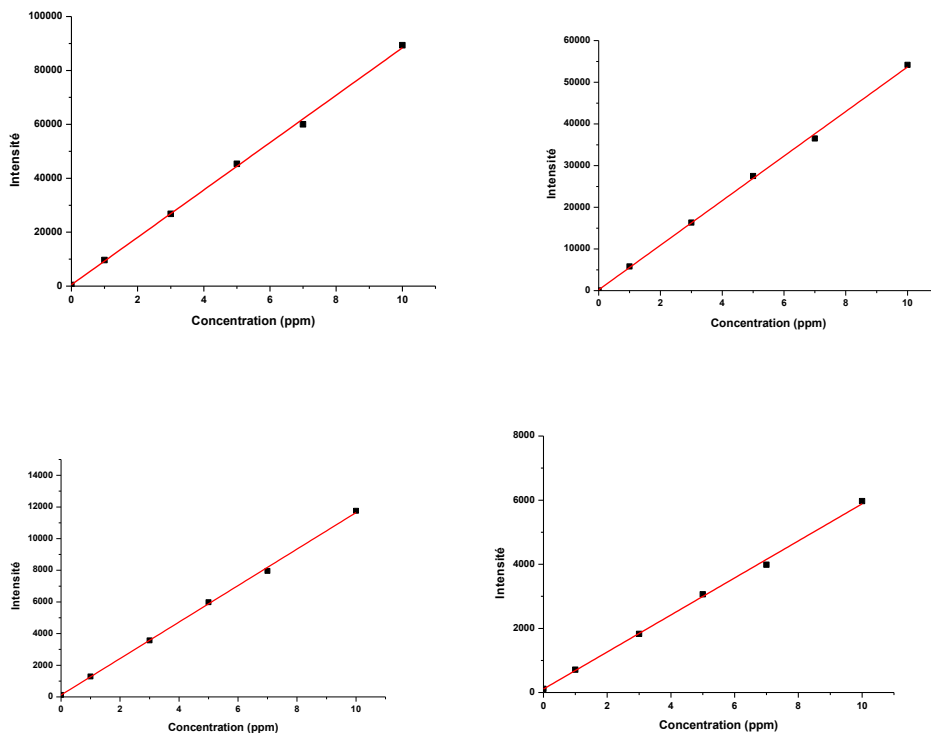


Figure 15 : Droites d'étalonnage aux quatre longueurs d'ondes d'intérêt

La concentration mesurée pour chacun des échantillons sera calculée en mesurant l'intensité à chacune de ces longueurs d'onde d'intérêts.

9. Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Les bases de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont été posées en 1927 par Thomas et Fermi qui calculèrent l'énergie d'un atome en représentant son énergie cinétique en fonction de la densité électronique.

Dans ce modèle, les n électrons dépendants de $3n$ coordonnées d'espace sont remplacés par leur densité $\rho(\vec{r})$ qui ne dépend plus que de trois variables.

L'état fondamental de ce système est décrit par la fonction d'onde $\psi_0(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$ qui correspond à une unique densité électronique $\rho_0(\vec{r})$. Cette fonction d'onde, et l'énergie E_0 qui lui est associée, sont déterminées par la minimisation de l'énergie totale du système. Le potentiel externe $\hat{v}_{\text{ext}}(\vec{r})$ créé par les N noyaux du système est alors complètement déterminé et fixe ainsi l'hamiltonien. Par conséquent, le nombre d'électron n et le potentiel $\hat{v}_{\text{ext}}(\vec{r})$, définissent toutes les propriétés de l'état fondamental. L'énergie de l'état fondamental peut être définie comme une fonctionnelle de $\rho_0(\vec{r})$ ce qui permet alors de déterminer toutes les propriétés de l'état fondamental de la molécule étudiée (10).

Les calculs théoriques accomplis lors de cette thèse (Calculs réalisés par Jérôme Roques et Ernesto Martinez-Baez) ont pour but de minimiser l'énergie totale du modèle « molécule-ion actinyle » créé afin de déterminer quels modèles sont les plus stables énergétiquement et donc les plus susceptibles de se former en solution.

Toutes les structures ont été optimisées en utilisant l'approche DFT implémentée dans Gaussian 09. Les calculs ont été réalisés en utilisant la fonctionnelle hybride B3LYP. Les RECP (relativistic effective core potential) MWB60 Stuttgart ont été utilisés pour décrire les atomes d'uranium et de neptunium, MWB2 pour l'oxygène, l'azote et le carbone et la base de données 6-31G pour l'atome d'hydrogène. Afin de tenir compte des effets du solvant, la solvation a été prise en compte en utilisant un modèle de continuum diélectrique pour la permittivité ($\epsilon_0 = 80$). Le modèle du continuum polarisable (CPCM) a également été implémenté dans Gaussian 09.

10. Spectroscopie d'absorption des rayons X

10.1. Principe général du synchrotron

Le rayonnement utilisé pour la spectroscopie d'absorption des rayons X est produit par un accélérateur de particule (électrons) circulaire aussi appelé synchrotron. Les électrons libres présents dans le synchrotron sont produits par un canon à électron (cathode composé d'un filament de tungstène à très haute température) qui produit un fin faisceau. Les électrons sont ensuite rassemblés par paquets et accélérés avant d'atteindre le LINAC (LINear ACcelerator) qui contient plusieurs cavités accélératrices permettant aux paquets d'électrons d'acquérir une vitesse et une énergie supérieure. En sortant du LINAC, les paquets d'électrons se dirigent vers le booster, en passant par une ligne de transfert qui permet l'ajustement de l'énergie moyenne des différents paquets. Lors de leur arrivée dans le booster (d'une circonférence de 157 m pour le synchrotron SOLEIL) l'énergie des électrons va passer de 100 MeV à 2,75 GeV en 166 ms grâce à une accélération produite par un champ électrique et plusieurs éléments magnétiques (dipôles, quadripôles, sextupôles) disposés le long du parcours des électrons.

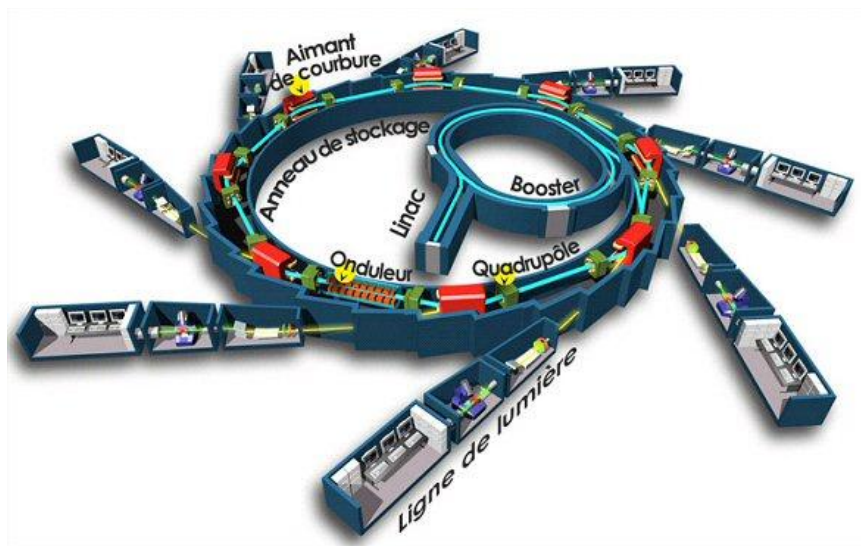


Figure 16 : Schéma du synchrotron SOLEIL et de ses différentes composantes

Une fois l'énergie voulue atteinte, les électrons sont injectés à la vitesse de la lumière dans l'anneau de stockage (périmètre de 354 m) ou ils peuvent être stockés pendant plusieurs heures. L'anneau de stockage est constitué d'une succession de parties droites et incurvées. Des éléments magnétiques (aimants de courbure) sont

situés dans les parties incurvées pour guider les électrons tandis que deux types d'éléments d'insertion (les onduleurs et les wigglers qui servent respectivement à modifier la brillance du rayonnement et sa gamme de longueur d'onde) sont présents dans les parties droites. Ce sont ces différents éléments disposés le long de l'anneau de stockage qui sont à l'origine de la production du rayonnement synchrotron. En effet, à chaque changement de direction du faisceau d'électron relativiste se produit une émission de photons qui composent la lumière synchrotron (bremsstrahlung). Ce rayonnement électromagnétique de photons est alors capté en différents points de l'anneau de stockage puis dirigé vers les lignes de lumières ou il y est modulé en fonction des besoins de l'expérience.

10.2. Principe

L'absorption généralement exprimée en termes de coefficient d'absorption (μ) peut être déterminée à partir de l'atténuation des rayons-X suite à leur passage dans un matériau. Quand l'énergie des photons rayons-X est réglée sur l'énergie de transition d'un électron de cœur (le seuil L_{III} des actinides qui correspond à l'excitation des électrons de l'orbitale $2p_{3/2}$), une augmentation abrupte du coefficient d'absorption est observée (seuil d'absorption). Pour les atomes isolés, le coefficient d'absorption diminue de manière linéaire en fonction de l'énergie au-delà du seuil. En revanche, lorsque les atomes sondés sont à l'intérieur d'une molécule ou intégrés dans une phase condensée, la variation du coefficient d'absorption à des énergies supérieures au seuil expose une structure fine appelée EXAFS (*Figure 17*) qui permet de déterminer les distances entre l'atome sondé et ceux composant son environnement ainsi que la distribution moyenne des atomes voisins. En fonction de l'énergie du photoélectron éjecté, on peut soit observer une diffusion simple (diffusion par un atome voisin) ou bien une diffusion multiple (une diffusion par plusieurs atomes qui est observée pour les ions actinyle à cause de la présence de deux oxygènes axiaux proche de l'atome sondé).

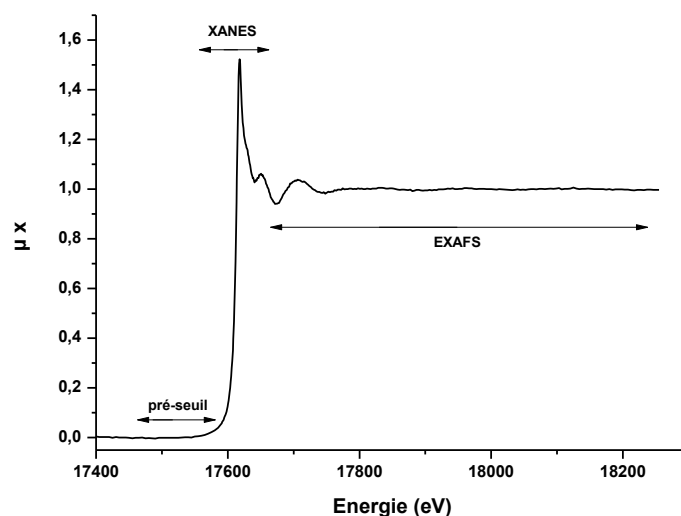


Figure 17 : Spectre d'absorption X au seuil L_{III} du neptunium pour un complexe Np-CaM

Sur la **Figure 17**, on distingue deux zones d'intérêt. La première zone correspondant au XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) comprend une gamme d'énergie allant de 10 eV avant le seuil à 50 eV après le seuil. La partie XANES du spectre d'absorption permet d'obtenir des données d'ordre électronique et structural mais aussi des informations sur le degré d'oxydation de l'élément étudié. Sur la **Figure 17** on voit, par exemple, un épaulement juste après le seuil d'absorption, cet épaulement caractéristique d'un ion $-yle$, est présent à la fois sur les spectres d'absorption X du neptunyle et de l'uranyle. Cette information permet de s'assurer que le neptunium et l'uranium analysés sont respectivement au degré d'oxydation cinq et six. L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) fait en revanche référence aux variations oscillatoires de l'absorption des rayons-X en fonction de l'énergie des photons au-delà du seuil d'absorption et permet d'obtenir des informations structurales comme les distances interatomiques et le nombre de coordination de l'atome absorbeur.

10.3. Conditionnement des échantillons

Les échantillons sont conditionnés dans des cellules dédiées à l'analyse sur synchrotron (52 x 29 x 11 mm). Ces cellules sont fabriquées sur mesure par l'entreprise Canaple.

Les solutions radioactives étudiées sont introduites dans les cellules qui peuvent contenir trois échantillons de 200 μL chacun. La cellule est constituée de trois éléments distincts. Le compartiment interne en Téflon qui est doté de trois fentes indépendantes reliées à des orifices de remplissage. Deux feuilles de Kapton viennent fermer les fentes et sont maintenues par deux plaques en acier situées de chaque côté du bloc en Teflon, ces plaques sont fixées par des vis. L'étanchéité de la cellule est assurée par la présence de joints toriques en Viton. Les orifices de remplissage sont fermés puis scellés avec de la colle pour éviter toute fuite de matière radioactive.

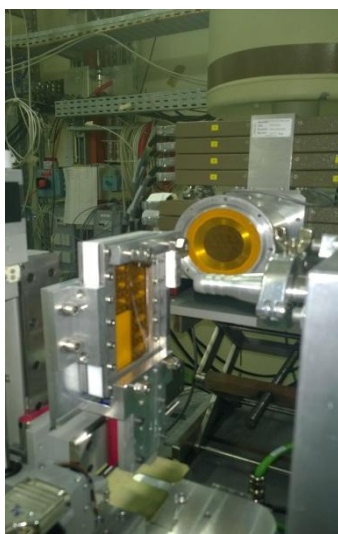


Figure 18: cadre contenant trois cellules en acier installées sur le porte échantillon avec en arrière-plan le détecteur au germanium.

Comme le montre la **Figure 18**, les cellules sont ensuite placées dans un cadre en Teflon fermé par deux fenêtres en Kapton maintenues par deux cadres d'acier fixés par des vis. L'étanchéité de cette couche de confinement est également assurée par des joints en Viton. Le cadre peut contenir quatre cellules pour un total de 12 échantillons maximum.

10.4. Échantillons

Tous les échantillons sont préparés en excès de ligand pour éviter d'avoir des ions libres en solution. La quantité de ligand a été déterminée en utilisant les données thermodynamiques disponibles soit dans la littérature ou calculées lors de cette thèse (constantes de complexation, constantes d'hydrolyse...). Tous les échantillons ont été préparés dans un tampon d'HEPES (50 mM).

Les échantillons de neptunyle ont été préparés à un ratio 1 : 2 (Np : CaM_{WT}) à une concentration en métal de 2×10^{-4} M. L'analyse a été effectuée à deux pH différents (pH 7 et pH 9).

Les échantillons d'uranyle ont également été préparés à deux pH différents, le premier à pH 6 à un ratio 1 : 1,5 (U : CaM_{WT}) et à une concentration en uranium de 2×10^{-4} M, le second échantillon fut préparé à pH 3 à la même concentration d'uranium et à un ratio 1 : 2 (U : CaM_{WT}). A bas pH, l'expérience étant conduite à proximité du pK_A des acides aminés coordinants, la concentration en protéine a été augmentée pour s'assurer de la complexation totale de l'uranyle.

Le degré d'oxydation du métal est contrôlé par XANES lors de chaque analyse. Des expériences additionnelles ont été menées afin de vérifier que le métal pouvait conserver le degré d'oxydation voulu dans les conditions de l'étude et également pour écarter toute interaction entre les métaux étudiés et l'HEPES.

10.5. Instrumentation et acquisition des données

Tous les échantillons étudiés par SAX pendant cette thèse ont été analysés sur la ligne MARS du synchrotron SOLEIL (II). Cette ligne de lumière, dédiée à l'analyse de matériaux radioactifs (Pu, U, Np), s'organise de la manière présentée sur la **Figure 19** : une cabine optique, où arrive le faisceau issu de l'anneau de stockage et dans laquelle se trouve le monochromateur et les miroirs permettant l'ajustement du faisceau, la cabine d'expérience, où sont placés les différents dispositifs de porte échantillons et de détection, et enfin, une station de travail, d'où se font tous les réglages (position de l'échantillon, longueur d'onde du rayon incident...) et d'où sont interprétés les résultats.

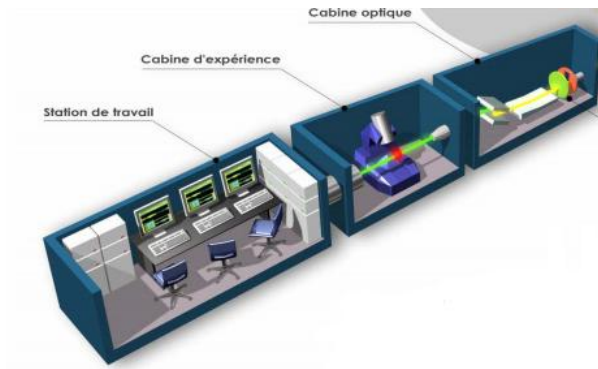


Figure 19 : Schéma d'une ligne de lumière

Les expériences ont été conduites au seuil L_{III} de l'uranium ($E_0=17172,4$ eV) et au seuil L_{III} du neptunium ($E_0=17617,5$ eV) sur la ligne MARS du synchrotron SOLEIL qui fonctionne à 2,75 GeV avec un courant nominal de 430 mA. Les optiques de la ligne de lumière comprennent essentiellement un monochromateur à double cristal (Si 220) refroidi à l'eau, utilisé pour la sélection de l'énergie incidente du faisceau X et sa focalisation horizontale, et deux miroirs réfléchissants en platine (3,1 mrad) également refroidis à l'eau, qui sont eux utilisés pour supprimer les harmoniques d'ordre supérieur et pour la focalisation verticale (12).

Les données sont enregistrées en mode fluorescence avec un détecteur multiélément au germanium (Ortec). Lors de l'analyse d'échantillons radioactifs sur la ligne MARS, au moins une personne doit être présente sur la ligne à toute heure du jour et de la nuit.

Les mesures sont faites à température ambiante dans les cellules spécifiques à la manipulation des actinides qui sont décrites dans le paragraphe précédent.



Figure 20 : cabine de mesure de la ligne MARS de SOLEIL

10.6. Analyse des oscillations EXAFS

Il est dans un premier temps nécessaire d'extraire les oscillations EXAFS à l'aide du code de calcul Athena⁽¹³⁾. La soustraction de la ligne de base est effectuée en utilisant une modélisation linéaire du préseuil. L'absorption atomique est simulée par une fonction spline carrée. Les signaux EXAFS présentés dans cette étude ont été à chaque fois pondérés en multipliant le signal $\chi(k)$ par k^3 .

Le signal EXAFS est constitué de la somme des signaux correspondant à chaque chemin de diffusion pour le photoélectron éjecté.

La formule standard de l'EXAFS exprimée en fonction de nombreux paramètres électroniques et structuraux est présentée ici (14) :

$$\chi(k) = \frac{1}{k} \sum_j \frac{[S_0^2 N_j] |f_j(k, \pi)|}{R_j^2} e^{(-2\sigma_j^2 k^2)} e^{\left(\frac{-2R_j}{\lambda(k)}\right)} \sin(2R_{jk} + \varphi_j(k))$$

$$\text{Avec } R_j = R_{0j} + \text{del}r_j \text{ et } k(\text{\AA}^{-1}) = \sqrt{\frac{2m_e(h\nu - E_0)}{\hbar^2}} \approx \sqrt{0,2625(h\nu - E_0)}$$

Paramètres ajustables lors du traitement des données :

- $S_0^2 N_j$: facteur de réduction de l'amplitude x multiplicité du chemin de diffusion (ou nombre de coordination)
- σ_j^2 : facteur de Debye-Waller
- E_0 : décalage en énergie du seuil
- $\text{del}r_j$: écart entre la distance réelle de l'atome j à l'atome absorbeur et cette distance dans le modèle

Paramètres qui ne sont pas ajustés lors du traitement des données :

- k : module du vecteur d'onde du photoélectron
- $f_j(k, \pi)$: amplitude de rétrodiffusion de l'atome j
- $\lambda(k)$: libre parcours moyen du photoélectron
- R_{0j} : distance de l'atome j à l'atome absorbeur dans le modèle
- $\varphi_j(k)$: phase de rétrodiffusion de l'atome j

Lors du traitement des données EXAFS, les paramètres structuraux du composé modèle sont ajustés jusqu'à ce que les oscillations EXAFS théoriques du modèle reproduisent le plus fidèlement possible le signal EXAFS expérimental.

Les modèles choisis qui ont été optimisés grâce à des calculs DFT, sont présentés dans le chapitre 2. Les phases et amplitudes de ces modèles ont été calculées à l'aide du code Feff8.2(15).

Les oscillations EXAFS obtenues subissent ensuite une transformée de Fourier (TF) qui nous permet de revenir dans l'espace réel. L'amplitude de la TF représente la pseudo-distribution radiale des contributions des atomes voisins de l'atome absorbeur. Les données EXAFS ont toutes été ajustées dans cet espace (espace R) à l'aide du code de calcul Artemis sans utilisation de filtre supplémentaire⁽¹³⁾. Le calcul de la transformée de Fourier s'est fait dans une fenêtre de type Hanning en k^3 (2 ; 12). Les paramètres tels que S_0^2 et E_0 sont donnés pour chaque expérience. Le facteur R (r) et le facteur de qualité χ^2 -réduit ($\chi^2_{i/m}$) sont tous deux fournis comme indication de la qualité de l'ajustement dans l'espace R.

Annexe C :

**Données thermodynamiques et
spectroscopiques**

1. Données thermodynamiques

1.1. Constantes d'hydrolyse de l'uranyle

Équilibre	Log $\beta(16)$
$\text{UO}_2^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2\text{OH}^+ + \text{H}^+$	-5.25
$\text{UO}_2^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$	-12.15
$\text{UO}_2^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})_3^- + 3\text{H}^+$	-20.25
$2\text{UO}_2^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+} + 2\text{H}^+$	-5.62
$3\text{UO}_2^{2+} + 5\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+ + 5\text{H}^+$	-15.55

Tableau 1 : constantes d'hydrolyse de l'uranyle

1.2. pK_A des acides aminés de la CaM

Acides aminés	$\text{pK}_A(17)$
Acide aspartique (D)	$2,28 \pm 0,03$
Lysine (K)	$1,70 \pm 0,07$
Glycine (G)	$2,32 \pm 0,01$
Tyrosine (Y)	$2,22 \pm 0,01$
Isoleucine (I)	$2,30 \pm 0,01$
Thréonine (T)	$2,15 \pm 0,02$
Acide glutamique (E)	$2,16 \pm 0,02$
Alanine (A)	$2,33 \pm 0,01$
Asparagine (N)	$2,12 \pm 0,02$
Phénylalanine (F)	$2,18 \pm 0,02$
Proline (P)	$1,96 \pm 0,03$

Tableau 2 : pK_A des acides aminés de la CaM

1.3. Diagramme de spéciation de l'uranyle seul en solution

Grâce aux constantes d'hydrolyse de l'uranyle exposées au début de cette Annexe, il est possible de tracer le diagramme de spéciation de l'uranyle en fonction du pH. Deux diagrammes sont présentés ici, chacun correspondant à une concentration utilisée pour la réalisation de l'expérience de suivi de la réaction enzymatique par ITC.

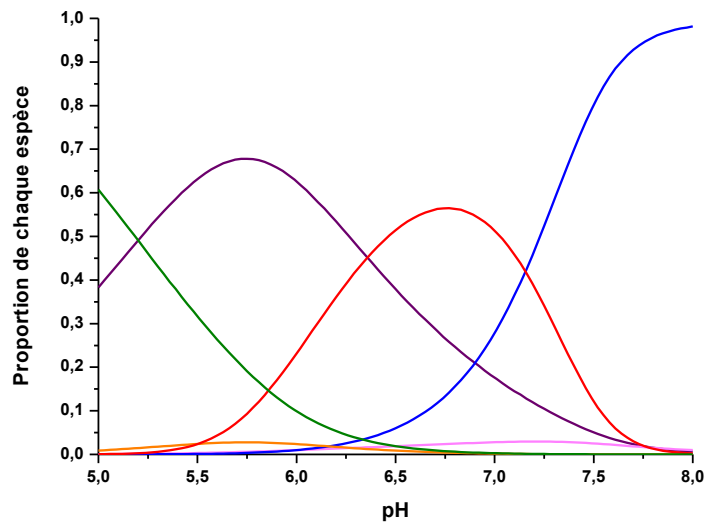


Figure 1 : Diagramme de spéciation de l'uranyle en fonction du pH avec une concentration en métal de 500 nM. Uranyle libre (ligne verte), $(UO_2)_3(OH)_5^-$ (ligne rouge), $UO_2(OH)_3^-$ (ligne bleue), $UO_2(OH)_2$ (ligne rose), $UO_2(OH)^+$ (ligne violette) et $(UO_2)_2(OH)^{2+}$ (ligne orange)

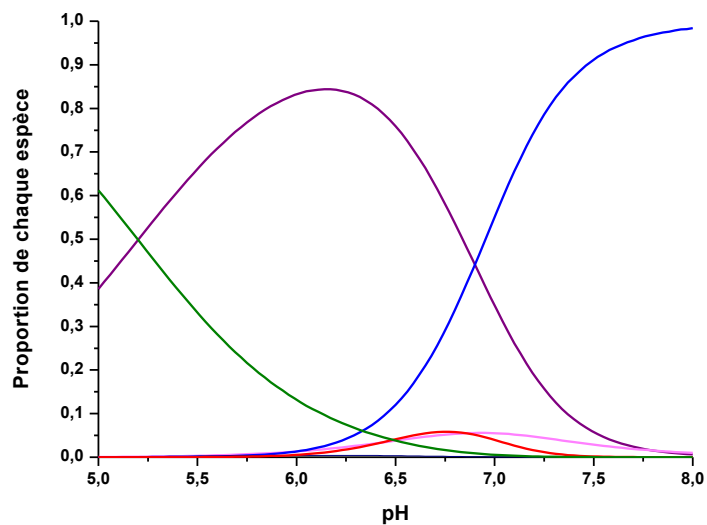


Figure 2 : Diagramme de spéciation de l'uranyle en fonction du pH avec une concentration en métal de 50 nM. Uranyle libre (ligne verte), $(UO_2)_3(OH)_5^-$ (ligne rouge), $UO_2(OH)_3^-$ (ligne bleue), $UO_2(OH)_2$ (ligne rose) et $UO_2(OH)^+$ (ligne violette)

2. Temps de vie et spécificités spectrales de l'uranium (VI) (18)

Les temps de vie, obtenus par SLRT, de différentes espèces de l'uranium sont reportés dans le tableau suivant en compagnie de leurs bandes caractéristiques et de leur largeur à mi-hauteur. Bien que le temps de vie d'une espèce soit dépendant de la composition de la solution dans laquelle il est mesuré (force ionique) et de sa température, il existe néanmoins des temps considérés comme caractéristiques pour chaque espèce. Les différents temps de vie reportés dans le tableau correspondent à des conditions expérimentales différentes (force ionique, température).

Espèce	Longueur d'onde (nm)	Largeur à mi-hauteur (nm)	Temps de vie (μ s)
UO_2^{2+}	470-488-509-533-559-588	12-13-13-14	2 1,7 0,9
UO_2OH^+	480-497-519-544-570-598	14-16-16-19	80 32
$\text{UO}_2(\text{OH})_2$	488-508-534-558	19-21-21-23	10-20 3,2
$\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$	482-499-519-543-567-594	18-24-24-27	0,8 0,4
$(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$	480-497-519-542-570-598	14-18-17-20	9 9,5 2,9
$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$	479-496-514-535-556-584	16-20-20-25	23 6,6 7
$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_7^-$	503-523-547-574	21-23-25-26	230 10

Tableau 3 : Temps de vie des espèces hydrolysées de l'uranyle et bandes spécifiques

3. Constantes d'hydrolyse de l'euprium

Équilibre	Log β (19)
$\text{Eu}^{3+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Eu}(\text{OH})^{2+} + \text{H}^+$	5,6
$\text{Eu}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Eu}(\text{OH})_2^+ + 2\text{H}^+$	10,7
$\text{Eu}^{3+} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Eu}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+$	15,7
$\text{Eu}^{3+} + 4 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Eu}(\text{OH})_4^- + 4\text{H}^+$	17,7

Tableau 4 : constantes d'hydrolyse de l'euprium

Bibliographie : Annexes

1. R. Pardoux *et al.*, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS ONE*. **7**, e41922 (2012).
2. Z. Yoshida, S. G. Johnson, T. Kimura, J. R. Krsul, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 699–812.
3. E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, Isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.***62**, 950A–959A (1990).
4. D. E. Wilcox, Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica Chim. Acta.* **361**, 857–867 (2008).
5. M. J. Todd, J. Gomez, Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? *Anal. Biochem.***296**, 179–187 (2001).
6. B. Chu, in *Soft Matter Characterization*, R. Borsali, R. Pecora, Eds. (Springer Netherlands, 2008), pp. 335–372.
7. B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* (Courier Corporation, 1976).
8. B. Stuart, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (John Wiley & Sons, Inc., 2000).
9. A. Montaser, D. W. (eds) Golightly, Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry (1987).
10. R. G. Parr, Density Functional Theory of Atoms and Molecules, 5–15 (1980).
11. B. Sitaud, P. L. Solari, S. Schlutig, I. Llorens, H. Hermange, Characterization of radioactive materials using the MARS beamline at the synchrotron SOLEIL. *J. Nucl. Mater.***425**, 238–243 (2012).
12. P. L. Solari, S. Schlutig, H. Hermange, B. Sitaud, MARS, a new beamline for radioactive matter studies at SOLEIL. *J. Phys. Conf. Ser.***190**, 12042 (2009).
13. B. Ravel, M. Newville, ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.***12**, 537–541 (2005).
14. B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1986; <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-50031-2>), vol. 9 of *Inorganic Chemistry Concepts*.

15. J. J. Rehr, R. C. Albers, Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure. *Rev. Mod. Phys.* **72**, 621–654 (2000).
16. I. Grenthe *et al.*, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger, Eds. (Springer Netherlands, 2010), pp. 253–698.
17. K. Včeláková, I. Zusková, E. Kenndler, B. Gaš, Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. **25**, 309–317 (2004).
18. C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation. *Appl. Spectrosc.* **52**, 528–535 (1998).
19. G. Plancque, V. Moulin, P. Toulhoat, C. Moulin, Europium Speciation by Time Resolved Laser Induced Fluorescence. *Analytica Chimica Acta.* (**478**), 11–22 (2003).

Titre : Mécanisme d'interaction des actinides avec une protéine : la calmoduline

Mots clefs : Actinides, Protéine, Calmoduline, Contamination, EXAFS, ITC

Résumé : Suite aux conséquences environnementales provoquées par l'accident nucléaire de Fukushima, il est fondamental d'étudier les mécanismes gouvernant les effets des radionucléides sur la biosphère et ainsi identifier les processus moléculaires responsables du transport et de la déposition d'actinides comme le neptunium et l'uranium. Cependant, les informations concernant l'aspect microscopique des interactions entre actinide et molécules biologiques sont rares. Les données publiées étant majoritairement issue d'études *in vivo*, la structure des sites de coordination et l'effet de cette complexation sur les fonctions des protéines restent encore à découvrir.

La calmoduline (CaM), qui est connue pour son affinité envers les actinides, agit comme un régulateur métabolique du calcium. Cette protéine, qui est présente de manière ubiquitaire dans le corps humain, peut également complexer d'autres métaux comme les actinides. Ainsi, en cas de contamination interne, les actinides complexés à la protéine pourraient l'empêcher de fonctionner correctement et donc avoir des

répercussions sur un grand nombre de fonctions vitales pour l'organisme.

La complexation du Np et de l'U par la CaM a été étudiée par spectroscopie EXAFS ce qui nous a permis de montrer que les actinides sont incorporés au site de complexation du calcium. Une fois les aspects structuraux et thermodynamiques étudiés, c'est l'impact de cette complexation sur les fonctions de la protéine qui a été étudié.

Afin d'évaluer les conséquences de la complexation, une méthode calorimétrique basée sur une réaction enzymatique (Phosphodiesterase) a été développée. Ces expériences réalisées avec des concentrations variables d'actinides (30-500 nM) montrent une diminution de l'activité enzymatique lorsque la concentration d'actinide augmente. Les résultats montrent que le complexe CaM-An agit comme un inhibiteur enzymatique. De plus, on observe qu'à haute concentration en actinide, le complexe CaM-métal agit comme un poison et tue complètement l'activité enzymatique.

Title: Interaction mechanism between actinides and a protein: the calmodulin

Keywords: Actinides, Protein, Calmodulin, Contamination, EXAFS, ITC

Abstract: Considering the environmental impact of the Fukushima nuclear accident, it is fundamental to study the mechanisms governing the effects of the released radionuclides on the biosphere and thus identify the molecular processes generating the transport and deposition of actinides, such as neptunium and uranium. However, the information about the microscopic aspect of the interaction between actinides and biological molecules (peptides, proteins...) is scarce. The data being mostly reported from a physiological point of view, the structure of the coordination sites remains largely unknown. These microscopic data are indeed essential for the understanding of the interdependency between structural aspect, function and affinity.

The Calmodulin (CaM) (abbreviation for CALcium-MODULated proteIN), also known for its affinity towards actinides, acts as a metabolic regulator of calcium. This protein is a Ca carrier, which is present ubiquitously in the human body, may also bind other metals such as actinides. Thus, in case of a contamination, actinides that bind to

CaM could avoid the protein to perform properly and lead to repercussions on a large range of vital functions.

The complexation of Np and U was studied by EXAFS spectroscopy which showed that actinides were incorporated in a calcium coordination site. Once the thermodynamical and structural aspects studied, the impact of the coordination site distortion on the biological efficiency was analyzed.

In order to evaluate these consequences, a calorimetric method based on enzyme kinetics was developed. This experiment, which was conducted with both uranium (50 – 500 nM) and neptunium (30 – 250 nM) showed a decrease of the heat produced by the enzymatic reaction with an increasing concentration of actinides in the medium. Our findings showed that the Calmodulin-actinide complex works as an enzymatic inhibitor. Furthermore, at higher neptunium (250 nM) and uranium (500 nM) concentration the metals seem to have a poison-like behavior and “kill” completely the enzymatic activity.