



HAL
open science

Identification de protéines impliquées dans le devenir de l'uranium dans la plante *Arabidopsis thaliana* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Benoit Revel

► To cite this version:

Benoit Revel. Identification de protéines impliquées dans le devenir de l'uranium dans la plante *Arabidopsis thaliana* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV004 . tel-04846099

HAL Id: tel-04846099

<https://theses.hal.science/tel-04846099v1>

Submitted on 18 Dec 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie végétale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Benoît Revel

Thèse dirigée par **Claude Alban**, DR INRAE, CEA Grenoble et codirigée par **Jacques Bourguignon**, Ingénieur-Chercheur CEA, CEA Grenoble préparée au sein du **Laboratoire de physiologie cellulaire et végétale** dans l'**Ecole Doctorale Chimie et Science de Vivant**.

Identification de protéines impliquées dans le devenir de l'uranium dans la plante *Arabidopsis thaliana* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Thèse soutenue publiquement le **20 Janvier 2021**,
devant le jury composé de :

Madame Virginie CHAPON

Ingénieur-Chercheur CEA, CEA Cadarache, Rapportrice

Madame Agnès HAGEGE

CR CNRS, Villeurbanne, Rapportrice

Monsieur Sébastien THOMINE

DR CNRS, Gif-sur-Yvette, Examinateur

Madame Pascale DELANGLE

Ingénieur-chercheur CEA, CEA Grenoble, Examinatrice

Monsieur Jean-Gabriel VALAY

Professeur des Universités, UGA, Président du jury

Monsieur Claude ALBAN

Directeur de recherche INRAE, CEA Grenoble, Directeur de thèse



*A mon grand-père, Claude,
qui ne verra jamais le résultat de ce travail ...*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Claude Alban, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré durant cette aventure de la meilleure façon possible. Tu as été un pilier pour moi dans cette aventure, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Tu as toujours été présent et à l'écoute. Je souhaite à beaucoup d'étudiants d'être encadrés par quelqu'un comme toi. Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse Jacques Bourguignon, qui m'a apporté de nombreuses connaissances sur la bioremédiation et, plus largement, les stress métalliques. Je vous remercie aussi tous les deux pour m'avoir toujours soutenu dans ce que je voulais entreprendre. Je continue de penser que pour que la thèse soit une bonne expérience, une des conditions majeures est d'avoir un bon encadrement et aujourd'hui je peux dire que j'en garderais un bon souvenir.

Je remercie ensuite les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mes travaux. Je remercie le CEA pour m'avoir accordé un financement CFR, l'ANR GreenU ainsi que la direction du laboratoire LPCV, Eric Maréchal et François Parcy pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans de bonnes conditions.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont rendu ce travail possible. Patrice Catty, je te remercie pour ton expertise de levuriste, m'avoir permis de travailler sur les levures et d'utiliser les installations de ton laboratoire qui est devenu, en quelques sortes, mon laboratoire secondaire. Les discussions avec toi ont toujours été constructives, agréables et passionnantes. Tu as toujours trouvé du temps à m'accorder malgré tes grandes responsabilités et je suis très heureux d'avoir pu travailler avec quelqu'un d'aussi charismatique que toi. Thierry Rabilloud, je te remercie pour ton expertise en séparation protéique et je retiens ton franc parler. Je remercie également la plateforme RMN biomoléculaire composée de Bernhard Brutscher, Adrien Favier et Alicia Vallet. Vous avez su me transmettre une partie de votre passion pour cette technologie complexe qu'est la RMN. J'aurais aimé avoir plus de temps pour m'y intéresser de plus près.

Je tiens ensuite à remercier l'équipe « Plantes, Stress et Métaux » pour tout ce qu'on a pu partager durant ces trois années de thèse. Stéphane, le courant n'est peut-être pas toujours passé entre nous, néanmoins, j'ai beaucoup apprécié plusieurs moments que nous avons partagé, notamment le congrès à Varsovie ou ma première utilisation de l'ICP-MS. Jacqueline, je te remercie pour les nombreuses manip que nous avons faites ensemble. Je retiens surtout tes quasi-légendaires touches d'humour, qui, à défaut d'être drôles, ont le pouvoir si singulier

d'enseigner une journée. Anne-Marie, je retiens que j'ai réalisé les premières expériences de ma thèse avec toi et je te remercie pour l'ouverture d'esprit culturelle que tu as pu m'apporter. Sylvie, je pourrais te remercier pour le maintien opérationnel de tout le plateau technique de plantes mais que je n'ai finalement jamais utilisé. Je retiens ta créativité pour résoudre les problèmes et la citation « S'il n'y a pas de solution, c'est qu'il n'y a pas de problème » te définit parfaitement.

Je remercie ensuite mes compagnons d'aventure. Manon, ton implication sans relâche dans ton sujet de thèse (qui te donne beaucoup de fil à retordre) m'a réellement impressionné. Tu resteras pour moi un exemple de ténacité et surtout, une amie. Chérif, tu m'auras appris d'innombrables notions scientifiques, politiques et culturelles pour essayer de combler mon ignorance parfois béante mais ce que tu m'auras le mieux appris c'est à garder mon sang-froid.

Je remercie ensuite le « secrétariat ». Sophie, Tiffany et Alexandre, je ne parlerais pas de l'excellent travail que vous faites mais plutôt de la belle amitié que l'on a nouée. Sophie, tu es probablement la meilleure rencontre que j'ai pu faire à Grenoble (le mot est lâché). Je remercie aussi Manu pour toutes les activités organisées et les moments partagés, saches que ça fait beaucoup de bien de rencontrer des gens qui partagent la même passion avec autant d'intensité.

Je remercie également mes amis, Nathan, David, Léo et Louis qui, malgré la distance, m'ont été d'un grand soutien dans cette aventure.

Je remercie également mes amis « doctorant – manager », Katia, Lucas, Rémi et Phoulinh qui ont choisi, comme moi, de s'aventurer dans un parcours « non-conventionnel ».

Enfin, je tiens à remercier mes parents et ma sœur pour m'avoir soutenu tout au long de ma thèse (et de ma vie !) et plus largement toute ma famille qui, je le reconnais, est merveilleuse.

Table des matières

I- Introduction générale	7
I - 1. Généralités sur l'uranium.....	8
i. Histoire de l'uranium	8
ii. Propriétés physico-chimiques	8
I - 2. Utilisation de l'uranium.....	11
i. Civile	11
ii. Militaire.....	13
I - 3. Pollution par l'uranium	14
i. Principales sources de pollution.....	14
ii. Risques pour la santé humaine.....	15
iii. Stratégies de dépollution : vers la bioremédiation	16
I - 4. Devenir de l'uranium dans la plante : état de l'art.....	21
i. Transport de l'uranium dans la plante.....	21
ii. Mécanismes de toxicité et de tolérance de la plante aux ions métalliques toxiques.....	25
iii. Mécanismes de toxicité et de tolérance de l'uranium dans la plante	28
I - 5. Objectifs de la thèse.....	31
II - Identification de transporteurs permettant l'entrée de l'uranium dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	33
I - 1. Introduction	34
I - 2. Résultats	36
i. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> est capable d'absorber l'uranium.....	36
ii. L'absorption d'uranium nécessite une source d'énergie.....	36
iii. L'entrée d'uranium dans la levure nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle.....	39
iv. L'entrée de l'uranium dans la levure entre en compétition avec le fer, calcium et cuivre.....	40
v. Les systèmes d'absorption de haute affinité de calcium et de fer sont impliqués dans l'absorption d'uranium.....	41
I - 3. Discussion	45
i. La levure est capable d'absorber l'uranium, l'adsorption pariétale reste majoritaire.....	45
ii. L'importance de la biodisponibilité de l'uranium pour son absorption.....	46
iii. L'absorption d'uranium dans la levure dépend de la disponibilité d'un substrat énergétique et nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle	47
iv. Les voies d'absorption du fer et du calcium sont impliquées dans l'absorption d'uranium dans <i>S. cerevisiae</i>	48

I - 4. Matériels et méthodes	56
i. Souches de levure, bactéries et plasmides utilisés	56
ii. Conditions de culture des levures	57
iii. Cinétiques d'incorporation d'uranium	57
iv. Quantification de l'uranium	58
v. Comptage et viabilité cellulaire	58
vi. Transformation des levures	58
vii. Analyses statistiques.....	59
 III - Développement d'approches biochimiques permettant l'identification de protéines fixatrices d'uranium (UBP) et analyse structurale de GRP7, une UBP candidate	60
I - 1. Introduction	61
I - 2. Résultats	63
i. Mise en place d'un protocole optimisant la fixation <i>in vivo</i> de l'uranium aux protéines intracellulaires des cellules d' <i>A. thaliana</i>	63
ii. Deux stratégies de fractionnement chromatographique distinctes.....	65
iii. Stratégie I : Vers une étude exhaustive des protéines fixant l'uranium <i>in vivo</i>	67
iv. Stratégie II : Vers une identification des protéines les plus affines pour l'uranium <i>in cellulo</i> ...	73
v. Production et purification de GRP7 recombinante	77
vi. Analyse structurale de la protéine 6His-GRP7.....	78
vii. Purification de GRP7 recombinante sans étiquette	80
viii. Analyse de l'affinité de GRP7 pour l'uranium	81
ix. Analyse structurale de GRP7	83
x. Production et purification de GRP7 marquée au ¹³ C et ¹⁵ N.....	84
I - 3. Discussion	86
i. Optimisation de l'entrée d'uranium dans les cultures cellulaires d' <i>A. thaliana</i>	86
ii. Approches utilisées pour l'identification d'UBP	87
iii. Stratégie I : Vers une étude exhaustive des UBP	89
iv. Stratégie II : Vers l'identification des protéines les plus affines pour l'uranium.....	92
v. Identification de 53 UBP candidates, toutes approches confondues.....	92
vi. GRP7 recombinante est capable de lier l'uranium	98
vii. Une fixation de l'uranium au niveau de la zone structurée de GRP7 ?.....	99
I - 4. Matériel et méthodes	101
i. Matériel biologique utilisé et conditions de culture	101
ii. Extraction des protéines solubles de cellules d' <i>A. thaliana</i>	101
iii. Séparation protéique sur colonnes chromatographiques	102
iv. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	103
v. Analyse des protéines par électrophorèse bidimensionnelle en conditions dénaturantes	103

vi.	Quantification des protéines	104
vii.	Quantification des métaux par ICP-MS	104
viii.	Identification des protéines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).....	105
ix.	Production et purification de GRP7 recombinante.....	106
x.	Etude de l'affinité de GRP7 pour l'uranyle	108
xi.	Spectroscopie de Résonance magnétique Nucléaire (RMN structurale liquide)	109
IV -	<i>Conclusion générale et perspectives</i>	110
V -	<i>Références</i>	118
VI -	<i>Publications et présentations</i>	143
VII -	<i>Annexes</i>	144

I - Introduction générale

I - 1. Généralités sur l'uranium

i. Histoire de l'uranium

En 1789, l'oxyde d'uranium est découvert par le chimiste prussien Klaproth par chauffage de la Pechblende de Saxe. Il en extrait un corps gris métallique qu'il baptise urane en référence à la planète Uranus découverte 8 ans plus tôt (Klaproth, 1789).

En 1841, le chimiste français Eugène Péligot démontre que l'urane est composé de deux atomes d'oxygène et d'un atome inconnu. Ce dernier, nommé uranium, est isolé et purifié pour la première fois (Péligot, 1841).

En 1896, le physicien français Henri Becquerel, découvre la radioactivité par accident en remarquant que des sels d'uranium ont impressionnés des plaques photographiques (Becquerel, 1896).

En 1938, les chimistes allemands Hahn et Strassmann découvrent les propriétés fissiles de l'atome d'uranium lors d'un bombardement de neutrons (Hahn and Strassmann, 1938).

En 1942, le physicien Leo Szilard met au point la première réaction en chaîne nucléaire.

En 1945, la première ogive nucléaire surnommée « little boy » est utilisée lors de la seconde guerre mondiale sur la ville japonaise d'Hiroshima. Elle tua 66 000 personnes sur le coup et 69 000 autres des suites de diverses blessures notamment dues aux radiations (Figure I-1).



Figure I-1 : Chronologie de l'histoire de l'uranium.

ii. Propriétés physico-chimiques

Propriétés physiques

L'uranium est un élément chimique de symbole U de numéro atomique 92 appartenant à la famille des actinides. C'est le plus lourd atome présent à l'état naturel sur Terre. C'est un métal gris à blanc malléable, ductile et très dense d'une masse volumique de $19,1 \text{ g.cm}^{-3}$. Il a une température de fusion de $1\ 130^\circ\text{C}$ et d'ébullition de $3\ 818^\circ\text{C}$ (Tableau I-1). Sous forme de fines particules, il a des propriétés pyrophoriques, c'est-à-dire qu'il peut s'enflammer spontanément

à température ambiante et produit ainsi des particules d'oxyde d'uranium U_xO_y . Il existe 26 isotopes connus de l'uranium, mais seuls les isotopes ^{238}U (99,275%), ^{235}U (0,72%) et ^{234}U (0,0055%) existent à l'état naturel.

Nom, symbole	Uranium, U
Famille chimique	Actinide
Masse volumique	19 050 kg.m ⁻³
Masse atomique	238,03 g.mol ⁻¹
Etats d'oxydation	+ III, + IV, + V, + VI
Température de fusion	1 132°C
Température d'ébullition	3 818°C

Tableau I-1 : Principales propriétés physiques de l'uranium.

Réactivité chimique

L'uranium élémentaire est une substance très réactive capable de réagir avec la plupart des éléments de la classification périodique (Ervanne, 2004). L'uranium est un élément lithophile, c'est-à-dire qui a une forte affinité pour l'oxygène. C'est pour cela, que l'on ne retrouve l'uranium que dans des composés oxygénés (Madic and Genet, 2001). Il existe en forme aqueuse sous des degrés d'oxydation compris entre + III à + VI. Les valences + IV, forme insoluble, et + VI, forme soluble, sont les plus répandues dans les minerais.

Selon la classification acide/base de Pearson (1963), l'ion uranyle UO_2^{2+} , forme de l'U (VI), se comporte en acide dur qui réagit préférentiellement avec les bases dures. Les composés dits « durs » sont de petites tailles avec des états de charge plus élevés et sont faiblement polarisables. Les composés dits « mous », quant à eux, sont de grande taille avec des états de charge peu élevés mais sont fortement polarisables. Selon cette théorie, les acides durs réagissent plus vite et forment des liaisons plus fortes avec les bases dures lorsque les autres facteurs sont égaux (Minkin, 1999). De cette façon, l'ion UO_2^{2+} réagit préférentiellement avec les ions carbonate CO_3^{2-} , hydroxyde OH^- , phosphate PO_3^{2-} , sulfate SO_3^{2-} et nitrate NO_3^- . Les bases et acides durs et mous les plus pertinents dans le cadre de cette thèse sont présentés dans le Tableau I-2.

Acides	Bases
Durs/dures	
UO ₂ ²⁺ , Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , H ⁺	CO ₃ ²⁻ , OH ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , H ₂ O
Intermédiaires	
Pb ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺	Cl ⁻
Mous/molles	
Ag ⁺ , Pd ²⁺ , Cd ²⁺ , Cs ⁺ ,	R ₂ S, RSH, RS ⁻ , I ⁻

Tableau I-2 : Classification des acides et bases selon Pearson (1963).

Propriétés nucléaires

L'uranium est un radionucléide, c'est-à-dire qu'il est instable et peut se décomposer en émettant un rayonnement. Tous les isotopes de l'uranium sont radioactifs. Leur désintégration radioactive émet des rayonnements α , caractérisés par l'émission de noyau d'hélium. La période radioactive d'un élément, correspondant au temps nécessaire à la désintégration de la moitié des atomes présents, détermine son activité radiologique. Plus la période d'un isotope est longue, moins son activité radiologique est importante. Les périodes radioactives des trois isotopes naturels de l'uranium ²³⁸U, ²³⁵U et ²³⁴U sont respectivement de 4,47.10⁹, 7,04.10⁸ et 2,45.10⁵ années. Leurs activités radiologiques se classent donc de la manière suivante : ²³⁸U << ²³⁵U << ²³⁴U. Finalement, même si l'isotope ²³⁴U est extrêmement minoritaire (0,0055%) dans l'uranium naturel, il est responsable de 50% de la radioactivité totale de l'uranium naturel. L'isotope ²³⁸U y contribue à hauteur de 47,8% et l'²³⁵U de 2,3% (Bleise et al., 2003).

C'est notamment la fissibilité de l'isotope ²³⁵U, seul isotope fissile naturel, qui rend l'uranium particulièrement intéressant à des fins industrielles. Dans la plupart de ces applications, l'uranium a besoin d'être enrichi en ²³⁵U. Un isotope fissile a la capacité de subir une fission nucléaire sous l'effet d'un bombardement de neutrons libérant ainsi de grandes quantités d'énergie. Les processus d'enrichissement de l'uranium en isotope fissile 235 sont nombreux et sont caractérisés par le rapport $r = \frac{^{235}\text{U}}{^{238}\text{U}} * 100$ qui permet de qualifier le type d'uranium. Il est de 0,725 pour l'uranium naturel. Lorsque r dépasse 0,725, on parle d'uranium enrichi et

en dessous d'uranium appauvri. Un taux d'enrichissement en ^{235}U supérieur à 0,9 est considéré de qualité militaire. Quel que soit le type d'uranium, il trouve de nombreuses applications dans le secteur civil ou militaire.

I - 2. Utilisation de l'uranium

i. Civile

Production d'énergie nucléaire

L'utilisation civile de l'uranium enrichi est consacrée à la production d'énergie nucléaire. Les centrales nucléaires permettent une production énergétique basée sur l'énergie libérée par la fission d'un noyau d' ^{235}U . Contrairement au charbon ou au pétrole, elle n'émet pas de gaz à effet de serre. De plus, la fission d'un gramme d'uranium enrichi produit plus d'énergie qu'une tonne de pétrole. Dans les centrales nucléaires, des combustibles composés de tubes d'uranium enrichi de quatre mètres de long sont disposés dans le réacteur constitué d'un circuit primaire qui produit la chaleur et un circuit secondaire qui l'extrait et la transforme en électricité (Figure I-2). Lorsque les taux d' ^{235}U deviennent trop faibles, le combustible est remplacé. Le combustible usagé est placé dans une piscine de refroidissement le temps de perdre la majorité de sa radioactivité. 96 % du combustible est réutilisé, le reste est coulé dans du verre et est stocké pendant 30 à 40 ans.

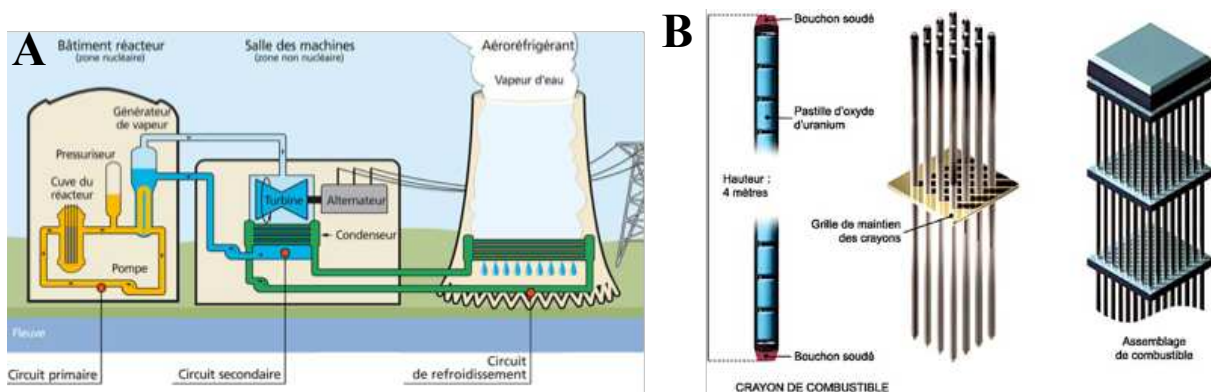


Figure I-2 : Fonctionnement d'une centrale nucléaire (A) et composition d'un combustible d'uranium (B).

Dans une centrale nucléaire, un combustible composé de crayons d'uranium enrichi est positionné dans un circuit primaire dans lequel les réactions de fission libèrent de l'énergie qui va être récupérée par le circuit secondaire afin de la transformer en électricité.

Datation terrestre

Il existe deux stratégies de datation basée sur l'uranium.

La première est principalement utilisée pour la datation de minerais. Elle est basée sur la demi-vie de ^{238}U (4,5 milliards d'années) et de ^{235}U (700 millions d'années). Les produits finaux de ^{238}U et de ^{235}U étant respectivement le ^{206}Pb et le ^{207}Pb , la mesure des deux rapports $^{207}\text{Pb}/^{235}\text{U}$ et $^{206}\text{Pb}/^{238}\text{U}$ permet de dater la formation du minerai connaissant la répartition initiale des éléments ainsi que leurs demi-vies respectives.

La deuxième stratégie est utilisée pour dater les formations carbonatées sous-marines d'origine animale comme les coraux ou les dépôts sédimentaires. ^{238}U est soluble dans l'eau et se désintègre en ^{230}Th , insoluble dans l'eau. L'eau de mer ne contient donc pas de ^{230}Th . Le composé qui se forme dans l'eau piège donc l'uranium mais pas le thorium. Après la désintégration de l'uranium, le thorium s'accumule dans le composé. Le rapport $^{230}\text{Th}/^{238}\text{U}$ permet donc de dater les composés vieux de moins de 75 000 ans, soit la demi-vie du ^{230}Th .

Médecine nucléaire

La médecine nucléaire utilise des substances radioactives pour diagnostiquer ou soigner des problèmes de santé. Bien que l'uranium ne soit pas directement utilisé en médecine, il est à l'origine d'obtention d'isotopes médicaux tels que le ^{99}Tc et le ^{99}Mo qui permettent d'obtenir des images d'organes d'êtres vivants. Il existe huit réacteurs de recherche dans le monde qui permettent de produire ces deux isotopes grâce à la fission d'atomes de ^{235}U hautement enrichi de qualité militaire (Molybdenum-99 for medical imaging). Ces réacteurs alimentent 100 000 hôpitaux dans le monde.

Pigments pour les verreries et céramiques

Au XIX^{ème} et XX^{ème} siècle, l'uranium était utilisé pour ses couleurs vives dans les produits céramiques, la réalisation de couleurs vitrifiables, colorants d'émaux, lustres, etc Figure I-3. En effet, l'oxyde d'urane a une couleur jaune orangé d'un grand éclat meilleur que celui obtenu avec l'antimoniote de potasse très utilisé à l'époque. Il pouvait être foncé avec de l'oxyde de zinc, de fer ou d'étain. L'oxyde d'urane était obtenu à partir de pechblende traitée avec des solutions acides (Brongniart, 1854). Les oxydes d'urane étaient également utilisés pour leurs reflets verts pour décorer la porcelaine (Salvétat, 1857). Cette utilisation de l'uranium se révèle purement historique et désuète pour notre époque puisqu'elle fut pratiquée bien avant la découverte de la toxicité de l'uranium. Aujourd'hui, elles n'ont plus cours du fait de l'interdiction du commerce et de l'usage d'uranium.



Figure I-3 : Verreries pigmentées avec de l'uranium.

ii. Militaire

Bombe A

La capacité qu'a la réaction de fission nucléaire de l'isotope d'uranium 235 à produire une quantité énorme d'énergie a permis le développement de bombes nucléaires. La bombe atomique, aussi surnommée bombe A, est basée sur le dégagement d'énergie obtenue par la fission nucléaire d'une masse critique d' ^{235}U . Cette arme fut la première et seule bombe A utilisée lors d'un conflit Figure I-4. Les bombes nucléaires développées par la suite utilisent le plutonium comme combustible qui permet d'obtenir une puissance supérieure. De nos jours, ce sont des bombes à hydrogène (Bombes H) qui sont développées ayant des puissances 4 000 fois supérieures à « Little boy ».

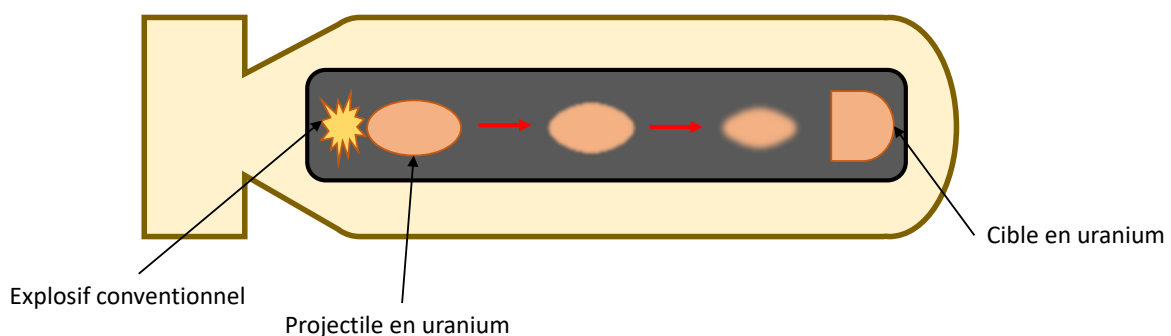


Figure I-4 : Fonctionnement de la bombe A « little boy ».

Après que la bombe soit lancée, l'explosif est déclenché permettant l'envoi du projectile de masse sub-critique en uranium enrichi directement dans la cible de masse critique en uranium enrichi. La libération des neutrons créée par l'impact des deux masses provoque une réaction en chaîne de fission qui libère une énorme quantité d'énergie.

Munitions en uranium appauvri

Le sous-produit de l'enrichissement d'uranium, l'uranium appauvri, est un matériau très dense qui est utilisé pour la fabrication de munitions permettant de perforer les blindages. De plus, par ses qualités pyrophoriques, quand l'uranium s'échauffe, il atteint sa température de fusion, inférieure à celle du blindage créant un eutectique qui provoque la fusion du blindage et facilite sa perforation.

I - 3. Pollution par l'uranium

i. Principales sources de pollution

L'exploitation intensive de l'uranium pour ses nombreuses utilisations a entraîné une redistribution anthropique qui mène à diverses pollutions des sols et de l'eau. Si les principales activités responsables sont l'extraction d'uranium, l'exploitation du phosphate et la fertilisation des terres arables avec du phosphate (Cothorn and Lappenbusch, 1983; Bigalke et al., 2018; Coyte et al., 2018), l'utilisation militaire et les divers incidents nucléaires sont aussi sources de pollution à l'uranium de la croûte terrestre. En effet, l'utilisation d'uranium appauvri conduit à un dépôt en particules fines d'uranyle solide à proximité des sites concernés.

L'uranium se retrouvant majoritairement dans les roches riches en phosphate, les engrais phosphatés, comme l'engrais Triple Super Phosphate, peuvent contenir jusqu'à quelques centaines de mg d'uranium par kilogramme (Lauria et al., 2009; Chandrajith et al., 2010). La fertilisation des sols agricoles avec ces engrais peut conduire à un apport annuel d'uranium dans certains sols pouvant atteindre entre 5 et 30 g d'uranium par hectare (Takeda et al., 2006; Shlewit and Alibrahim, 2008). Une étude datant de 2018 portant sur la qualité de différents sols en Inde a mis en évidence une forte prévalence de l'uranium naturel dans les eaux étudiées (Coyte et al., 2018) qui dépasse la valeur seuil de 30 µg/l déterminée par la World Health Organization (WHO). Cette pollution en uranium dans l'eau et le sol conduit à une accumulation dans les êtres vivants notamment dans les plantes qui représentent un point d'entrée majeur de l'uranium dans la chaîne alimentaire. En effet, 33 % de l'uranium ingéré par l'Homme provient des végétaux représentant la deuxième source d'entrée d'uranium dans la chaîne alimentaire après l'eau potable (Anke et al., 2009). Cette entrée dans l'organisme n'est pas sans conséquence sur la santé humaine.

ii. Risques pour la santé humaine

La toxicité de l'uranium est à la fois radiologique, due à l'émission de radiation et chimique, liée à la réactivité chimique de l'uranium. Dans le cas d'uranium naturel ou appauvri, qui s'avère très peu radioactif, le risque chimique prend le dessus sur le risque radiologique.

Même si les deux toxicités restent difficilement dissociables, les risques radiologiques de l'uranium restent largement associés au développement de cancers suite à une exposition prolongée. Des études réalisées concernant une exposition à de l'uranium appauvri montrent que l'inhalation d'uranium insoluble augmente les risques de cancers à cause de l'exposition interne à la radioactivité (ATSDR, 2013). C'est le cas de travailleurs de l'exploitation d'uranium où les particules d'uranium extraites peuvent être inhalées et ingérées aboutissant à une augmentation de la contamination interne. L'utilisation d'uranium appauvri lors de la guerre du Golfe a même conduit à l'apparition d'un nouveau syndrome nommé syndrome des Balkans caractérisé par la présence de fortes quantités d'uranium dans le sang se traduisant par une fatigue chronique, des pertes de mémoires et des capacités respiratoires réduites et dans certains cas, des leucémies (Duraković, 2001; Markotić, 2002; Storm et al., 2006).

La toxicité chimique de l'uranium est, quant à elle, associée majoritairement à des dysfonctionnements rénaux, hépatiques, neurologiques et pulmonaires. Il est montré que l'uranium s'accumule préférentiellement dans les os (66 %), les reins (8 %) et dans le foie (16 %) et qu'il est en grande partie éliminé par l'urine (La Touche et al., 1987). La chimiotoxicité a majoritairement été analysée dans d'autres mammifères et de manière générale, l'humain semble le moins sensible des mammifères étudiés (Kathren and Burklin, 2008).

Dans ce type de toxicité, c'est plutôt une exposition aiguë qui semble provoquer des lésions contrairement à la toxicité radiologique plutôt due à une exposition chronique. L'uranium est tout d'abord connu pour sa néphrotoxicité. Une exposition aiguë des reins à l'uranium entraîne une réduction du taux de filtration glomérulaire, une excrétion importante d'électrolytes (Na, K, Ca, Mg) (Banday et al., 2008), de protéines (Sánchez et al., 2001), de glucose (Cobbett and Goldsbrough, 2002), en plus d'une altération de la viabilité cellulaire des structures rénales et d'une vacuolisation des cellules. A très forte dose, il y a même apparition de nécrose sur les tubes proximaux. *A contrario*, une exposition chronique comme dans le cas d'une absorption d'eau contaminée, même à des niveaux relativement élevés, ne semble pas avoir d'impact cytotoxique sur les reins humains (Kurttio et al., 2006).

Dans les tissus osseux, la toxicité de l'uranium est principalement caractérisée par une augmentation des risques de cancers osseux, notamment d'ostéosarcome (Miller et al., 1998). L'uranium appauvri affecte aussi la viabilité cellulaire ainsi que la stabilité chromosomale des cellules composant la moelle épinière (Jiang and Aschner, 2006).

L'uranium peut également s'accumuler dans le cerveau après une ingestion d'eau contaminée (Houpert et al., 2005; Paquet et al., 2006), ou une inhalation répétée d'oxyde d'uranium (Monleau et al., 2005). Dans cette zone, le nitrate d'uranyle augmente le relargage d'acétylcholine entraînant des dérèglements neurologiques (Lin et al., 1998).

Enfin, l'effet tératogène et stérilisant de l'uranium a été mis en évidence. Même si aucun effet n'a été montré sur la reproduction chez l'humain, les effets sont plutôt bien décrits chez le rat. Il a été rapporté que des rats femelles ont un taux de fécondation plus faible avec des mâles ayant consommé de l'acétate d'uranyle (25 à 35%) pendant 64 jours par rapport à des mâles contrôle (81%). Toutefois, les organes ne sont pas touchés/modifiés et les processus physiologiques restent intacts. Des rats ayant avalé de grandes doses d'uranium présentent une baisse de la quantité de spermatozoïdes (Llobet et al., 1991), une toxicité fœtale (Domingo, 2001) et des lésions testiculaires (Maynard et al., 1953).

Finalement, au vu de sa toxicité et de son accumulation dans les écosystèmes terrestres, limiter l'entrée de l'uranium dans la chaîne alimentaire et gérer la pollution environnementale engendrée constituent de véritables enjeux de santé publique.

iii. Stratégies de dépollution : vers la bioremédiation

La majorité des stratégies de dépollution conventionnelles sont basées sur des procédés très coûteux qui mettent en jeu l'excavation et des traitements physico-chimiques entraînant des dégradations de l'environnement et des écosystèmes (Siddique and Waheed, 2012). C'est pourquoi des techniques de bioremédiation dites « vertes » plus respectueuses de l'environnement représentent un domaine de recherche important. La bioremédiation est basée sur l'utilisation des mécanismes biologiques d'organismes vivants tels que les algues (Khani et al., 2006; Manikandan et al., 2011), les bactéries (Li et al., 2004; Mondani et al., 2011; Williams et al., 2013; Choudhary and Sar, 2015), les plantes (Ebbs et al., 1998; Huang et al., 1998; Malaviya and Singh, 2012; Ren et al., 2019) ou les champignons (Rufyikiri et al., 2004; Kuroda et al., 2014; Chen et al., 2020a) pour réduire, éliminer, contenir ou transformer les contaminants présents dans le sol, l'eau ou l'air (Ayangbenro and Babalola, 2017). Lors de contaminations aux éléments traces métalliques (ETM), ces stratégies permettent l'extraction des polluants du

sol. Les mécanismes de prélèvement des ETM par les microorganismes peuvent être distingués en deux processus Figure I-5. Le premier, appelé biosorption, se caractérise par la fixation des ETM sur la paroi de l'organisme, indépendamment du métabolisme cellulaire (Malik, 2004). La biosorption, processus rapide, peut atteindre l'équilibre en quelques minutes et peut être exploitée par des fragments de cellules ou tissus, de la biomasse morte ou des cellules vivantes. L'utilisation de biomasse de levures mortes peut même s'avérer plus efficace que des

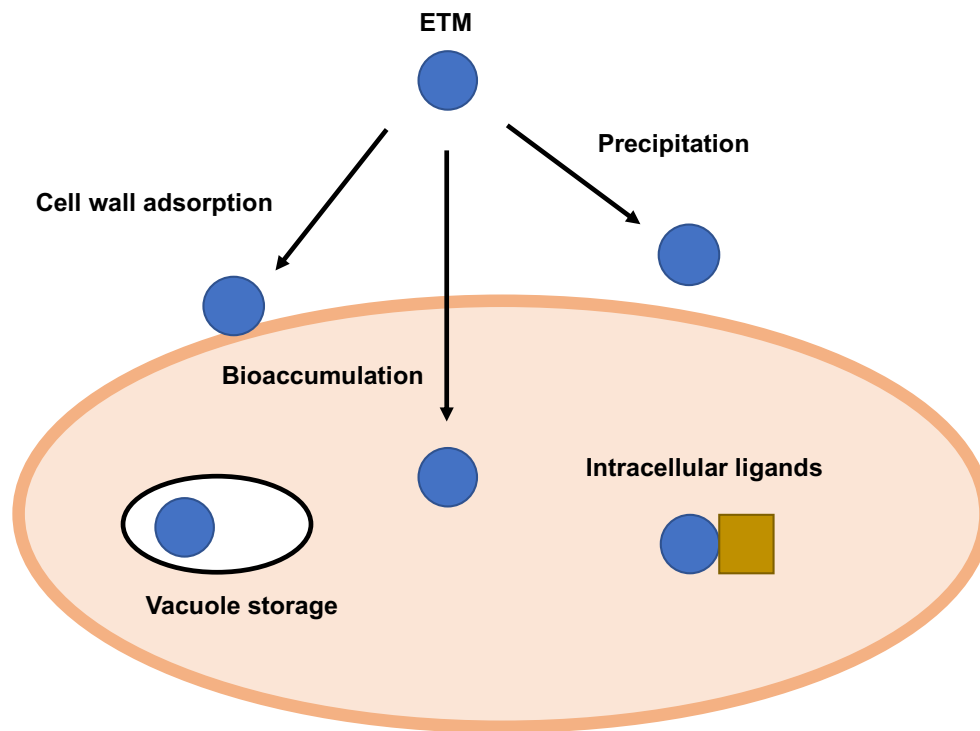


Figure I-5 : Mécanismes de captation des ETM par les microorganismes.
 Figure adaptée de Ayangbenro and Babalola 2017.

organismes vivants (Lu et al., 2013; Wang et al., 2017) grâce à la plus grande accessibilité à la paroi cellulaire. L'autre processus nommé bioaccumulation met en jeu l'entrée de l'ETM dans le cytoplasme et dépend fortement des mécanismes biologiques de l'organisme. Lors de ce processus, l'organisme doit être tolérant à de fortes concentrations de l'ETM accumulé pour le capter et le retenir (Mosa et al., 2016). L'organisme possède deux stratégies majeures pour la tolérance aux ETM, le stockage dans la vacuole et la fixation de l'ETM par des ligands intracellulaires, souvent des protéines ou métabolites de défense.

Les bactéries se présentent, à l'heure actuelle, comme les organismes les plus efficaces pour la bioremédiation de l'uranium. Elles ont la capacité d'immobiliser l'uranium par de nombreux processus comme les transformations d'oxydo-réduction de l'uranium, l'accumulation cellulaire, la complexation par des ligands ou encore la précipitation. En effet, certaines souches

bactériennes peuvent réduire l'U(VI) soluble en U(IV) insoluble par l'efflux de donneurs d'électrons physiologiques comme l'acétate, le lactate ou encore l'éthanol (Anderson et al., 2003; Istok et al., 2004; Wall and Krumholz, 2006). Plus de 25 espèces de procaryotes sont capables de réduire l'uranium (Suzuki and Suko, 2006). Les cytochromes c_3 tétrahémique et c_7 périplasmique sont connus pour permettre cette étape de réduction (Payne et al., 2002; Lloyd et al., 2003). L'U(IV) sous forme d'uraninite ($UO_{2(s)}$) précipité s'accumule à l'extérieur des bactéries au niveau du périplasma (Lovley and Phillips, 1992; Xu et al., 1999; Liu and Fang, 2002). A l'inverse, la ré-oxydation de l'U(IV) en U(VI) reste peu probable (Wall and Krumholz, 2006) même si de nombreuses études montrent qu'elle est possible par le dioxygène (Abdelouas et al., 1999; Duff et al., 1999), les oxydes de Fe(III) (Nevin and Lovley, 2000; Senko et al., 2002) ou les nitrites (Senko et al., 2002; Senko et al., 2005). Concernant la biosorption, les parois bactériennes Gram + contiennent de nombreux composés chargés négativement notamment les groupements phosphates et carboxylates (Frankel, 2003) pouvant capter l'ion uranyle (Fowle et al., 2000). La bactérie peut également transporter l'uranium dans le milieu intracellulaire même si, à l'heure actuelle, aucun transporteur n'a encore été identifié. Un processus d'efflux de l'uranium a néanmoins été mis en évidence dans la souche *Microbacterium sp.* A9, isolée du site de Tchernobyl, qui a une très grande capacité de survie et de résistance à l'U(VI). A faibles concentrations d'uranium, cette bactérie est capable d'expulser l'uranium de manière concomitante avec un efflux de phosphate permettant à l'uranium de précipiter à l'extérieur de la cellule (Theodorakopoulos et al., 2015). Plus récemment, il a été rapporté qu'une P_{1B} -ATPase, transporteur d'efflux de cadmium, pourrait être impliqué dans l'efflux d'uranium. Ce transporteur, induit en présence d'uranium, confère une meilleure tolérance à l'uranium dans *Chryseobacterium sp.* (Nongkhlaw and Joshi, 2019; Khare et al., 2020). La bactérie a également la capacité de faire précipiter l'uranium sous forme d'autunite ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2$) (Macaskie et al., 2000). Ce processus est dû à la sorption passive de l'uranium sur les polymères pariétaux extracellulaires chargés négativement et la sécrétion active de groupements phosphate (Macaskie et al., 1992; Jeong et al., 1997; Macaskie et al., 2000; Renninger et al., 2004; Martinez et al., 2007). Ce processus de précipitation en autunite peut avoir lieu également à l'intérieur de la bactérie *Microbacterium sp.* A9 lorsque la teneur en uranium est élevée (Theodorakopoulos et al., 2015).

Basées sur ces connaissances biologiques, de nombreuses approches biotechnologiques ont été déployées. Les stratégies de bio-engineering consistant à modifier des protéines naturellement existantes ont permis de créer des protéines ou peptides ayant une très forte affinité et sélectivité

pour l'uranium (Wegner et al., 2009; Lebrun et al., 2014; Zhou et al., 2014; Starck et al., 2015; Laporte et al., 2019; Stellato and Lai, 2020). Ces protéines peuvent servir, associées à des polymères ou des organismes vivants à la filtration de l'uranium dans les eaux contaminées. C'est le cas de NikR, protéine initialement fixatrice de zinc, modifiée pour fixer l'uranium qui a ensuite été surexprimée sur la paroi de levures afin d'augmenter drastiquement la capacité de biosorption de celles-ci (Kuroda et al., 2014).

La phytoremédiation est une approche de remédiation des sols basée sur l'utilisation des végétaux. Elle se décompose en 5 stratégies distinctes (Figure I-6) : i) La phytostabilisation consistant à fixer les polluants au niveau des racines afin de limiter leur dissémination ii) La phytoextraction permettant l'extraction des polluants par la plante et le stockage dans ses parties aériennes iii) La phytovolatilisation consistant à volatiliser le polluant iv) La phytodégradation dans laquelle le composé polluant est dégradé par le métabolisme de la plante v) La rhizofiltration consistant à décontaminer les eaux par les racines (Chatterjee et al., 2013; DK and F, 2016).

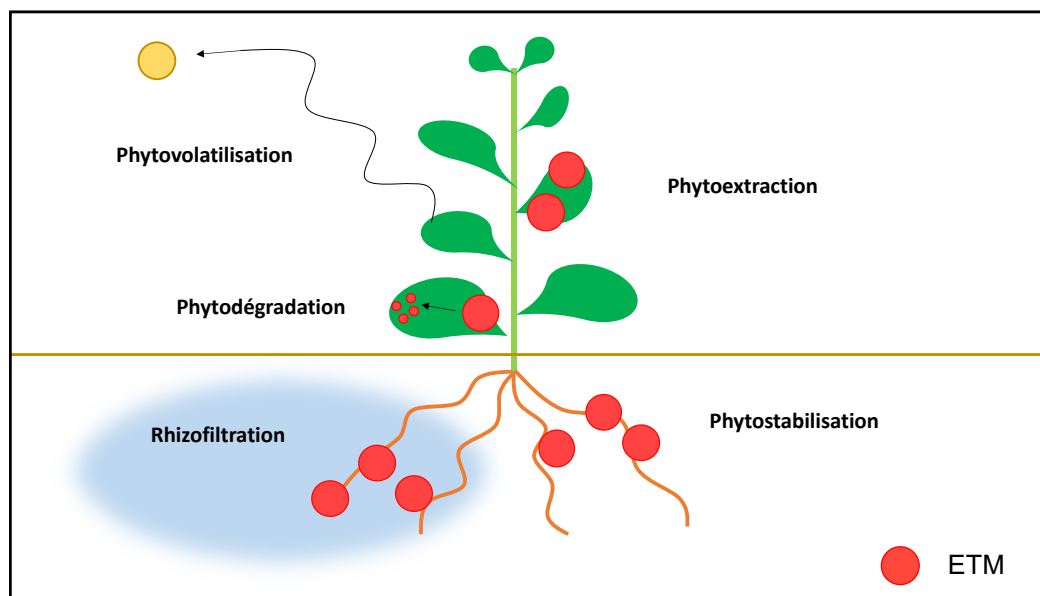


Figure I-6 : Principales stratégies de phytoremédiation.

La phytoremédiation se distingue des techniques conventionnelles par la préservation de l'environnement, son faible coût, la production d'un minimum de déchets secondaires ainsi que la possibilité de valorisation des végétaux produits. Toutefois, à l'heure actuelle, cette approche n'est pas utilisée à l'échelle industrielle car des freins existent. En effet, la zone d'action des plantes est limitée par la surface et la profondeur occupées par les racines, une croissance lente

et la plupart du temps, une biomasse faible chez les végétaux accumulateurs. L'absorption du métal par la plante est limitée et dépend fortement de sa biodisponibilité dans le sol, la présence de chélateurs, la capacité de sorption et les activités de précipitation de la plante (Lee and Yang, 2010). De plus, pour qu'une espèce végétale puisse être utilisée à des fins de phytoremédiation, elle doit être capable d'hyperaccumuler le métal à extraire mais aussi d'être tolérante à celui-ci sous peine d'entraîner des effets toxiques compromettant son utilisation à des fins de phytoremédiation. L'uranium entraîne des dysfonctionnements dans les plantes à plusieurs niveaux. Lorsqu'il est biodisponible, l'uranium affecte la nutrition végétale, le développement et la physiologie des plantes, ciblant, en particulier, la photosynthèse (Vanhoudt et al., 2011a; Aranjuelo et al., 2014; Saenen et al., 2014). Il induit des stress oxydants conduisant à une surexpression d'enzymes impliquées dans la lutte contre ce type de stress (Vandenhove et al., 2006; Vanhoudt et al., 2008; Doustaly et al., 2014; Horemans et al., 2015). Cette toxicité conduit à une forte perte de biomasse (Horemans et al., 2015), une inhibition de l'élongation racinaire (Panda et al., 2001) ainsi qu'une modification de l'architecture racinaire (Serre et al., 2019).

L'uranium étant non volatilisable, seules les approches de rhizofiltration, phytoextraction et de phytostabilisation s'avèrent envisageables. Dans le cas de phytostabilisation, la présence de mycorrhizes arbusculaires aurait un rôle considérable dans la phytostabilisation de l'uranium (Chen et al., 2008; Gadd and Fomina, 2011). Très récemment des premiers tests de phytostabilisation de l'uranium ont été réalisés (Wetle et al., 2020). La rhizofiltration, quant à elle, semble être, à l'heure actuelle, l'approche la plus concluante pour la décontamination de l'uranium (Baumann et al., 2014). Elle est majoritairement utilisée pour éliminer les divers polluants (métaux, composés organiques et matériaux radioactifs) de l'eau. Dans ces études, plusieurs espèces ont été étudiées. Des plants de *Brassica juncea* et de *Chenopodium amaranticolor* développant des poils racinaires par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* montrent leur efficacité dans la filtration de l'uranium dans l'eau contaminée (Eapen et al., 2003). Dans des études plus récentes, le tournesol (*Helianthus annuus*) a également été analysé pour la rhizofiltration (Vera Tomé et al., 2008; Vera Tomé et al., 2009; Lee and Yang, 2010). Pour les stratégies de phytoextraction, il est nécessaire d'identifier des lignées de plante tolérantes et surtout hyperaccumulatrices d'uranium. Une plante hyperaccumulatrice doit avoir la capacité d'absorber de grandes quantités de métaux pouvant aller de 100 à 1000 fois plus qu'une plante non accumulatrice sans montrer de signes de phytotoxicité (Reeves, 2006). Dans le cas de l'uranium, peu d'espèces répondent à ces critères. Toutefois, des familles de plantes

seraient composées de bons candidats comme les astéracées, aracées, brassicacées, poacées, caryophyllacées (Gupta et al., 2013). L'équipe de Tang et Willey en 2003 a montré que deux plantes *Lemna minor* et *L. gibba* ont un meilleur potentiel pour l'extraction de nombreux radionucléides dont l'uranium et pourraient être utilisées dans un but de phytoremédiation (Gupta et al., 2014; DK and F, 2016).

Des essais de terrain de phytoremédiation ont déjà été réalisés après l'incident de Chernobyl en 1986 (UNSCEAR, 2010) où une forte quantité de radionucléides fut relarguée. En 1998, du cannabis fut planté dans un but de phytoremédiation par l'institut ukrainien de Bast Crops (Ukraine). Dans ce cas, les cations toxiques et les oxyanions sont extraits du sol et transloqués vers les parties aériennes limitant ainsi leur toxicité (Chatterjee et al., 2013) soit par un stockage dans la vacuole soit par une chélation sur les parois cellulaires.

A l'heure actuelle, les stratégies de phytoremédiation sur l'uranium ne sont pas au point. De nombreuses connaissances fondamentales manquent pour le développement de telles stratégies. Des connaissances approfondies sur le transport de l'uranium dans la plante ainsi que sur ses mécanismes de toxicité pourraient permettre, d'une part, une sélection plus efficace de lignées végétales compétentes dans la décontamination de l'uranium présent dans les sols pour ainsi créer des lignées améliorées en termes de tolérance et de bioaccumulation par des approches biotechnologiques. D'autre part, une majorité de l'uranium ingéré par l'Homme provenant des végétaux, une meilleure connaissance du transport d'uranium au sein des végétaux, pourrait donner des outils cruciaux pour la gestion de l'entrée d'uranium dans la chaîne alimentaire.

I - 4. Devenir de l'uranium dans la plante : état de l'art

i. Transport de l'uranium dans la plante

Dans le cas de l'absorption d'uranium, la notion de biodisponibilité est essentielle. En effet, pour que l'uranium entre dans les racines, il doit être biodisponible. La biodisponibilité de l'uranium est déterminée par plusieurs facteurs : le pH, qui contrôle en grande partie la spéciation de l'uranium avec le potentiel d'oxydo-réduction ; la présence de ligands dont la complexation avec l'uranium en modifie la biodisponibilité et la présence d'autres cations divalents.

Le pH et potentiel d'oxydo-réduction

Le pH et le potentiel d'oxydo-réduction influencent la biodisponibilité de l'uranium par le contrôle de sa spéciation qui est complexe. En effet, de nombreuses espèces dérivées de l'uranium peuvent co-exister dans un même milieu. Le diagramme de Pourbaix (Figure I-7), illustre la diversité d'espèces aqueuses de l'uranium qui peuvent co-exister selon le pH et le potentiel d'oxydo-réduction (E_h). Afin de maîtriser un peu mieux la spéciation de l'uranium, les expériences sur les plantes ont été réalisées en culture hydroponique. Dans un milieu de culture de plantes basique (milieu de Hoagland modifié sans phosphate), pour des pH acides inférieurs à 5, la forme libre uranyle UO_2^{2+} est majoritaire, au-delà de 5, ce sont les formes

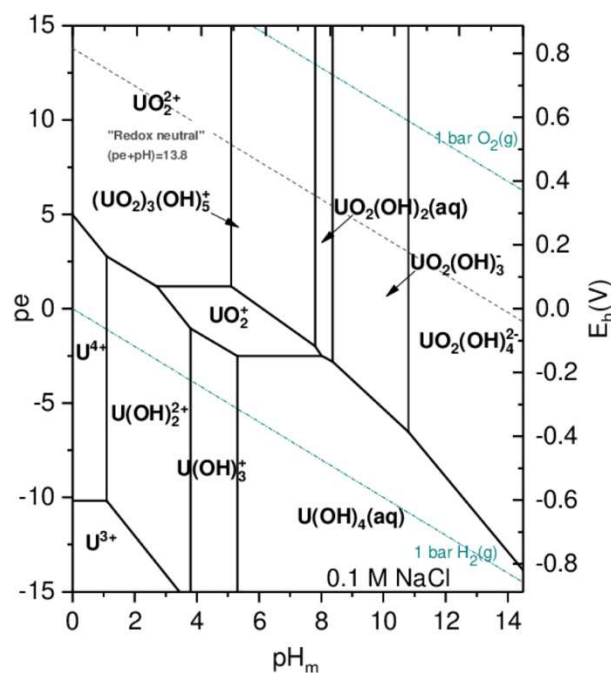


Figure I-7 : Diagramme de Pourbaix de l'uranium calculé pour une solution contenant 0,1 M NaCl et 3.10^{-5} M d'uranium considérant uniquement les formes aqueuses de l'uranium. Figure tirée de Çevirim-Papaioannou et al., 2018

hydroxylées $(UO_2)_x(OH)_y$ qui y sont prépondérantes (Laurette et al., 2012b) (Figure I-8). L'absorption par les racines est différente selon le pH (Çevirim-Papaioannou et al., 2018). Il est rapporté qu'à des pH faibles l'absorption de l'uranium par les racines est forte pour une faible translocation vers les parties aériennes (Saenen et al., 2015; Favas et al., 2016).

A l'inverse à des pH élevés, l'absorption devient faible pour une forte translocation (Laurette et al., 2012b; Saenen et al., 2013). Chez l'algue *Chlorella*, il est rapporté qu'environ deux fois plus d'uranium est absorbé à pH 6,5 qu'à pH 5,7 (Franklin et al., 2000). Cette baisse d'absorption à des pH plus acides a été justifié par les auteurs par la compétition des protons

H⁺ avec l'entrée de l'uranium à des pH trop acides. Chez le pois (*Pisum sativum*), la plus forte absorption racinaire a été observée à pH 6 et 8 et est significativement supérieure par rapport à pH 5.

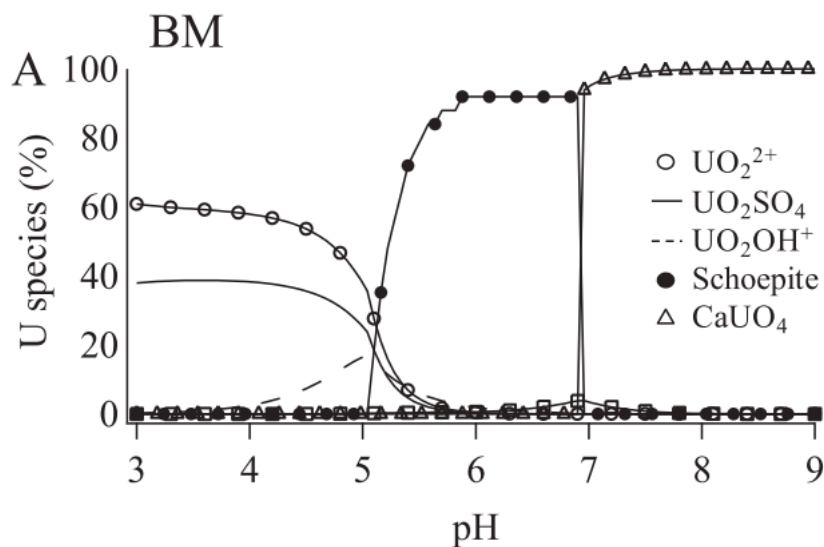


Figure I-8 : Spéciation de l'uranium dans un milieu basique de croissance végétal (Basic media : BM) par modélisation J – Chess. Figure tirée de Laurette et al. 2012b.

Présence de ligands

La présence de ligands est un autre facteur influençant la biodisponibilité de l'uranium. Les trois ligands naturellement présents dans le sol connus pour influencer directement la biodisponibilité de l'uranium sont le phosphate, les acides organiques et le carbonate (Figure I-8).

Le phosphate a la capacité de lier l'uranium en formant des complexes de phosphate d'uranyle (UO₂)_x(PO₄)_y peu solubles rendant l'uranium peu disponible pour la plante (Rufyikiri et al., 2006; Misson et al., 2009; Berthet et al., 2018). De manière générale, la présence de phosphate dans le milieu a tendance à réduire la biodisponibilité de l'uranium. Chez l'algue verte *Chlorella vulgaris*, il a été montré pour la première fois que la présence de phosphate a un impact direct sur l'absorption d'uranium (Horikoshi et al., 1979). En effet, la complexation de l'uranium avec les ions phosphate réduit la biodisponibilité de l'uranium (Fortin et al., 2004). Plus tard, des modélisations de la spéciation de l'uranium montrent qu'une augmentation de la concentration en phosphate en solution entraîne une diminution de la proportion d'ion uranyle libre (Laroche et al., 2005; Misson et al., 2009; Vera Tomé et al., 2009). A de faibles concentrations en phosphate et uranium, une partie des complexes uranium – phosphate sont

solubles et stables (Ebbs et al., 1998) mais la précipitation de phosphate d'uranyle survient rapidement lorsque ces concentrations augmentent.

Les acides organiques comme le citrate, quant à eux, forment des complexes monodentate stables avec l'uranium qui abaisse le pH du milieu et ont tendance à augmenter la biodisponibilité, la solubilité et donc la mobilité de l'uranium ce qui a pour effet de favoriser la translocation vers les parties aériennes (Huang et al., 1998; Pasilis and Pemberton, 2003; Laurette et al., 2012b).

La complexation de l'uranium avec le carbonate, augmente la solubilité de l'uranium (Davis et al., 2004; Bryan et al., 2012; Cumberland et al., 2016) et favorise également l'absorption par les racines et la translocation de l'uranium vers les parties aériennes (Francis et al., 2000; Bernhard et al., 2001; Shahandeh and Hossner, 2002; Lauria et al., 2009; Laurette et al., 2012a; Laurette et al., 2012b). L'addition de carbonate de calcium dans le sol permet d'augmenter la biodisponibilité de l'uranium et la capacité de phytoremédiation des plantes (Malaviya and Singh, 2012).

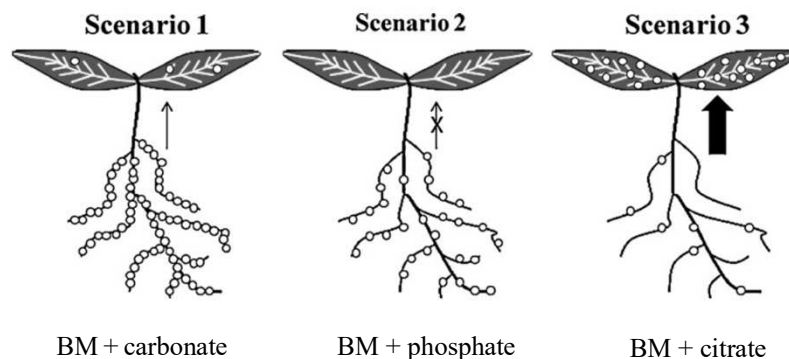


Figure I-9 : Schéma représentatif de trois scénarios d'accumulation et distribution d'uranium dans la plante. Figure tirée de Laurette et al. 2012b.

Dans le scénario 1, en présence de carbonate, l'uranium s'accumule massivement au niveau des racines. Dans le scénario 2, en présence de phosphate, l'uranium est peu absorbé par les racines et a tendance à précipiter au niveau de celles-ci. Dans le scénario 3, dans un milieu complétement en citrate l'uranium est fortement transloqué vers les feuilles. Ces expériences ont été réalisées dans un milieu de Hoagland modifié sans phosphate nommé « Basic Medium » (BM).

Présence d'autres cations divalents

Une étude datant de 1948 a montré pour la première fois que les ions divalents tels que le Ca^{2+} , le Mg^{2+} ou le Zn^{2+} pouvaient entrer en compétition avec l'uranyle pour les sites de fixation polyphosphatés à la surface des cellules (Rothstein, 1948). Le calcium peut former des complexes mixtes avec l'uranium, en présence de phosphate, sous forme d'autunite ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2$) immobilisant l'uranium dans le sol (Mehta et al., 2016). Il a été montré très

récemment que l'accumulation d' ^{238}U dans les plantes est directement reliée à la quantité de calcium mobile présent dans le sol (Ratnikov et al., 2020) et des ajouts progressifs de calcium entraînent une réduction de la vitesse initiale d'absorption de l'uranium chez *Brassica juncea* (El Hayek et al., 2018).

L'uranium étant un métal non-essentiel, son absorption par les racines, translocation vers les parties aériennes et sa distribution sub-cellulaire devraient impliquer des transporteurs dédiés au transport de métaux essentiels. A l'heure actuelle, aucun transporteur n'a été mis en évidence dans sa capacité à transporter l'uranium. Dans une précédente étude de l'équipe, il a été montré que des plantes d'*A. thaliana* mises en présence d'uranium montraient une forte répression de gènes en relation avec le métabolisme du fer comme le transporteur de forte affinité de Fe^{2+} IRT1, la « chélate reductase » FRO2 impliquée dans la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} ou encore FIT1, facteur de transcription de réponse au fer (Doustaly et al., 2014). Une autre étude de l'équipe a confirmé que l'uranium perturbe le métabolisme du fer dans *A. thaliana* (Berthet et al., 2018).

ii. Mécanismes de toxicité et de tolérance de la plante aux ions métalliques toxiques

Un ion métallique est toxique pour la plante à partir du moment où il engendre des dommages dans la cellule. Cela peut être le cas de quantités trop élevées d'ions essentiels ou d'éléments traces métalliques (ETM), métaux non-essentiels à la plante. Les principaux dommages cellulaires des ions métalliques peuvent se décomposer en trois mécanismes principaux :

- L'induction de stress oxydant caractérisée par la formation de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres très réactifs entraînant des effets délétères dans les cellules. Ils provoquent la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines par carbonylation et des acides nucléiques. Les ERO interfèrent avec les canaux hydriques et déstabilisent la fluidité et stabilité de la structure membranaire par inhibition du flux d'électrons (Apel and Hirt, 2004; Mittler et al., 2004; Gill and Tuteja, 2010; Choudhury et al., 2017).
- Le déplacement de co-facteur métallique. En effet, les premières cibles intracellulaires du métal étant les protéines, les ions métalliques peuvent se complexer avec les chaînes fonctionnelles ou déplacer les co-facteurs métalliques des protéines conduisant à une déstabilisation de l'activité catalytique de la protéine (Tamás et al., 2014). En effet, la similarité biochimique des groupes fonctionnels peut conduire à ce genre de

déplacement. Par exemple, l'ion arseniate AsO_4^{3-} , similaire à l'ion phosphate PO_4^{3-} , conduit au déplacement du phosphate dans la molécule d'ATP conduisant à la formation de complexes ADP-As qui interfèrent avec le flux énergétique de la cellule (Hartley-Whitaker et al., 2002).

- L'impact sur le repliement protéique, les ions métalliques peuvent aussi interférer avec la conformation protéique en déstabilisant les processus de repliement protéique en réagissant notamment avec les groupements sulfhydryl (Hall, 2002) et pouvant conduire à la formation d'agrégats protéotoxiques (Bierkens, 2000).

Afin de répondre à ces mécanismes de toxicité cellulaire, la plante développe des mécanismes de défenses contre ces impacts toxiques.

Défenses extracellulaires

Avant l'entrée dans la cellule, l'élément trace métallique (ETM) rencontre trois types de défenses extracellulaires :

- Les mycorhizes, résultant du phénomène de symbiose entre un végétal et un champignon. Ces structures fongiques sont souvent négligées dans la défense des plantes face aux ETM. Les ectomycorhizes, se formant à la surface des racines, se montrent efficaces pour renforcer la tolérance aux ETM notamment le cadmium, l'aluminium ou encore le plomb (Jentschke and Godbold, 2000; Hildebrandt et al., 2007; Bano and Ashfaq, 2013).
- La paroi cellulaire constitue la première ligne de défense végétale contre les ETM. Elle permet de limiter ou réduire l'absorption des ions métalliques par fixation aux parois cellulaires ou à des exsudats racinaires afin d'aussi en limiter le transport longue distance (Manara, 2012).
- La membrane plasmique, est la première structure vivante rencontrée par les métaux toxiques et permet la régulation de l'entrée des ions métalliques par la présence des nombreux mécanismes de transport présents à sa surface.

Malgré ces défenses extracellulaires, lorsque la quantité de métaux est trop forte, ils pénètrent dans le milieu intracellulaire provoquant les nombreux dommages décrits ci-dessus. La plante dispose de mécanismes de détoxification et stockage par chélation mettant en jeu différents acteurs moléculaires dans le cytosol permettant le trafic puis la séquestration dans la vacuole.

Mécanismes intracellulaires

Les principaux acteurs moléculaires permettant de capter les ETM se décomposent en 4 principales familles :

- Les métalloenzymes sont des protéines utilisant des ions métalliques comme co-facteur. Elles sont fortement impliquées dans les mécanismes intracellulaires de détoxification des ERO produits lors d'un stress métallique. Il existe une grande diversité de métalloenzymes dans la plante telles que la catalase, la superoxyde dismutase et l'ascorbate déshydrogénase. La Figure I-10 récapitule le fonctionnement de ces enzymes (Palma et al., 2015).

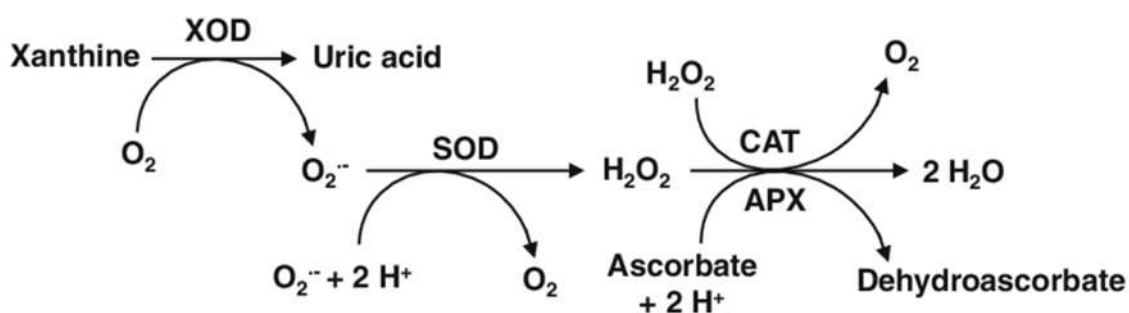


Figure I-10 : Implication des quatre enzymes présentées dans le processus d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (D'ap. Palma 2015).

XOD : Xanthine oxydase, SOD : Superoxyde dismutase, CAT : catalase, APX : ascorbate peroxydase.

- Les « Heat Shock Protein » (HSP) sont une famille de protéines chaperonnes impliquées dans la réponse à de nombreux stress abiotiques tels que la chaleur, la salinité ou les stress métalliques et sont surexprimées dans ces conditions (Haslbeck, 2002). Chez *A. thaliana*, la synthèse de HSPs est induite par un stress métallique (Swindell et al., 2007) et permettent le maintien l'homéostasie cellulaire en assistant le repliement des protéines néoformées ou celles mal-repliées et peuvent aussi assurer la dégradation de ces dernières tout en prévenant l'agrégation protéique (Qiu et al., 2006; Hüttner et al., 2012; Park and Seo, 2015).
- Les phytochélatines (PC) constituent une famille formée de répétition de structure dipeptidique de forme $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ qui ont la capacité de fixer les métaux dans un but de détoxification. Il a été montré que les complexes As – PC étaient séquestrés dans la vacuole *via* deux transporteurs de type ABCC chez *Arabidopsis* (Song et al., 2010) et

le riz (Song et al., 2014). Dans la plupart des cas, les phytochélatines sont induites par leur substrat, comme le cadmium, par fixation sur la phytochélatine synthase (PCS), enzyme responsable de la production de phytochélatine à partir de glutathion (Cobbett, 2000). Même si l'ion uranyle ne semble pas induire la formation de PC (Grill et al., 1987; analyses métabolomiques encore non publiées et réalisées en collaboration avec Christophe Junot), cela ne signifie pas qu'il ne peut pas former des complexes avec. En effet, l'induction des PC dépend de la capacité du métal à se fixer sur la PCS alors que la formation de complexes avec les PC dépend de l'affinité du métal pour les groupements thiols (-SH) de celles-ci. Il y a donc une probabilité non négligeable que les ions uranyle interagissent avec les PC (Soudek et al., 2011).

- Les métallothionéines sont des polypeptides de petites tailles riches en cystéines qui ont pour rôles majeurs l'immobilisation, la séquestration et la détoxification des ions métalliques (Capdevila and Atrian, 2011). Même si leurs fonctions physiologiques précises ne sont pas entièrement décryptées (Liu et al., 2015b), leurs principaux rôles seraient le maintien de l'homéostasie des métaux essentiels, la séquestration des ETM et la protection contre les dommages dus à des stress oxydants (Hossain et al., 2012).

iii. Mécanismes de toxicité et de tolérance de l'uranium dans la plante

Stress oxydant

La toxicité de l'uranium dépend fortement de sa biodisponibilité. Quand l'uranium devient biodisponible, il affecte la nutrition minérale, le développement et la physiologie de la plante en ciblant, principalement, la photosynthèse (Vanhoudt et al., 2011c; Aranjuelo et al., 2014; Saenen et al., 2014; Vanhoudt et al., 2014). L'uranium induit un stress oxydant provoqué par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique dans l'apex de la racine primaire (Tewari et al., 2015; Serre et al., 2019), conduisant à la surexpression d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant comme montré chez *Phaseolus vulgaris* (Vandenhove et al., 2006), *Lemma Minor* (Horemans et al., 2015) et *Arabidopsis thaliana* (Vanhoudt et al., 2008; Vanhoudt et al., 2011c; Vanhoudt et al., 2011a; Doustaly et al., 2014). Le glutathion est supposé jouer un rôle clé dans la réponse des plantes à l'uranium, comme le montre le mutant *cad1-2* « glutathione-déficient » d'*A. thaliana* qui a des difficultés à gérer le stress oxydant induit par l'uranium dans lequel une forte accumulation de malondialdéhyde, produit issu de la peroxydation lipidique, est observée (Aranjuelo et al., 2014). Très récemment, il a été montré que l'ajout de régulateurs de croissance végétaux (« Plant Growth Regulators », PGR)

permettait de réduire le stress provoqué par l'uranium dans *Brassica juncea* (Chen et al., 2020b). En effet, cet ajout permet une augmentation significative des activités des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydas et la catalase engendrant ainsi une tolérance accrue à l'uranium.

Interférence avec l'homéostasie d'éléments essentiels

En plus d'entraîner un stress oxydant dans la plante, l'uranium perturbe fortement l'homéostasie d'autres éléments essentiels notamment celui du phosphate et du fer. En effet, il est montré que la présence d'uranium modifie l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du phosphate (Doustaly et al., 2014), pouvant conduire à une carence en phosphate (Misson et al., 2009; Laurette et al., 2012b; Berthet et al., 2018). L'addition de phosphate dans le milieu permet de réduire les effets toxiques dans la plante (Ebbs et al., 1998). A l'inverse, une absence de phosphate entraîne, en présence d'uranium, une surexpression des enzymes responsables de la gestion du stress oxydant comme l'ascorbate peroxydase (Vanhoudt et al., 2008). Des analyses de viabilité cellulaire de racines d'*A. thaliana* en présence de 500 μM d'uranium dans un milieu riche en phosphate montre que seul l'épiderme est touché contrairement à une condition sans phosphate où la racine entière est morte (Misson et al., 2009).

L'uranium perturbe également le métabolisme du fer. En présence d'uranium, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du fer sont réprimés (Doustaly et al., 2014) comme notamment IRT1, transporteur majoritaire responsable de l'absorption de fer dans la racine, FRO2, réductase du Fe (III) en Fe (II) ou encore NRAMP1, transporteur de fer de faible affinité. Cette conséquence peut s'expliquer par la perception d'un excès de fer par la plante suggérant que l'uranium peut se substituer au fer à l'intérieur de la cellule. Cette hypothèse a été également confirmée par les expériences de Berthet et al. (2018). Dans cette étude, l'analyse du mutant d'*A. thaliana irt1* déficient en transporteur de fer a montré que l'uranyle interfère avec l'homéostasie du fer et du phosphate à différents niveaux. La condition de culture de la plante, en présence de phosphate et en l'absence du chélateur de cations EDTA dans le milieu, a des conséquences drastiques sur la physiologie de *irt1*, avec des symptômes importants de carence en fer dans les chloroplastes. Ces effets sont contrebalancés par l'uranium, probablement car le radionucléide entre en compétition avec le fer pour la complexation avec le phosphate (ou d'autres éléments) et libère ainsi du fer actif pour les processus métaboliques et biogéniques.

L'uranium impacte également l'homéostasie du calcium chez *A. thaliana* (Vanhoudt et al., 2011b). Les auteurs ont montré qu'il y avait une forte diminution de calcium dans les feuilles de plantes traitées avec de l'uranium à des concentrations de 0,1 à 100 μM d'uranium pendant 7 jours.

Dans les racines, l'uranium inhibe la croissance primaire selon sa concentration et sa spéciation (Misson et al., 2009). Dans une étude récente de l'équipe, à partir de 30 μM d'uranium dans un milieu contenant 30 μM de phosphate, il est observé une baisse drastique de la viabilité cellulaire dans l'apex racinaire primaire, une disruption de l'homéostasie de l'auxine et une accumulation de polymères de défenses comme la lignine ou la callose (Serre et al., 2019). La lignine permettrait de contrôler la diffusion du métal toxique par épaissement de la paroi cellulaire (Lequeux et al., 2010; Liu et al., 2018) (Figure I-1).

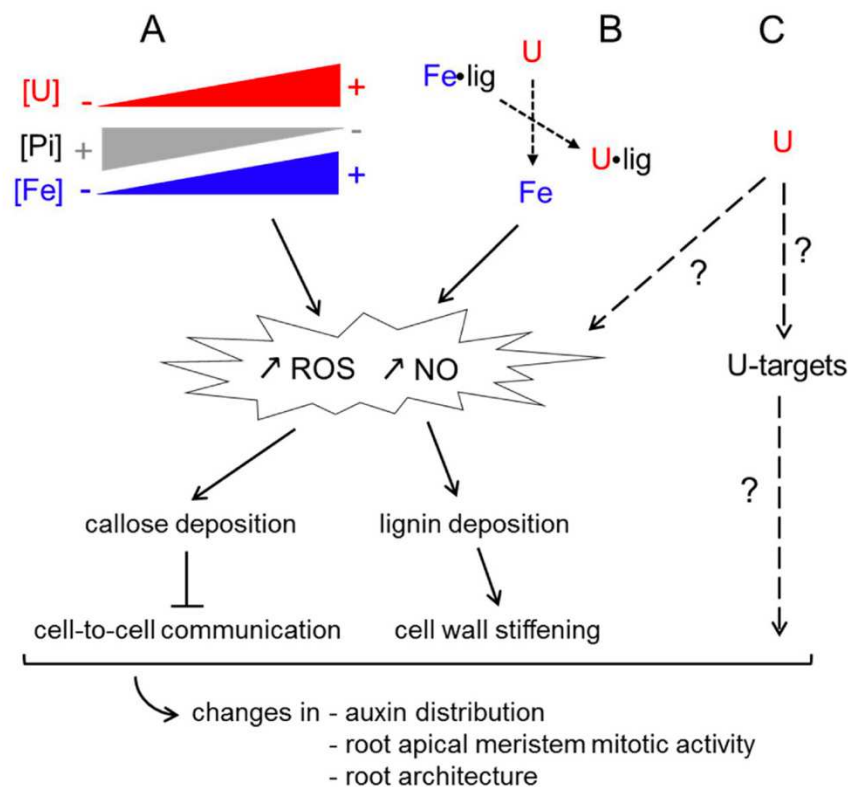


Figure I-1
racines d'

es des

Ce modèle illustre les trois processus contribuant à la modification de l'architecture racinaire en présence d'uranium. A- L'accumulation d'uranium induit une carence en phosphate, qui déclenche une redistribution du fer dans les tissus racinaires, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le dépôt de callose. Ces événements sont similaires à ceux décrits pour la cascade de signalisation de perception du Pi dans l'apex racinaire (Müller et al. 2015). B- La compétition entre l'uranium et le fer pour la formation de complexes avec de divers ligands (Pi, acides organiques, composants de paroi cellulaire, protéines, ...) peuvent relâcher des ions Fe^{3+} , déclencher la production de ROS, et donc amplifier la cascade de perception du Pi. C- L'uranium pourrait directement affecter la croissance racinaire et l'architecture à travers ses effets toxiques sur des cibles spécifiques, encore inconnues. L'oxyde nitrique (NO) est, en plus des ERO, un messager secondaire impliqué dans le stress uranium dans la racine.

Changements conformationnels et déplacement de co-facteurs métalliques

L'uranium, comme d'autres métaux toxiques, peut interagir avec les protéines et déplacer les co-facteurs métalliques pouvant entraîner des perturbations dans l'activité d'enzymes nécessaires aux processus biologiques. A l'heure actuelle, aucune cible protéique végétale de l'uranium n'a été identifiée. Toutefois, chez l'homme, il est suggéré que l'ion uranyle peut prendre la place d'ions Fe^{3+} sur la transferrine humaine (Vidaud et al., 2007). Le déplacement de ces métaux peut entraîner des changements conformationnels responsables des pertes d'activités ou de fonction des protéines cibles (Pible et al., 2006). Par exemple, la formation de complexes stables de l'uranyle avec l'ostéopontine, une protéine de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important dans l'homéostasie osseuse en raison de sa forte affinité pour le calcium et l'hydroxyapatite, résultent de changements structuraux induits par la fixation de l'uranyle à la surface de la protéine (Safi et al., 2013; Qi et al., 2014). Du fait de la similarité de coordination entre l'uranyle et les ions calcium, l'uranyle a tendance à occuper les sites natifs de fixation de Ca^{2+} de la calmoduline, jouant un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie du calcium, avec même une meilleure affinité entraînant des changements conformationnels (Le Clainche and Vita, 2006; Pardoux et al., 2012; Brulfert et al., 2016; Sauge-Merle et al., 2017). D'autres changements de structures ont été mis en évidence pour l'albumine de sérum sanguin (Yang et al., 2013), la protéine SUP, développée grâce à des approches biotechnologiques (Hoarau et al., 2019) ou la transferrine (Vidaud et al., 2007).

I - 5. Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans un projet de l'équipe « Plantes, Stress et Métaux » réalisé en collaboration avec des équipes du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) et de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) (ANR GreenU 2018 – 2022) qui vise à comprendre les mécanismes biologiques déterminant le transport de l'uranium ainsi que son devenir cellulaire dans les plantes. Il se structure en deux parties distinctes. La première vise à décrypter les mécanismes de transport de l'uranium en identifiant des transporteurs responsables de son entrée dans la plante. La seconde partie s'attache à décrypter les mécanismes de toxicité et de tolérance à l'uranium en identifiant ses cibles protéiques cellulaires dans la plante.

A l'heure actuelle et comme je l'évoquais plus haut, aucun transporteur d'uranium n'a encore été caractérisé dans le monde vivant. Dans le cadre du projet GreenU, deux approches complémentaires ont été développées en parallèle afin d'identifier les voies d'entrée de l'uranium dans la plante, une approche « directe » basée sur l'étude de la plante modèle

Arabidopsis thaliana cultivée en conditions hydroponiques et développée par Manon Sarthou dans le cadre de sa thèse et une approche « indirecte » basée sur l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme d'étude pour l'identification de transporteurs eucaryotes que j'ai développée et que je présenterai ici.

Après l'entrée de l'uranium dans la cellule, il interagit avec les biomolécules cellulaires. Parmi elles, les protéines sont des macromolécules ubiquitaires présentes dans la totalité des cellules vivantes et impliquées dans une grande variété de processus biologiques (comme les réactions enzymatiques, le transport, le transfert d'électron, l'activation transcriptionnelle, la régulation et fixation métallique). De plus, elles sont riches en groupements réactifs de l'uranium (comme les groupements carboxyles et phosphorylés). De ce fait, les protéines sont attendues comme étant les principales cibles de l'uranium intracellulaire.

La seconde partie de cette thèse a donc consisté à identifier *in vivo* des cibles protéiques de l'uranium. Ces cibles protéiques peuvent contribuer également à la détoxification de l'uranium. Si plusieurs protéines cibles de l'uranium ont pu être identifiées au cours des deux dernières décennies dans différents organismes, à l'heure actuelle aucune n'a encore été identifiée dans la plante. Afin de les identifier, nous avons utilisé une approche biochimique de métallogénomique basée sur la séparation chromatographique d'extraits protéiques issus de cellules en culture d'*A. thaliana* cultivées en présence d'uranium couplée à la détection de l'uranium et l'identification des protéines candidates par des techniques massiques (spectrométrie de masse à plasma inductif, et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, respectivement). La caractérisation biochimique et structurale d'une des UBP candidates identifiées au cours de cette étude a été initiée et sera également présentée.

**II - Identification de transporteurs
permettant l'entrée de l'uranium dans la
levure *Saccharomyces cerevisiae***

I - 1. Introduction

Cette partie du projet a consisté à identifier des transporteurs impliqués dans l'entrée d'uranium dans la levure pour pouvoir, par la suite, les identifier dans la plante. En effet, l'étude des organismes végétaux entiers présente de nombreuses limitations en lien notamment avec la compartimentation tissulaire. La diversité et les spécificités de localisation des transporteurs rendent leur étude complexe. De cette manière, les transporteurs mis en jeu dans le transport métallique dans la plante sont multiples. Par exemple, les cas de l'arsenic et du cadmium, les deux éléments polluants toxiques les plus étudiés, illustrent parfaitement la multiplicité des transporteurs mis en jeu. Selon sa spéciation, l'arsenic peut être absorbé au niveau de la racine soit par les transporteurs de phosphate Pht1;1 et Pht1;4 dans le cas d'ions arsénite (AsO_4^{3-}) (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2010; Wu et al., 2011) ou par les aquaporines de la famille des NIPs dans le cas d'ions arséniate (AsO_3^{3-}) (Isayenkov and Maathuis, 2008; Kamiya et al., 2009) mais son transport à travers les différents types cellulaires racinaires est assuré par les transporteurs Lsi1 et Lsi2 chez le riz et Lsi6 qui permet l'entrée de ces ions dans le xylème (Chatterjee et al., 2013; Khan and Gupta, 2018). Le stockage de l'arsenic dans la vacuole est assuré par les transporteurs ABCC1 qui prennent en charge les complexes phytochélatines-As(III) (Song et al., 2010). Le cadmium, quant à lui, est majoritairement absorbé par les racines par le transporteur de fer IRT1 chez *A. thaliana* (Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002; Fan et al., 2014) ou encore NRAMP1 chez le riz (Curie et al., 2000), *A. thaliana* (Thomine et al., 2000; Cailliatte et al., 2010) et *Brassica napus* (Meng et al., 2017). Les transporteurs de zinc HMA2 et HMA4 permettent ensuite son export dans le xylème (Clemens et al., 2013; Uraguchi and Fujiwara, 2013; Sasaki et al., 2014) tandis qu'HMA3 permet le stockage dans la vacuole (Morel et al., 2009; Liu et al., 2017). Afin de nous affranchir de la complexité cellulaire et tissulaire des végétaux, nous avons développé une approche basée sur l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, organisme unicellulaire eucaryote à croissance rapide (temps de génération de 2 à 3 h) et dont la génétique et les techniques associées sont bien maîtrisées. De plus, les mutants de levures sont facilement accessibles à partir des banques déjà existantes. Dans la plante, les outils génétiques actuels ne sont pas suffisamment puissants pour que la manipulation du génome soit simple et rapide. L'analyse phénotypique des mutants de plantes peut également être complexe. Les grandes similarités du génome d'*A. thaliana* avec celui de *S. cerevisiae* ont permis l'identification d'un grand nombre de transporteurs de plantes par complémentation fonctionnelle de mutants de levure, incluant des transporteurs de sucrose (Riesmeier et al., 1992), de potassium (Schachtman and Schroeder, 1994), de sulfate (Smith et

al., 1997), de phosphate (Muchhal et al., 1996), de fer avec NRAMP1 et IRT1 (Eide et al., 1996) et NRAMP3 et 4 (Thomine et al., 2000), de calcium avec MCA1 et MCA2 (Yamanaka et al., 2010) ou encore de cuivre comme COPT1 (Kushnir, 1995). Dans un cadre plus large, la levure constitue aussi un excellent modèle pour comprendre les bases moléculaires des maladies héréditaires auxquelles sont attribuées des défaillances métaboliques chez l'humain (Laliberté and Labbé, 2008)

L'utilisation du modèle levure pour l'identification de transporteurs d'uranium dépend de la capacité de cet organisme à absorber l'uranium. Jusqu'à présent, même s'il est démontré que la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* fixe énormément d'uranium (Nakajima and Tsuruta, 2002; Popa et al., 2003; Ohnuki et al., 2005; Sakamoto et al., 2007; Liu et al., 2010; Sakamoto et al., 2010; Sakamoto et al., 2012), aucune étude n'avait montré une internalisation de l'uranium par la levure. Ces études ont étudié la capacité de biosorption de l'uranium par la levure dans un but de bioremédiation, le phénomène d'absorption n'étant pas l'objet d'étude principal. Le phénomène d'adsorption est suffisamment important pour que des dépôts d'uranium puissent être observés à la surface des cellules (Lu et al., 2013). Cette même étude a montré que des levures mortes ont une meilleure capacité de biosorption que des levures vivantes, phénomène expliqué en majeure partie par la plus grande accessibilité de la paroi dans les organismes morts.

Dans notre étude, il s'est avéré indispensable de mettre en évidence et de caractériser la capacité d'absorption de l'uranium de *S. cerevisiae* si elle existe et de la distinguer de l'adsorption sur la paroi pouvant masquer le phénomène d'incorporation. Il est bien connu que l'absorption d'uranium est directement liée à sa biodisponibilité, principalement déterminée par sa spéciation qui dépend de la composition du milieu (pH, présence de ligands). Partant de ces connaissances, nous avons mis au point des conditions favorisant la biodisponibilité de l'uranium ce qui nous a permis d'analyser la capacité d'absorption d'uranium de la levure, puis d'identifier plusieurs voies d'import de ce radionucléide.

I - 2. Résultats

i. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'absorber l'uranium

Afin d'étudier la capacité d'absorption de l'uranium de *S. cerevisiae*, des levures sauvages BY4742 ont été incubées en présence de 10 μM de nitrate d'uranyle dans un milieu MES tamponné à pH 5,5, favorisant la forme uranyle UO_2^{2+} . Des cinétiques ont été réalisées à 4°C, température à laquelle aucun métal n'est absorbé ou l'est de manière très ralentie (Blackwell et al., 1995) tout en préservant la viabilité des cellules (Aguilera et al., 2007) et 30°C, température optimale au métabolisme de la levure ainsi qu'à la bioaccumulation de métaux. Après chaque prélèvement, les levures ont été centrifugées puis ont subi ou non deux lavages au carbonate de sodium pour éliminer l'uranium adsorbé sur leurs parois cellulaires. L'uranium a ensuite été dosé par ICP-MS dans les culots de levures non lavés et lavés ; les deux milieux de lavages ainsi que dans le milieu d'incubation initial après centrifugation (y compris dans un contrôle acellulaire). En l'absence d'étape de lavage, à $t = 0$, et quelle que soit la température, la quantité d'uranium mesurée dans le culot de cellules est constante et représente environ 80 % de l'uranium présent dans le milieu initial (Figure II-1).

Le phénomène observé est donc indépendant de la température, quasi-instantané et correspond à l'uranium adsorbé à la surface des cellules. Cette quantité d'uranium reste constante à 4°C au cours du temps mais augmente à 30°C. A 4°C ou à 30°C, le premier lavage permet d'éliminer la majorité de l'uranium adsorbé. Le deuxième lavage permet d'éliminer le reste, les quantités d'uranium biosorbées sont quasi-nulles au temps $t = 0$, démontrant que les lavages utilisés sont efficaces pour éliminer l'uranium adsorbé sur la paroi des levures dans ces conditions. Après 2 lavages, à 4°C, la quantité d'uranium incorporée reste quasi-nulle tout au long de la cinétique alors qu'à 30°C, on observe une vitesse d'incorporation linéaire sur au moins 3 h d'incubation à une vitesse initiale de 60-80 ng d'uranium incorporé par heure pour 10^8 cellules (Figure II – 1). Cette observation montre l'existence d'une voie d'entrée d'uranium dans la levure dépendante de la température, distinguable de l'adsorption pariétale.

ii. L'absorption d'uranium nécessite une source d'énergie

Pour aller plus loin dans la caractérisation du mécanisme d'entrée d'uranium, des cinétiques ont ensuite été réalisées sur 24 h en utilisant plusieurs concentrations en nitrate d'uranyle : 1, 3 et 10 μM en présence ou non de glucose, source d'énergie nécessaire au fonctionnement du

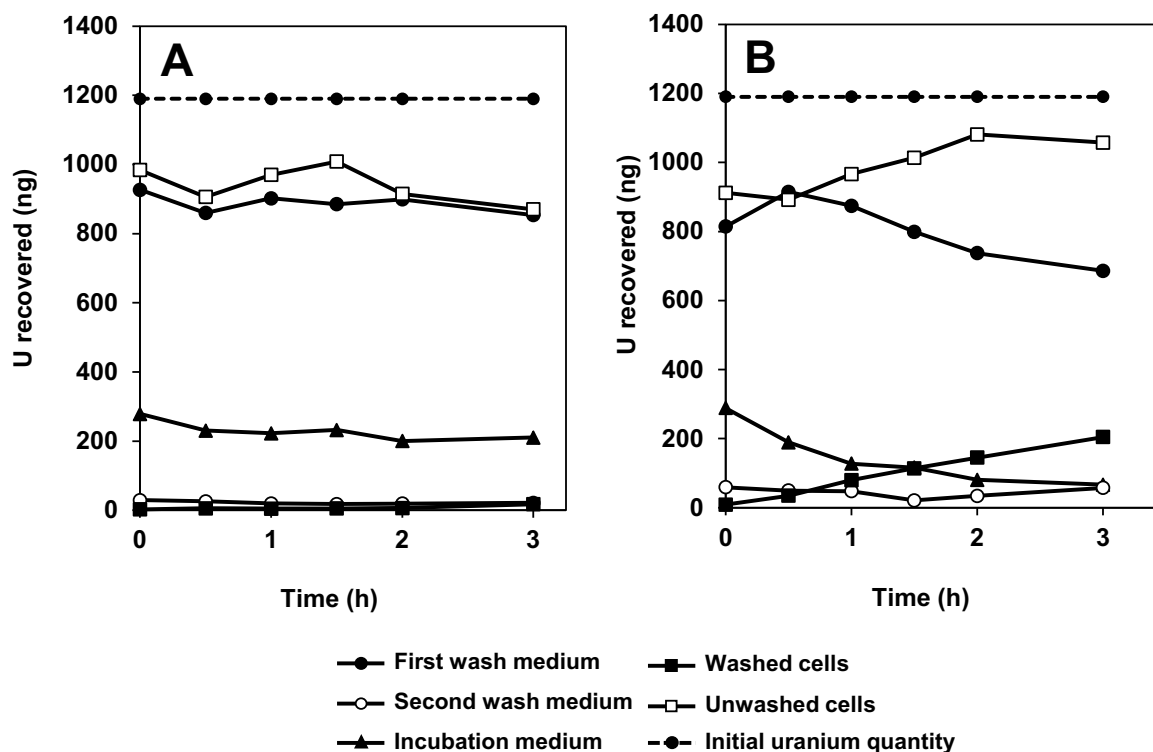


Figure II-1 : Cinétiques d'incorporation de l'uranium chez *Saccharomyces cerevisiae* : effet de la température et des lavages au carbonate de sodium.

Les cinétiques ont été réalisées à 4°C (A) ou 30°C (B) avec des levures sauvages BY4742 cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle dans un milieu YPD et resuspendues à une dilution de 2.10^8 cellules/ml dans une solution MES 10 mM pH 5,5, glucose 20 mM et 10 μ M de nitrate d'uranyle dans un volume total de 10 ml. Des prélèvements de 500 μ l ont été réalisés à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3 h après ajout du nitrate d'uranyle. Deux étapes de lavages des cellules ont été réalisées avec 1 ml de carbonate de sodium 10 mM (voir Matériel et Méthodes). La quantité d'uranium présente dans le milieu d'incubation après centrifugation des suspensions cellulaires (Incubation medium), les deux milieux de lavages au carbonate de sodium 10 mM (First et second wash medium), les culots de cellules lavées (Washed cells) et non lavées (Unwashed cells) a été quantifiée par ICP-MS. La ligne en pointillés matérialise la quantité présente dans le milieu après centrifugation d'un contrôle acellulaire. Les résultats présentés sont représentatifs d'une expérience réalisée 3 fois de manière indépendante.

métabolisme cellulaire. L'entrée d'uranium mesurée à 30°C est dépendante de la concentration en nitrate d'uranyle. Sur cette gamme de concentration, la quantité d'uranium incorporée est proportionnelle à la quantité d'uranium présent dans le milieu (Figure II-2).

L'absorption d'uranium est largement dépendante de la présence de glucose puisqu'en l'absence de glucose, l'absorption d'uranium est presque abolie. A 30°C, l'absorption d'uranium est 6 fois plus faible à 10 μ M de nitrate d'uranyle en absence de glucose qu'en présence de glucose (Figure II – 2 C). Ces observations sont moins marquées à 1 et 3 μ M mais suivent la même tendance (Figure II – 2 A et B). Enfin, à 4°C, quelle que soit la concentration d'uranium et la présence ou non de glucose, aucune incorporation d'uranium n'est observée au

cours de la cinétique. Ces résultats montrent que l'entrée d'uranium dans la levure à 30°C est dépendante en grande partie de la présence d'une source d'énergie et suggère donc qu'il existe au moins un système de transport dans la levure, nécessitant un métabolisme cellulaire actif, capable de transporter l'uranium dans la cellule.

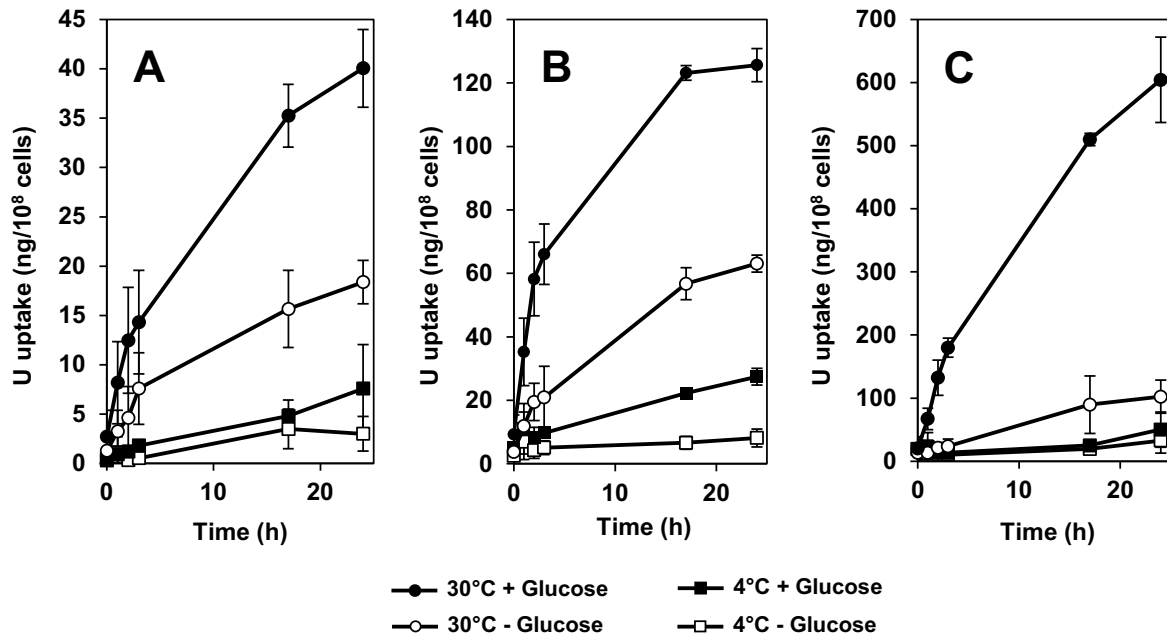


Figure II-2 : Cinétique d'incorporation de l'uranium chez *S. cerevisiae* : effet de la concentration en uranium et de la présence ou non de glucose.

Les cinétiques ont été réalisées à 4°C ou 30°C avec des levures sauvages BY4742 cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle dans un milieu YPD et resuspendues à une dilution de $2 \cdot 10^8$ cellules/ml dans une solution MES 10 mM pH 5,5 en présence (+ Glucose) ou non (- Glucose) de glucose 20 mM et de 1 µM (A), 3 µM (B), ou 10 µM (C) de nitrate d'uranyle dans un volume total de 10 ml. Des prélèvements de 600 µl ont été réalisés après 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 17 et 24 h de traitement et les cellules ont été récoltées et lavées avec du carbonate de sodium comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes. L'uranium incorporé a été dosé par ICP-MS. Les conditions expérimentales n'affectent pas la viabilité cellulaire (voir Annexe 1). Les barres d'erreur (écart-type) ont été calculées sur la base de trois expériences indépendantes.

Les vitesses initiales sont proportionnelles à la concentration en nitrate d'uranyle comprise entre 1 à 10 µM (Figure II-3). Au-delà de ces concentrations, il y a une saturation de la vitesse initiale pour des concentrations comprises entre 20 et 70 µM. L'ajustement avec une équation de Michaelis – Menten nous a permis de déterminer un K_m apparent de $9,05 \pm 1,5$ µM et une vitesse maximale (V_{max}) de 145 ± 6 ng d'uranium incorporé par heure pour 10^8 cellules (Figure II-3). Au-delà de 70 µM, le bruit de fond trop élevé n'a pas permis pas de mesurer la vitesse initiale d'incorporation d'uranium (non montré). Ce phénomène est probablement dû à une faible efficacité de nos lavages au carbonate de sodium avec des concentrations en uranium élevées (> 70 µM).

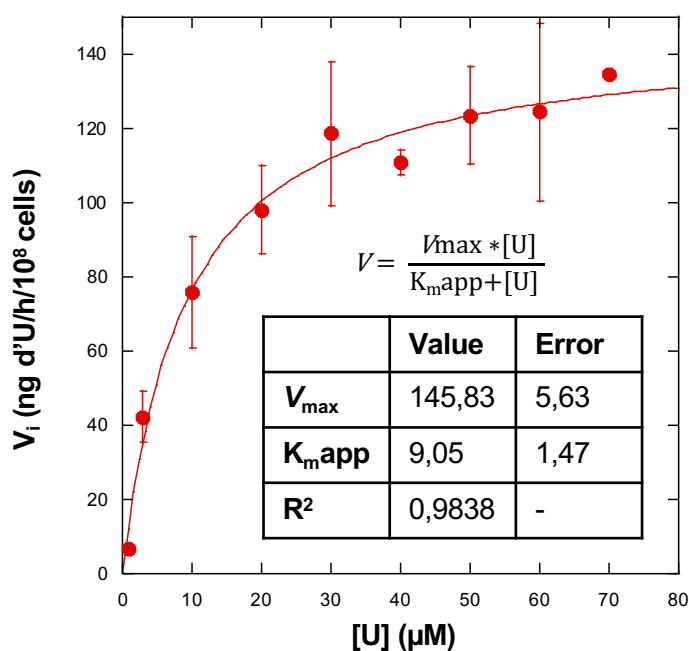


Figure II-3 : Détermination d'un K_m apparent d'incorporation d'uranium dans la levure.

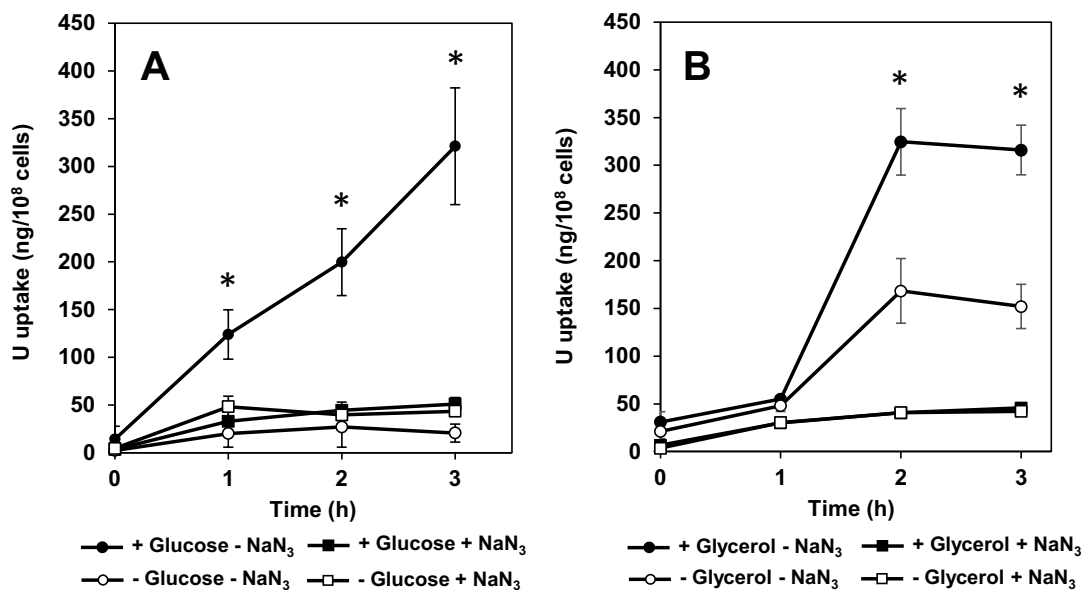
Des cinétiques ont été réalisées à 30°C avec des levures sauvages BY4742 cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle dans un milieu YPD et resuspendues à une dilution de $2 \cdot 10^8$ cellules/ml dans une solution MES 10 mM pH 5,5 en présence de glucose 20 mM en présence de 1 (n = 5), 3 (n = 6), 10 (n = 9), 20 (n = 3), 30 (n = 3), 40 (n = 3), 50 (n = 3), 60 (n = 5) et 70 μM (n = 2) de nitrate d'uranyle. Des prélèvements ont été réalisés à 0 ; 0,5 ; 1 et 1,5 h après ajout de nitrate d'uranyle. Les vitesses initiales déterminées sur chaque cinétique sont représentées en fonction de la concentration en uranium. Les points expérimentaux ont été ajustés avec une équation de Michaelis-Menten permettant de déterminer un K_m apparent de $9,05 \pm 1,5 \mu\text{M}$ et une V_{\max} de 145 ± 6 ng d'uranium incorporé/h/ 10^8 cellules. Les barres d'erreur (écart-type) ont été calculées à partir de « n » expériences indépendantes.

iii. L'entrée d'uranium dans la levure nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle

Afin de tester l'hypothèse d'un transport énergie-dépendant, l'azide de sodium, poison métabolique, a été utilisé. Il permet d'inhiber la respiration cellulaire en affectant notamment l'activité de la cytochrome c oxydase (Keilin, 1936; Slater, 1967; Rikhvanov et al., 2002) bloquant ainsi la production d'énergie issue de la chaîne respiratoire. En présence d'azide de sodium, l'incorporation d'uranium est quasiment abolie (Figure II-4 A).

Ce résultat montre que l'entrée d'uranium nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle. Toutefois, le glucose étant une source d'énergie fermentable, la levure est capable d'activer la voie de fermentation alcoolique, voie secondaire de production d'énergie. Les mêmes expériences ont été réalisées en remplaçant le glucose par du glycérol, source d'énergie non fermentable et les observations ont montré un transport similaire à celui observé en présence de glucose (Figure II-4 B). En effet, les voies métaboliques du glucose et du glycérol sont

distinctes. Les résultats ont montré que l'absorption d'uranium est dépendante de la chaîne respiratoire et non d'une source d'énergie en particulier.



iv. L'entrée de l'uranium dans la levure entre en compétition avec le fer, calcium et cuivre

L'uranium étant un métal non-essentiel, il n'existe pas de transporteur spécifique de celui-ci dans la levure. Il emprunte donc une voie d'absorption dédiée à des métaux ou autres éléments physiologiques. Afin d'identifier les voies mises en jeu, l'effet potentiellement compétiteur de différents métaux essentiels sur l'incorporation d'uranium a été testé. De cette façon, les neuf métaux essentiels suivants : Fe (II), Fe (III), Cu (II), Ca (II), Mg (II), Zn (II), Co (II), Mo (VI) et Mn (II), ont été ajoutés séparément, à plusieurs concentrations, dans le milieu d'incubation contenant du nitrate d'uranyle à 10 μ M. Dans le cas du Fe (III) et Cu (II), une diminution de l'absorption d'uranium a été observée de manière dose-dépendante en présence de 50 μ M et 100 μ M de Fe (III) et de Cu (II) comprenant une diminution de la vitesse initiale d'incorporation

et de son accumulation totale (Figure II-5 A et B). Une diminution de l'absorption d'uranium est également observée pour le Ca (II) et le Fe (II) (Figure II-5 C et D) pour des doses plus élevées allant de 500 μ M à 1 mM. Dans le cas du Fe (II) et du Ca (II), il ne semble pas y avoir de diminution de la vitesse initiale mais seulement de l'accumulation totale d'uranium. Pour les cinq autres métaux testés (Mg (II), Zn (II), Co (II), Mo (VI) et Mn (II)), aucun effet sur l'absorption d'uranium n'a été observé, quelle que soit la concentration testée (Figure II-5 E à I). Ces résultats suggèrent que l'uranium entre dans la levure par plusieurs voies qui sont celles empruntées habituellement par le fer, le calcium et le cuivre.

v. Les systèmes d'absorption de haute affinité de calcium et de fer sont impliqués dans l'absorption d'uranium

Dans le but d'identifier les transporteurs mis en jeu dans l'entrée d'uranium dans la levure, sept mutants de délétion dans les voies d'absorption du fer, calcium et cuivre ont été étudiés dans leur capacité à absorber l'uranium. Trois mutants sont en lien avec le métabolisme du fer : Δ *ftr1*, Δ *fet3* et Δ *smf1*. FTR1 est une perméase composant le système d'absorption de haute affinité du fer qui permet l'entrée de Fe (III). Il agit en complexe avec FET3, oxydase permettant l'oxydation du Fe (II) en Fe (III) (Stearman et al., 1996). SMF1 est le transporteur de faible spécificité de cations divalents incluant le Fe (II) (Chen et al., 1999). Deux mutants sont en lien avec le métabolisme du calcium ; Δ *mid1* et Δ *cch1*. MID1 et CCH1 sont deux sous-unités composant le principal canal calcique de haute affinité chez la levure (Iida et al., 1994). Un mutant est en lien avec le métabolisme du cuivre ; Δ *ctr1*. CTR1 est le principal transporteur de haute affinité de cuivre (Dancis et al., 1994). Les six transporteurs présentés ci-dessus sont localisés sur la membrane plasmique. Le dernier mutant Δ *cot1* est plutôt en lien avec la détoxification des métaux toxiques. COT1 est localisé sur la membrane vacuolaire et permet l'entrée de Zn (II) et Co (II) dans la vacuole (MacDiarmid, 2000). Il est connu que ZRC1, paralogue de COT1 avec 60 % de similitudes confère une plus grande tolérance au cadmium, un métal toxique pour la levure (Conklin et al., 1992).

L'import d'uranium est affecté dans trois de ces mutants : Δ *ftr1*, Δ *mid1* et Δ *cch1*. Dans le mutant Δ *ftr1*, seul le seuil maximal d'absorption d'uranium est affecté, pas la vitesse initiale. En effet, une baisse d'accumulation de l'uranium est observée seulement à partir de 2 h de traitement par rapport à la souche sauvage (Figure II-6 A). Dans les mutants Δ *mid1* et Δ *cch1*, la vitesse initiale d'absorption d'uranium est affectée et une baisse d'accumulation d'uranium

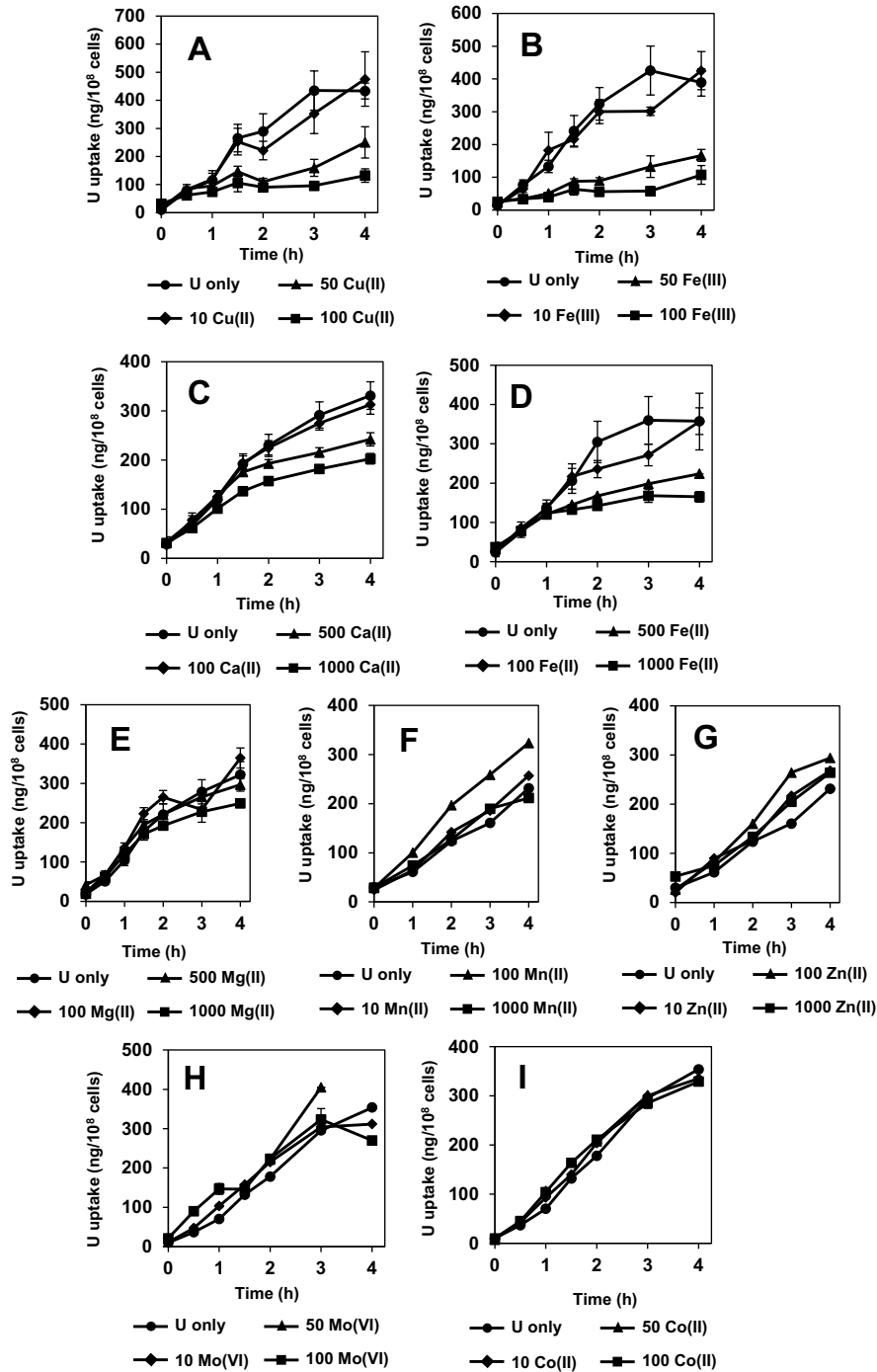


Figure II-5 : Cinétiques d'incorporation de l'uranium chez *S. cerevisiae* : effet de la présence de métaux essentiels.

Les cinétiques ont été réalisées à 30°C avec des levures sauvages BY4742 cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle dans un milieu YPD et resuspendues à une concentration de 2.10^8 cellules/ml dans une solution MES 10 mM pH 5,5 ; glucose 20 mM ; nitrate d'uranyle 10 μ M en présence ou non de concentrations comprises entre 0 et 1000 μ M de CuSO_4 (n = 4) (A), FeCl_3 (n = 4) (B), CaCl_2 (n = 4) (C), FeSO_4 (n = 3) (D), MgSO_4 (n = 2) (E), MnSO_4 (n = 1) (F), ZnSO_4 (n = 1) (G), Na_2MoO_4 (n = 2) (H), CoCl_2 (n = 2) (I). Des prélèvements compris entre 0,5 et 1 ml ont été réalisés après 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 et 4 h de traitement et les cellules ont été récoltées et lavées avec du carbonate de sodium comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. L'uranium incorporé a été dosé par ICP-MS. Les conditions expérimentales n'affectent pas la viabilité cellulaire (voir annexe 1). Les barres d'erreur ont été réalisées sur la base de « n » expériences indépendantes.

est observée à partir d'une heure de traitement (Figure II-6 B et C). Dans le cas de $\Delta ctr1$, une baisse d'accumulation est observée mais n'est pas significative. Pour les quatre autres mutants testés ($\Delta ctr1$, $\Delta fet3$, $\Delta smf1$ et $\Delta cot1$), aucune différence n'est observée par rapport à la souche sauvage. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que les systèmes d'absorption de haute

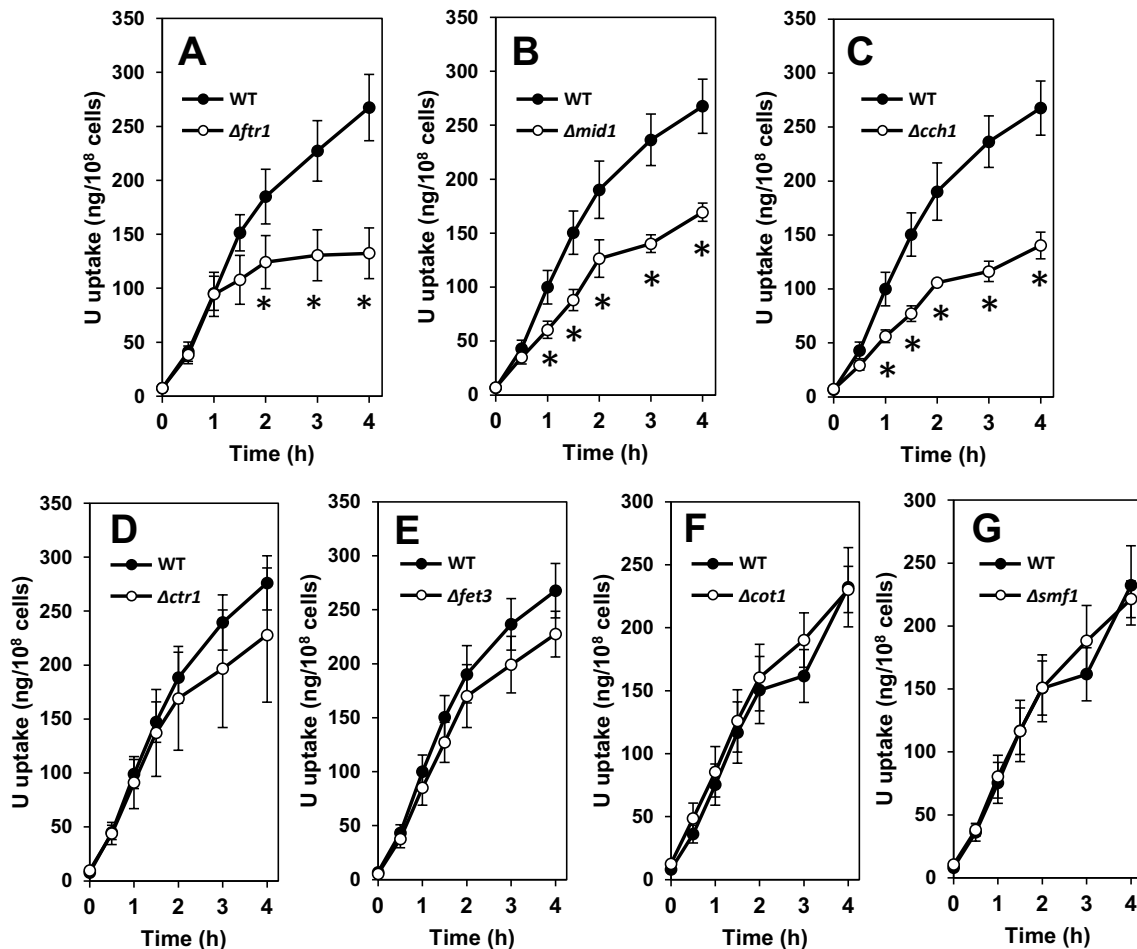


Figure II-6 : Cinétiques d'absorption d'uranium dans différentes souches de *S. cerevisiae* délétées dans divers transporteurs de métaux.

Les cinétiques ont été réalisées à 30°C sur les souches mutantes $\Delta ftr1$ (n = 6) (A), $\Delta mid1$ (n = 3) (B), $\Delta cch1$ (n = 3) (C), $\Delta ctr1$ (n = 5) (D), $\Delta fet3$ (n = 3) (E), $\Delta cot1$ (n = 2) (F), $\Delta smf1$ (n = 2) (G) et leur souche sauvage BY4742 associée (n = 6, 3, 3, 5, 3, 2 et 2 respectivement), cultivées dans un milieu YPD puis resuspendues à une dilution de 2.10^8 cellules/ml dans une solution MES 10 mM pH 5,5 ; 20 mM de glucose (Volume total : 10 ml). Des prélèvements de 1 ml ont été réalisés après 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 et 4 h de traitement et les cellules récoltées et lavées avec du carbonate de sodium comme décrit dans le paragraphe Matériel et Méthodes. L'uranium incorporé a été dosé par ICP-MS. Les différents mutants sont issus de la même souche sauvage BY4742. Les barres d'erreur (écart-type) présentes ont été calculées sur la base de n expériences indépendantes. Les conditions expérimentales n'affectent pas la viabilité cellulaire (voir annexe 1). La significativité statistique a été déterminée à l'aide d'un test non-paramétrique de Dunnett avec * P < 0,001.

affinité de calcium et de fer sont impliqués dans l'absorption d'uranium chez la levure. Nous avons alors voulu compléter le mutant $\Delta mid1$ avec le gène codant pour MID1 afin de savoir si la complémentation restaure l'activité de transport de l'uranium. L'expression ectopique du

gène sauvage *MID1* dans la souche mutante *Δmid1* restaure le niveau d'absorption d'uranium similaire à celui de la souche sauvage, voire des niveaux supérieurs (Figure II-7).

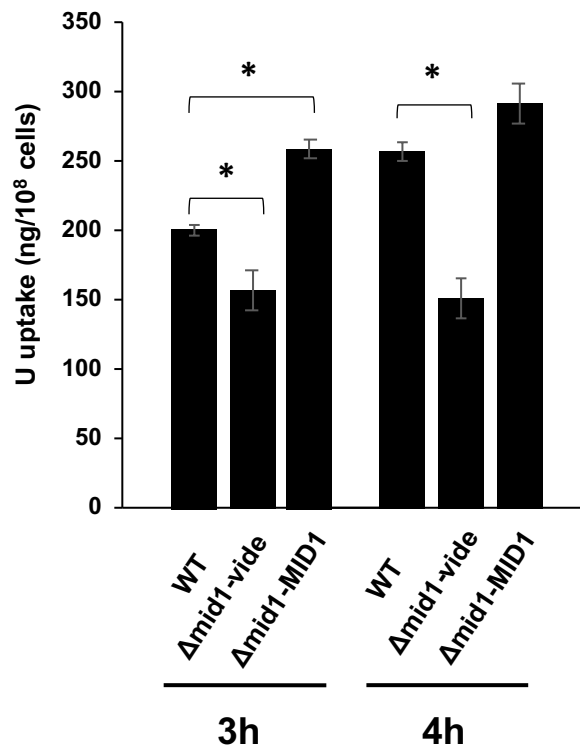


Figure II-7 : Absorption d'uranium dans la souche sauvage (WT), le mutant *Δmid1* complétement avec le plasmide YCp-*MID1* codant le gène *MID1* natif (*Δmid1* – *MID1*) ou avec le plasmide vide correspondant (*Δmid1* – vide), après 3 et 4 h d'incubation en présence de 10 μ M de nitrate d'uranyle.

Les cellules ont été cultivées dans le milieu SD Ca100/Fe10 (URA-) puis resuspendues à une dilution de $2 \cdot 10^8$ cellules/ml dans 10 ml d'un tampon MES 10 mM pH 5,5, glucose 20 mM. Un prélèvement de 1 ml a été réalisé 3 h et 4 h après ajout du nitrate d'uranyle, et les cellules lavées avec du carbonate de sodium 10 mM. L'uranium a été quantifié par ICP-MS. Les barres d'erreur (écart-type) ont été calculées sur la base de trois expériences indépendantes. La significativité statistique a été déterminée à l'aide d'un test non-paramétrique de Dunnett avec * $P < 0,001$.

I - 3. Discussion

i. La levure est capable d'absorber l'uranium, l'adsorption pariétale reste majoritaire

Notre étude a permis de mettre en évidence un transport d'uranium dépendant du métabolisme dans la levure, phénomène encore jamais observé dans la littérature. Cette découverte a été possible par l'élimination du phénomène d'adsorption, ultra-majoritaire par rapport à l'incorporation d'uranium masquant ainsi l'absorption (Sakamoto et al., 2007; Sakamoto et al., 2010; Sakamoto et al., 2012). En effet, nous avons mis en évidence la nécessité d'utiliser du carbonate de sodium afin d'éliminer les grandes quantités d'uranium adsorbées à la surface des cellules permettant ainsi d'observer l'incorporation cellulaire d'uranium. La complexation de l'uranium avec l'ion carbonate CO_3^{2-} en solution est connue depuis de nombreuses décennies (Kitano and Oomori, 1971). Il est l'un des ligands ayant la plus forte affinité pour l'uranyle (Poston et al., 1984) augmentant sa solubilité (Doustaly et al., 2014). Une étude a même proposé un processus basé sur l'utilisation de solutions de carbonate afin d'éliminer les contaminations d'uranium présentes dans les engrais « Triple Super Phosphate » dans lesquels l'uranium est complexé avec du phosphate (Shlewit and Alibrahim, 2008). L'ion carbonate aurait donc une plus forte affinité pour l'uranium que l'ion phosphate, interagissant majoritairement avec l'uranium. L'utilisation de lavages au carbonate de sodium afin de s'affranchir de l'adsorption pariétale a été utilisée dans plusieurs études de l'équipe notamment afin d'éliminer l'uranium à la surface de racines d'*A. thaliana* ou de cellules en culture (Doustaly et al., 2014; Berthet et al., 2018; Serre et al., 2019; Sarthou et al., 2020). Dans le cas de *S. cerevisiae*, ces lavages se sont révélés également très efficaces puisqu'ils ont permis d'éliminer la totalité de l'uranium adsorbée sur les parois pour des concentrations en uranium inférieures à 70 μM et de mettre en évidence une adsorption indépendante du métabolisme et de la température. Nos observations sur l'adsorption sont en accord avec la littérature qui définit la biosorption d'uranium comme un mécanisme très rapide, dont l'équilibre est atteint entre moins d'une minute à 30 minutes selon les conditions d'étude, et principalement basé sur une sorption physico-chimique à la surface de la levure (Volesky and May-Phillips, 1995; Nakajima and Tsuruta, 2002; Faghihian and Peyvandi, 2012; Song et al., 2012; Lu et al., 2013; Wang et al., 2017). De plus, dans l'étude de Lu en 2013, une alcalinisation du pH probablement due à un relargage d'ion hydroxyle est observée. L'échange d'ion semble d'ailleurs être le principal mécanisme d'adsorption (Zhang et al., 2020). Toutefois, dans ces études, le terme « biosorption » se réfère essentiellement à

l'adsorption qui semble fortement majoritaire par rapport à l'incorporation intracellulaire d'uranium. En effet, dans notre étude, plus de 80 % de l'uranium présent dans le milieu a été adsorbé dès le début des expériences. La capacité d'adsorption d'uranium des parois cellulaires de levures est suffisamment grande pour qu'elles soient utilisables comme biosorbant pour la bioremédiation de l'uranium (Wang et al., 2017; Chen et al., 2020a).

Nous avons montré que l'absorption de l'uranium par la levure est dépendante du métabolisme et nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle. De plus, le transport est saturable à des concentrations au-delà de 20 μM de nitrate d'uranyle avec un K_m apparent de $9,05 \pm 1,5 \mu\text{M}$ et une V_{max} de 145 ± 6 ng d'uranium incorporé par heure pour 10^8 cellules. Toutefois, les conditions expérimentales ne sont pas adaptées pour l'utilisation de concentrations en nitrate d'uranyle supérieures à 70 μM , rendant la quantification de l'uranium incorporé plus difficile, probablement à cause de lavages au carbonate moins efficaces.

ii. L'importance de la biodisponibilité de l'uranium pour son absorption

La composition du milieu environnant impacte l'absorption d'uranium dans les êtres vivants en modifiant directement la biodisponibilité du métal déterminée par sa spéciation qui dépend de plusieurs facteurs dont le pH et la présence de ligands. Le pH a un impact important sur la spéciation de l'uranium (Laurette et al 2012a; Wang et al., 2017; Zheng et al., 2018). Des pH basiques favorisent les formes hydroxylées $\text{UO}_x(\text{OH})_y$ et carbonylées $\text{UO}_x(\text{CO}_3)_y$ de l'uranium tandis que des pH acides favorisent la forme libre UO_2^{2+} (Ragnarsdottir and Charlet, 2000), considérée comme une forme très mobile (Song et al., 2012) et la forme la plus biodisponible (Hu et al., 2020). Le pH le plus favorable à la biosorption de l'uranium semble compris entre 4 et 6 (Popa et al., 2003; Faghihian and Peyvandi, 2012). *S. cerevisiae* tolère une très large gamme de pH mais le fonctionnement de son métabolisme semblerait être optimal pour des pH légèrement acides (Mountney and WA, 1988).

La présence de ligands a également un impact direct sur la disponibilité de l'uranium. L'uranium, à cause de sa forte réactivité chimique, a tendance à réagir avec de nombreuses espèces chimiques en solution. Certaines complexations, notamment celles avec le phosphate, diminuent drastiquement la biodisponibilité de l'uranium. En effet, les complexes uranium - phosphate ont tendance à précipiter en solution (Munasinghe et al., 2015). Il est d'ailleurs montré que la présence de phosphate dans le milieu conduit à une très faible absorption et translocation de celui-ci dans de nombreuses espèces végétales (Ebbs et al., 1998a; Misson et

al., 2009; Laurette et al., 2012b) entraînant un plus faible impact toxique (Berthet et al., 2018; Serre et al., 2019). A l'inverse, une suppression du phosphate augmente jusqu'à 4,5 fois l'absorption d'uranium dans *Brassica oleracea* (Soudek et al., 2011). Afin de favoriser l'absorption d'uranium, il est donc conseillé de limiter fortement les quantités de phosphate dans le milieu (Hu et al., 2020). Même si de pH légèrement acide favorise la forme uranyle biodisponible, lorsque le pH est trop acide, la biosorption de l'uranium devient faible à cause d'une compétition indirecte avec les ions H_3O^+ qui saturent les sites de fixation de l'uranium par protonation (Liu et al., 2007). Afin d'optimiser la biodisponibilité de l'uranium, nous avons donc choisi un milieu expérimental simple tamponné avec du MES 10 mM, qui est connu pour sa faible interaction avec les ions métalliques dont l'ion uranyle (Good et al., 1966; Avery and Tobin, 1992; Dittrich and Reimus, 2015), avec un pH fixé à 5,5 permettant de trouver le meilleur équilibre entre la biodisponibilité de l'uranium et les conditions optimales au fonctionnement métabolique des levures. De plus, dans ce milieu et dans nos différentes conditions expérimentales, l'uranium s'est avéré stable et ne précipitait pas.

iii. L'absorption d'uranium dans la levure dépend de la disponibilité d'un substrat énergétique et nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle

Au cours de nos expériences, nous avons mis en évidence que l'absorption d'uranium par la levure nécessitait un transport dépendant du métabolisme puisqu'en absence de source d'énergie (glucose ou glycérol) elle est quasi nulle à 4°C et très faible à 30°C (Figure II-2). L'uranium et le glucose étant capables de former des complexes (Steudtner et al., 2010), l'hypothèse d'un co-transport *via* les transporteurs d'hexose était une hypothèse à prendre en compte. Les transporteurs de glucose sont très nombreux chez *S. cerevisiae*, avec une large gamme d'affinités (Wijsman et al., 2019). Vingt gènes codant des protéines différentes impliquées dans le transport de glucose ont été identifiés (Kruckeberg, 1996; Boles, 1997). La famille principale d'absorption de glucose dans cet organisme est la famille Hxt. Dans *S. cerevisiae*, l'entrée du glucose se fait uniquement par diffusion facilitée (Reifenberger et al., 1997) qui est médiée par les uniporteurs et les canaux (Figure II-8).

Afin d'éprouver l'hypothèse d'un transport de l'uranium en complexe avec le glucose par les transporteurs d'hexose, nous avons utilisé une autre source de carbone, le glycérol, n'ayant pas la capacité de se complexer avec l'uranium. En présence de glycérol, l'absorption d'uranium est similaire à celle observée en présence de glucose ce qui démontre que l'uranium ne rentre pas *via* un transporteur d'hexose. De plus, cette expérience permet d'écarter le processus de

production d'énergie secondaire par la fermentation alcoolique possible en présence de glucose mais pas de glycérol.

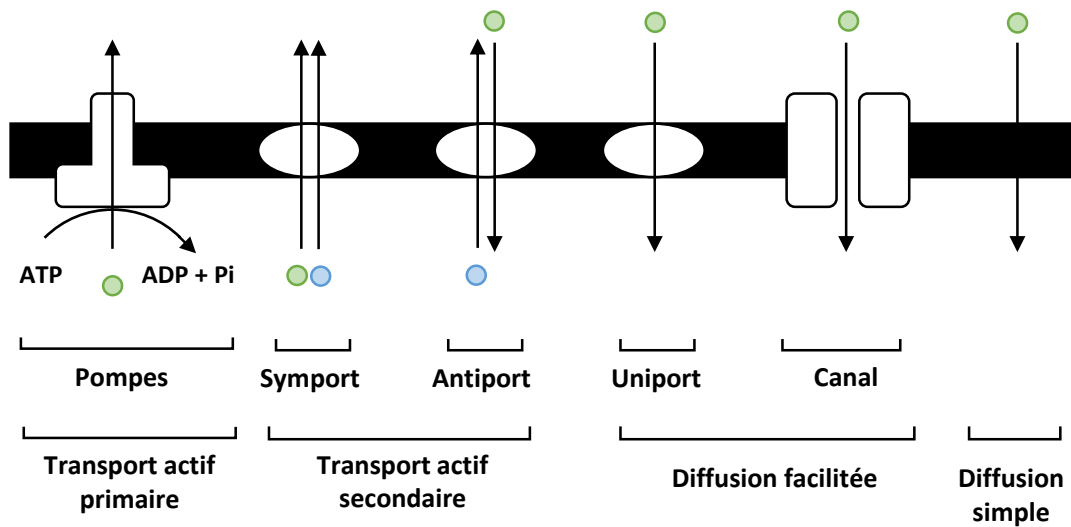


Figure II-8 : Nomenclature des protéines de transport.

Représentation schématique des mécanismes de transport cellulaire. Le transport primaire actif (pompes) et secondaire (symport, antiport) permettent le transport d'ions contre le gradient électrochimique alors que la diffusion facilitée (uniport, canaux), le gradient fournissant la force motrice pour le transport nécessite une source d'énergie, et la diffusion simple (passage au travers de la bicouche lipidique) permettent le transport selon leur gradient électrochimique. Figure adaptée de « Plant nutrition 1: Membrane transport and energetics, potassium nutrition, and sodium toxicity », The plant cell, September 2014. DOI : 10.1105/tpc.114.tt0914

L'utilisation d'azide de sodium, quant à elle, permet de mettre en évidence qu'une chaîne respiratoire fonctionnelle est nécessaire pour l'entrée d'uranium. En effet, l'azide de sodium (NaN_3) est un poison métabolique, utilisé en laboratoire comme un conservateur, qui inhibe la respiration cellulaire en affectant l'activité de la cytochrome c oxydase (Keilin, 1936; Slater, 1967; Rikhvanov et al., 2002). En présence de NaN_3 , à des concentrations n'affectant pas la viabilité des levures (voir Annexe 1), l'absorption d'uranium est abolie, quelle que soit la source d'énergie utilisée (glucose ou glycérol) ce qui montre l'importance de la chaîne respiratoire pour ce mécanisme.

iv. Les voies d'absorption du fer et du calcium sont impliquées dans l'absorption d'uranium dans *S. cerevisiae*

Nous avons observé une inhibition concentration-dépendante de l'absorption d'uranium en présence de Fe^{3+} et de Cu^{2+} ainsi qu'en présence de Fe^{2+} et Ca^{2+} à des concentrations 10 fois plus élevées (Figure II-5 A, B, C et D). Le phénomène d'inhibition peut s'expliquer soit par une

compétition directe entre les deux métaux pour l'entrée dans la cellule, soit par une inhibition de l'activité, de l'expression ou de la stabilité du transporteur associée à la concentration du métal en présence. En effet, une forte concentration de cuivre entraîne la dégradation du transporteur de haute affinité de cuivre CTR1 (Ooi et al., 1996; Yonkovich et al., 2002). Le processus est très rapide puisqu'après seulement 30 min d'exposition à 10 mM de CuSO₄, les effets de la répression sont visibles. Un processus similaire est observé avec FTR1, transporteur de haute affinité du fer chez la levure. De la même manière, une carence en fer entraîne une augmentation de 30 fois l'activité d'absorption de fer et un ajout de 100 µM de Fe³⁺ inhibe jusqu'à trois fois le transport de haute affinité au bout de 4 h (Dancis et al., 1990). Finalement, que l'inhibition soit directe ou due à une répression du transporteur mènent à la même conclusion : les voies d'entrée d'uranium chez la levure sont communes avec celles du calcium, fer et cuivre.

Calcium

Hors système biologique, la présence de calcium a un impact sur les interactions de l'uranium en solution aqueuse. En effet, le calcium a tendance à diminuer l'adsorption de l'uranium sur le quartz ou la ferrihydrite par la formation de complexes Ca₂UO₂(CO₃)₃ (Fox et al., 2006). Le calcium a donc un impact significatif sur la spéciation de l'uranium. Dans les systèmes biologiques, les relations entre absorption d'uranium et présence de calcium ont déjà été étudiées dans différents organismes. Dans *S. cerevisiae*, il est observé qu'à la fois la vitesse initiale de biosorption d'uranium et la quantité d'uranium à l'équilibre sont affectées par la présence de calcium (Strandberg et al., 1981). De plus, sur des temps courts (< 2 h), le calcium est biosorbé moins rapidement en présence d'uranium. A plus de 2 h de cinétique, la présence d'uranium stimulerait la biosorption de calcium. De nombreuses études traitent de la combinaison de billes alginate-calcium avec des microorganismes (souvent des champignons) afin d'augmenter l'absorption d'uranium par le microorganisme dans un but de bioremédiation (Akhtar et al., 2009; Gok and Aytas, 2009; Ding et al., 2012; Basu et al., 2018). Chez les plantes, une étude récente montre que l'accumulation d'²³⁸U dans les plantes est directement reliée à la quantité de calcium mobile présent dans le sol (Ratnikov et al., 2020). Une seconde étude met en évidence la compétition de l'absorption d'uranium avec le calcium dans *Brassica juncea* où des ajouts progressifs de calcium entraînent une réduction de la vitesse initiale d'absorption de l'uranium. A partir de 240 mg/l de calcium, l'absorption d'uranium n'est plus mesurable (El Hayek et al., 2018). Enfin, chez l'homme il est montré que l'uranyle, en plus de se fixer majoritairement dans les os, tissus très riches en calcium, est capable de se fixer sur des

protéines avec de fortes affinités pour le calcium comme la calmoduline (Le Clainche and Vita, 2006; Pardoux et al., 2012; Brulfert et al., 2016) ou l'ostéopontine (Safi et al., 2013; Qi et al., 2014; Creff et al., 2019).

Nos résultats confirment toutes ces données bibliographiques montrant une similitude chimique entre l'uranyle et le calcium. En effet, nos données montrent une inhibition de l'entrée d'uranium en présence de 500 à 1000 μM de Ca^{2+} dans la levure *S. cerevisiae* (Figure II-5 C). L'analyse des mutants *Amid1* et *Acch1*, CCH1 et MID1 étant les deux sous-unités interdépendantes formant le principal canal calcique de haute affinité dans la levure (Iida et al., 1994; Fischer et al., 1997; Iida et al., 2004), renforce l'hypothèse que les voies d'absorption d'uranium sont communes avec celles du calcium. En effet, ces deux mutants *Amid1* et *Acch1* présentent le même phénotype, à savoir une inhibition de la vitesse initiale de l'absorption d'uranium ainsi que de l'accumulation totale d'uranium (Figure II-6 B et C). Cette observation est cohérente car les deux protéines MID1 et CCH1 interagissent et sont interdépendantes. Le canal calcique ne peut fonctionner en l'absence de l'une des deux. En effet, une surexpression de l'une d'entre elles ne rétablit pas l'absorption de Ca^{2+} dans le double mutant *Amid1/Acch1*, la co-expression des deux se révèle nécessaire pour restaurer l'absorption de calcium (Iida et al., 2004). MID1 est identifiée comme une sous-unité régulatrice du canal calcique et CCH1 la sous-unité formant le pore du canal voltage-dépendant (Hong et al., 2013). Ce système de haute affinité est présent à un niveau basal dans des conditions normales et est fortement activé par de nombreux stimuli comme un stress osmotique (Matsumoto et al., 2002), alcalin (Viladevall et al., 2004) ou métallique (Gardarin et al., 2010), un choc hypotonique (Batiza et al., 1996), l'addition d'hexose (Tökés-Füzesi et al., 2002) ou d'éthanol (Courchesne et al., 2011) ou encore une stimulation par l'ajout du facteur α , hormone de reproduction (Paidhungat and Garrett, 1997), et enfin la déplétion calcique (Locke et al., 2000).

Dans le fonctionnement de canaux, le rayon atomique des espèces prises en charge est primordial. Or, l'ion UO_2^{2+} et l'ion Ca^{2+} possèdent un rayon ionique similaire autour de 200 pm. De ce fait, nos résultats suggèrent que l'uranium entre dans la levure en partie grâce au canal calcique MID1/CCH1, connu également pour faire entrer d'autres métaux toxiques comme le cadmium (Gardarin et al., 2010). Même si le canal CCH1/MID1 n'est pas un transporteur actif au sens propre du terme, une source d'énergie reste nécessaire à son fonctionnement. En effet, le calcium est un macroélément pour la levure, il est donc très abondant. Toutefois, une faible concentration cytosolique (50 – 200 nM) de cet ion est nécessaire pour assurer sa fonction de signalisation. La majorité du calcium est séquestré dans

la vacuole qui renferme plus de 90 % du calcium intracellulaire et sa régulation est assurée par de nombreuses pompes et échangeurs de Ca^{2+} . En absence d'énergie, ces transporteurs vacuolaires deviennent inactifs entraînant une dérégulation de l'homéostasie du calcium cytosolique qui entraîne un dysfonctionnement des systèmes d'influx de haute affinité pour le calcium, notamment CCH1/MID1 (Cyert and Philpott, 2013). L'augmentation du calcium cytosolique permet en particulier d'activer la calcineurine, phosphatase régulatrice des systèmes de transport calcique. La calcineurine a, comme rôle majeur, la déphosphorylation de CCH1, le rendant ainsi inactif. De cette manière, le canal calcique CCH1/MID1 dépend indirectement d'une source d'énergie et si CCH1/MID1 est un transporteur majeur d'uranium, cela expliquerait que l'entrée de celui-ci soit fortement inhibée en l'absence d'une source d'énergie. De plus, l'affinité du complexe MID1/CCH1 pour le calcium est de l'ordre de 45 μM (Boutry et al., 1977) et le K_m apparent estimé pour l'uranium est d'environ 10 μM . Cette différence de K_m pour chacun des deux métaux peut expliquer les concentrations importantes nécessaires pour observer une compétition avec l'uranium. Toutefois, l'inhibition d'absorption d'uranium dans les mutants $\Delta mid1$ et $\Delta cch1$ n'étant pas totale, d'autres voies d'import sont probablement impliquées. C'est d'ailleurs également le cas pour le calcium. En effet, l'équipe d'Iida *et al.* a montré que l'absorption de calcium chez les mutants $\Delta mid1$ et $\Delta cch1$ n'était pas complètement inhibée. Ainsi, il est intéressant de constater que les deux cinétiques d'incorporation de calcium et d'uranium sont similaires chez les mutants calciques (Figure II-6) (Iida et al., 1994; Nakagawa et al., 2007).

Fer

En effet, une compétition est également observée en présence de Fe^{2+} et Fe^{3+} (Figure II-5 B et D). Les relations entre uranium et fer sont étudiées depuis de nombreuses années. Une étude transcriptomique de l'équipe parue en 2014 a mis en évidence une répression des transporteurs de fer (NRAMP1, IRT1) ainsi que des protéines régulatrices associées (FRO2, FIT1) chez la plante modèle *A. thaliana* (Doustaly et al., 2014) en présence de nitrate d'uranyle. Les deux hypothèses mises en avant pour expliquer le phénomène sont basées sur les similarités chimiques de l'ion uranyle et de l'ion ferrique. En effet, la première hypothèse propose que les senseurs de Fe^{3+} reconnaîtraient l'ion uranyle comme un ion ferrique entraînant une inhibition de l'expression des transporteurs de fer comme dans le cas de fortes concentrations en fer. La seconde hypothèse suppose que l'uranium se substituerait au Fe^{3+} le relarguant dans la cellule entraînant une répression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. En 2018, il a été mis en évidence un effet positif, notamment sur la photosynthèse d'un ajout de nitrate d'uranyle à

de faibles doses. Ce phénomène s'expliquerait par la capacité de l'uranium à remplacer le fer des complexes fer – phosphate dans la vacuole ou la paroi augmentant la disponibilité du fer pour les chloroplastes (Berthet et al., 2018). Enfin, plusieurs protéines fixatrices de fer ont été mises en évidence pour lier l'uranium comme la transferrine (Vidaud et al., 2007) et la ferritine (Cvetkovic et al., 2010), deux protéines fixatrices de fer, l'une étant impliquée dans son transport et l'autre dans son stockage en tant que co-facteur.

Ces relations entre fer et uranium sont confirmées par nos résultats qui montrent une inhibition d'entrée d'uranium en présence de Fe^{3+} et Fe^{2+} (Figure II-5 B et D). Les analyses de mutants dans le complexe d'absorption de haute affinité de fer FTR1/FET3 montrent que l'absorption d'uranium est affectée dans *Δftr1* mais pas dans *Δfet3*. FET3 est une ferro- O_2 -oxydoreductase avec la capacité d'oxyder Fe^{2+} en Fe^{3+} et de le rendre disponible pour FTR1, perméase assurant l'entrée du Fe^{3+} dans le cytoplasme de la levure. Une étude de Stearman en 1996 montre qu'en absence de FET3, FTR1 n'est pas fonctionnel. Lors de sa maturation, FTR1 est localisée sur la membrane de l'appareil de Golgi. Lorsque FET3 se charge en cuivre, il interagit avec FTR1 ce qui déclenche l'activation du complexe par relocalisation sur la membrane plasmique (Stearman et al., 1996) (Figure II-9). En absence de FET3, comme dans le cas du mutant *Δfet3*, FTR1 ne devrait donc pas être actif. Or, l'absorption d'uranium est affectée dans *Δftr1* mais pas dans *Δfet3*. Il est connu que la cellule compense la délétion de FET3 en surexprimant FET4, transporteur de faible affinité de fer permettant de compléter le phénotype (Li and Kaplan, 1998). Aucune étude ne montre ce phénomène lors de la délétion de FTR1. Si les différences entre les mutants *Δftr1* et *Δfet3* dans l'absorption d'uranium s'expliquent de cette manière, cela signifierait que l'uranium emprunte le transporteur FET4 dans *Δfet3*. En effet, une compétition entre l'uranium et le Fe^{2+} est observée (Figure II-5 D). Comme SMF1, seul transporteur de Fe^{2+} testé ici, ne semble pas impliqué dans le transport d'uranium, l'entrée de l'uranium par FET4 est donc une hypothèse plausible. De plus, que ce soit chez FET3 (Bonaccorsi di Patti et al., 2000; Quintanar et al., 2004) ou FET4 (Dix et al., 1997), le site de liaison du fer sur ces deux protéines est une zone très riche en glutamate et aspartate, acides aminés pour lequel l'uranium a de fortes affinités. De ce fait, on peut imaginer que l'uranium est capable de se fixer sur ces deux protéines et que dans le cas du transporteur FET4, l'uranyle se fixe puis emprunte ce transporteur pour entrer dans la cellule. Dans le cas de l'oxydase FET3, il y aurait uniquement fixation sur la protéine. Dans l'étude de Bonaccorsi di Patti en 2005, il est suggéré que FTR1 jouerait le rôle de protecteur de FET3 durant la maturation. En absence de FTR1, le site sensible à la protéolyse de FET3 serait accessible entraînant une dégradation de FET3. Partant de ces

observations, les différences observées entre les mutants *Δftr1* et *Δfet3* concernant le transport de l'uranium pourraient s'expliquer par une surexpression de FET4 dans *Δfet3*.

Dans le mutant *Δftr1*, l'absorption d'uranium semble être affectée uniquement au niveau de son accumulation mais pas au niveau de la vitesse initiale d'incorporation (Figure II-6 A). Or, en cas d'emprunt de FTR1 par l'uranium, on aurait pu s'attendre à ce que la vitesse initiale soit aussi affectée. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la multiplicité des voies d'entrée de l'uranium. Nos expériences de compétition nous montrent que plusieurs voies d'entrée sont probables (fer, calcium, cuivre). Afin d'expliquer cette observation dans *Δftr1*, on peut supposer qu'il existe au moins deux catégories de transporteurs permettant l'entrée d'uranium, un de haute affinité et un de plus faible affinité pour l'uranium. De cette manière, à des temps d'incubation courts ($t < 1$ h), l'uranium étant présent en forte quantité dans le milieu, le système de faible affinité serait mis à contribution ne modifiant donc pas la vitesse initiale de l'absorption d'uranium dans un mutant de transport à haute affinité. A des temps plus longs ($t > 1$ h), où l'uranium est présent en plus faible quantité, ce serait le transport de forte affinité qui permettrait l'entrée d'uranium, en l'occurrence ici ce serait le transporteur FTR1 (absent dans *Δftr1*). Le K_m apparent de FTR1 pour Fe^{3+} est de l'ordre de $0,15 \mu M$ ce qui explique que les faibles concentrations en Fe^{3+} (inférieures d'un facteur 10 à celles en calcium) nécessaires pour observer une compétition avec l'uranium. Toutefois, nous montrons que dans nos conditions expérimentales une forte proportion de l'uranium présent dans le milieu est très rapidement adsorbée à la surface des cellules. Cela voudrait dire, pour que cette hypothèse soit valable, que l'uranium adsorbé soit capable d'être ensuite internalisé. Dans le cas contraire, il n'y aurait qu'une faible proportion biodisponible (non adsorbé) d'uranium et l'hypothèse énoncée serait caduque.

L'absorption de Fe^{2+} dans la levure est plus complexe. Les transporteurs sont nombreux et souvent peu spécifiques à l'image de SMF1, seul transporteur de Fe^{2+} analysé dans cette étude qui est un système de transport de nombreux cations divalents dont Mn^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{2+} (Portnoy and Culotta, 2003). Aucune inhibition de l'absorption d'uranium n'a été observée chez le mutant *Δsmf1*. L'uranium rentrerait donc préférentiellement avec le système de haute affinité pour le fer FTR1. Ce résultat est en accord avec les compétitions observées en présence de fer. En effet, la compétition avec le Fe^{2+} était observée à des concentration environ 10 fois plus élevées qu'avec Fe^{3+} . L'étude des mutants peut nous donner une explication à cette différence. SMF1 est un transporteur constitutif de Fe^{2+} (Cohen et al., 2000) contrairement à FTR1, transport de haute affinité de Fe^{3+} induit par une carence de fer par le facteur de transcription

Aft1 (Eide, 1998; Philpott and Protchenko, 2008). Fe^{2+} est une forme soluble et biodisponible du fer. Dans ce cas, il n'y a pas de carence, le système de haute affinité FTR1 n'est pas exprimé, son absorption passe donc par SMF1, transporteur de faible affinité, faiblement saturable. En revanche, Fe^{3+} est une forme très peu soluble du fer (Cyert and Philpott, 2013), le rendant peu biodisponible pouvant créer une carence. Il ne peut être absorbé par aucun système d'absorption du fer sans passer par une étape de réduction par FRE1/2, réductases présentes sur la membrane plasmique, (ou une chélation avec des sidérophores) le rendant biodisponible (Figure II-8).

Cuivre

Le dernier métal montrant une compétition avec l'entrée d'uranium est le cuivre. Si les relations entre l'uranyle et le cuivre sont bien moins étudiées, il est connu chez la levure que les systèmes d'absorption de fer et de cuivre sont directement liés. En effet, FET3, composant du système de haute affinité de fer, nécessite 4 atomes de cuivre comme co-facteur pour être actif (Dancis et al., 1994; De Silva et al., 1995; Stearman et al., 1996; Hassett et al., 1998) (Figure II-9). Le système d'absorption de cuivre est donc indispensable au fonctionnement de celui de haute affinité de fer. De ce fait, si la compétition avec l'uranium s'opère au niveau du transporteur de cuivre, il pourrait y avoir un impact sur l'absorption de fer. Il n'est donc pas incohérent que s'il y a une compétition entre l'uranium et le fer, une compétition avec le cuivre soit observée.

Toutefois, dans *S. cerevisiae*, le transporteur de haute affinité de cuivre CTR1 ne semble pas impliqué dans l'entrée d'uranium ce qui explique qu'aucun effet n'ait été observé sur le mutant $\Delta ctr1$ (Figure II-6 D). Toutefois, si CTR1 est le transporteur majoritaire de cuivre dans la levure, il existe CTR3, autre transporteur de haute affinité de cuivre qui est redondant avec CTR1. Cependant, le gène correspondant à CTR3 est inactivé dans la plupart des souches de laboratoires par un transposon TY2 dont S288C, la souche parentale de BY4247 utilisée dans notre étude (Knight et al., 1996). Même si CTR1 n'est pas impliqué dans l'absorption d'uranium, l'entrée *via* un autre transporteur de cuivre reste possible.

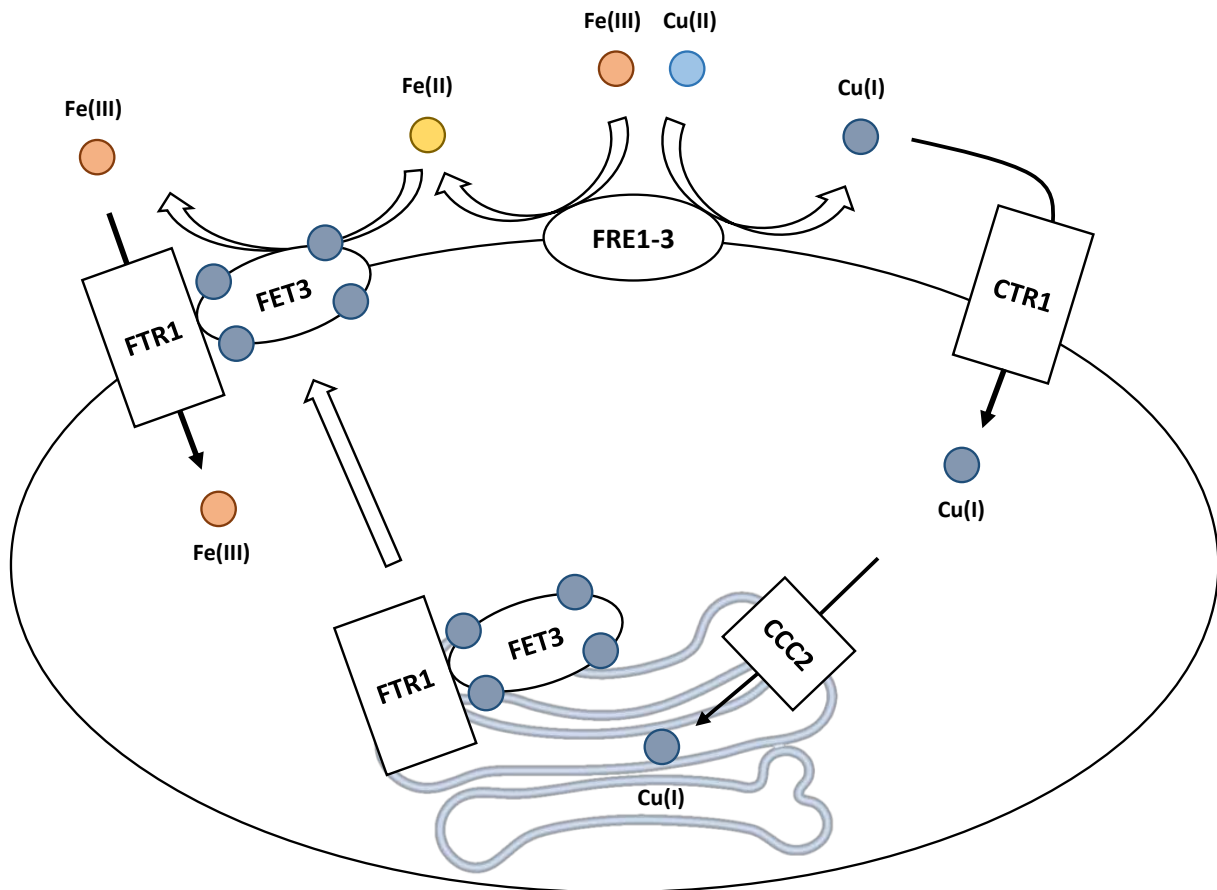


Figure II-9 : Mécanisme d'absorption du cuivre et du fer dans *S. cerevisiae*.

Le Cu(II) est réduit en Cu(I) par les réductases FRE1-3. Cu(I) est internalisé dans la cellule avec CTR1, transporteur de haute affinité de cuivre. Il entre dans l'appareil de Golgi par le transporteur CCC2 qui permet sa fixation sur la sous-unité FET3 associée à FTR1, transporteur de haute affinité de fer. Le chargement de FET3 avec quatre atomes de cuivre déclenche l'activation du complexe FET3/FTR1 par relocalisation sur la membrane plasmique. Le Fe(III), faiblement soluble et biodisponible, est réduit en Fe(II) par les réductases FRE1-3 qui est ensuite pris en charge par l'oxydase FET3 qui oxyde Fe(II) en Fe(III) et l'envoie directement à FTR1 qui prend en charge l'internalisation de Fe(III).

I - 4. Matériels et méthodes

i. Souches de levure, bactéries et plasmides utilisés

Les souches de levures utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau II – 1. Les souches mutantes sont issues de la banque de mutants créée dans le cadre du *Saccharomyces* Genome Deletion Project (http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html) et sont toutes dérivées de la souche sauvage BY4742 (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*).

Les plasmides monocopies YCpMID1 (URA3) (Iida et al., 2004), pBCS-CCH1 (LEU2) (Iida et al., 2007), et multicopies YEpTDHXho-MCA1 (LEU2) et YEpTDHXho-MCA2 (LEU2) (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010) utilisés au cours de ce travail ont été gracieusement fournis par le professeur Iida (Université de Tokyo). Les plasmides vides pRS315 (LEU2) et pRS316 (URA3) de type YCp ont également été utilisés (Sikorski and Hieter, 1989) (Tableau II-2). Nous disposons également des plasmides multicopies YEp351-FTR1-myc, YEp352-FET3-HA, ainsi que les plasmides vides correspondants, YEp351 et YEp352 fournis par le Dr Stearman (Université de l'Indiana).

Des souches *E. coli* DH5 α ont été utilisées pour l'amplification des plasmides YCpMID1, YEpTDHXho-MCA1 et YEpTDHXho-MCA2. La souche *E. coli* XL10-Gold a été utilisé pour l'amplification du plasmide pBCS-CCH1.

Souche	Génotype	Caractéristique mutation	Références
BY4742	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Sauvage	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YER142C	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>ptr1</i></i>	FTR1, perméase de haute affinité du fer	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YMR058W	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>fet3</i></i>	FET3, ferro-O ₂ -oxydoreductase	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YNL291C	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>mid1</i></i>	MID1, sous-unité régulatrice de CCH1	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YGR217W	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>cch1</i></i>	CCH1, canal calcique voltage-dépendant, interagit avec MID1	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YOL122C	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>smf1</i></i>	SMF1, transporteur large spécificité de cations divalents	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YOR316C	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>cot1</i></i>	COT1, transporteur vacuolaire de zinc, confère résistance au cobalt et rhodium	Winzeler <i>et al.</i> 1999
YPR124W	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>ctr1</i></i>	CTR1, transporteur de haute affinité de cuivre	Winzeler <i>et al.</i> 1999

Tableau II-1 : Tableau des souches de levures utilisés dans cette étude.

Plasmide	Nature du plasmide	Marqueurs de sélection (Bactérie, levure)	Protéine exprimée	Référence
YCpMID1	Faible copie	Amp, URA3	MID1	Iida <i>et al.</i> 2004
pBCS-CCH1	Faible copie	Amp, LEU2	CCH1	Iida <i>et al.</i> 2007
YEpTDHXho-MCA1	Multicopie	Amp, LEU2	MCA1, canal calcique dans <i>A. thaliana</i>	Nakagawa <i>et al.</i> 2007
YEpTDHXho-MCA2	Multicopie	Amp, LEU2	MCA2, canal calcique dans <i>A. thaliana</i>	Yamanaka <i>et al.</i> 2010
pRS315	Faible copie	Amp, LEU2	Vide	Sikorski et Hieter 1989
pRS316	Faible copie	Amp, URA3	Vide	Sikorski et Hieter 1989
YEp351-FTR1-myc	Multicopie	Amp, LEU2	FTR1	Stearman <i>et al.</i> 1996
YEp352-FET3-HA	Multicopie	Amp, URA3	FET3	Stearman <i>et al.</i> 1996
YEp351	Multicopie	Amp, LEU2	Vide	Stearman <i>et al.</i> 1996
YEp352	Multicopie	Amp, URA3	Vide	Stearman <i>et al.</i> 1996

Tableau II-2 : Tableau des plasmides de levures utilisés dans cette étude.

ii. Conditions de culture des levures

Les souches de levures ont été cultivées dans un incubateur INFORS à 120 rpm à 30°C dans un milieu riche YPD (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose) ou YPG (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 ml/l glycérol) ou dans un milieu sélectif modifié SD Ca100/Fe10 ou Ca100 selon les cas (6,7 g/l yeast nitrogen base contenant 100 µM de CaCl₂ au lieu de 900 µM et 10 µM de FeCl₃ au lieu de 1 µM lorsque indiqué, 5 g/l ammonium sulfate, 20 g/l glucose) supplémenté de tous les acides aminés sauf l'uracile (SD-URA) ou la leucine (SD-LEU) selon les expériences, jusqu'en fin de phase exponentielle.

iii. Cinétiques d'incorporation d'uranium

Les cultures de levures en suspension ont été centrifugées à 4 000 g pendant 5 min. Les culots ont été lavés 2 fois avec de l'eau distillée puis centrifugés 4 000 g pendant 5 min. Ils ont ensuite été resuspendus à 2.10⁸ cellules/ml dans un milieu MES 10 mM pH 5,5 avec une source de carbone, glucose 20 mM ou glycérol 3% dans un volume total de 10 ml. Les suspensions ont été incubées à 4°C ou 30°C sur un incubateur rotatif à 20 rpm en présence de nitrate d'uranyle (UO₂(NO₃)₂.6H₂O) comme source d'U (VI) à une concentration comprise entre 0 et 200 µM placés dans une enceinte Xtemp (Mechanical Convection Oven XT5116 – IN140). Selon les expériences, des métaux essentiels potentiellement compétiteurs de l'uranium ont été ajoutés à

des concentrations allant jusqu'à 1 mM (FeCl₃, CuSO₄, CoCl₂, ZnSO₄, Na₂MoO₄, MnSO₄, FeSO₄, MgSO₄ et CaSO₄). Des prélèvements de 100 à 200 millions de cellules ont été réalisés à différents temps compris entre 0 et 24 h après ajout du nitrate d'uranyle. Les prélèvements ont été centrifugés à 14 000 g pendant 2 min. Les culots ont ensuite été lavés deux fois avec une solution de carbonate de sodium 10 mM et récupérés par centrifugation à 14 000 g pendant 2 min.

iv. Quantification de l'uranium

Les culots de levures ont été minéralisés 4 h dans de l'acide nitrique 65 % (m/v). Les échantillons ont ensuite été dilués 200 fois dans de l'acide nitrique 0,5 % (v/v) et analysés avec un ICP-MS iCAP-RQ (Thermo Fischer Scientific). Les concentrations en ²³⁸U ont été déterminées à partir de gamme étalon obtenues en mode standard. Les données ont été corrigées par l'intégration des standards internes ⁴⁵Sc, ¹⁰³Rh, ¹⁷²Yb injectés en parallèle dans les échantillons. L'intégration des données a été effectuée par le logiciel Qtegra (Thermo Fischer Scientific).

v. Comptage et viabilité cellulaire

Les cellules ont été comptées à l'aide d'un compteur cellulaire LUNA (LogosBiosystems) selon les recommandations du fournisseur. La viabilité cellulaire a été analysée à l'aide du kit Yeast Viability Kit (LogosBiosystems) basée sur la coloration à l'iodure de propidium. Les cellules marquées ont été quantifiées à l'aide d'un compteur cellulaire LUNA (LogosBiosystems). Dans toutes les conditions expérimentales testées au cours de cette étude, la viabilité des cellules était peu ou pas affectée en fin expérience (Annexe 1).

vi. Transformation des levures

Toutes les transformations de cette étude ont été réalisées selon le protocole décrit par Kuo and Campbell, 1983). Les souches levures mutées YNL291C et YGR217W ($\Delta mid1$ et $\Delta cch1$ respectivement) ont été transformées avec les différentes constructions plasmidiques décrites plus haut par choc thermique. Des cultures concentrées à $3 \cdot 10^7$ cellules/ml ont été centrifugées 5 min à 5000 g à température ambiante. Les culots ont été lavés avec de l'eau stérile puis centrifugés 5 min à 5000 g. Ils ont ensuite été resuspendus dans 0,2 volume d'acétate de lithium (LiAc) à 0,1 M. Le mélange est incubé 30 min à 30°C puis centrifugé 5 min à 5000g à température ambiante. Les culots sont resuspendus dans 0,01 volume de LiAc à 0,1 M. Les plasmides ont ensuite été ajoutés. Le mélange a été incubé 30 min à 30°C avant d'ajouter 100

μl de solution de PEG4000 à 175 mg/ μl . Après ajout, le mélange a été incubé 1 h à 30°C puis 5 min à 42°C. Une centrifugation de 30 sec à 8000 rpm a été réalisée à la suite de laquelle le surnageant a été éliminé et les culots suspendus dans 600 μl d'eau avant d'être étalés sur boîte contenant le milieu SD avec la sélection adéquate (- URA ou - LEU). Après incubation à 30°C, les transformants apparaissent après trois jours et cinq colonies de chaque souche ont été repiquées sur des boîtes en milieu sélectif.

vii. Analyses statistiques

Des analyses non-paramétriques ont été réalisées sur nos données qui sont de petites tailles ($n < 10$). Des comparaisons multiples non-paramétriques ont été réalisées avec le test de Dunnett en utilisant le package NPARCOMP (Konietschke et al., 2015) dans le logiciel R (R Development Core Team, 2011). L'option d'approximation normale a été utilisée et le niveau de confiance fixé à 99,9 %.

**III - Développement d'approches
biochimiques permettant l'identification
de protéines fixatrices d'uranium (UBP)
et analyse structurale de GRP7, une
UBP candidate**

I - 1. Introduction

L'uranium, et particulièrement l'ion uranyle, entraîne de nombreux effets toxiques chez toutes les espèces vivantes. Une fois entré dans la cellule, l'ion uranyle interagit avec les biomolécules cellulaires, principalement les protéines. Dans le chapitre précédent, les voies d'entrée d'uranium dans une cellule vivante ont été explorées ce qui a permis de mettre en évidence pour la première fois les voies d'absorption de fer et de calcium comme responsables de l'entrée d'uranium dans la levure. Dans ce second chapitre, nous proposons d'identifier les cibles protéiques solubles de l'uranyle dans les cellules végétales. En effet, les protéines sont des biomolécules impliquées dans de nombreux processus cellulaires et ont des rôles clés dans le métabolisme les plaçant au cœur des mécanismes de toxicité des métaux non-essentiels et, plus particulièrement, l'uranium. De nombreuses protéines sont connues pour interagir avec l'ion uranyle et pour la grande majorité, identifiées chez l'Homme. L'interaction de l'uranyle avec ces protéines peut entraîner des changements structuraux dans le cas de l'ostéopontine (Qi et al., 2014; Huynh et al., 2016), la calmoduline (Le Clainche and Vita, 2006; Pardoux et al., 2012; Brulfert et al., 2016), la transferrine (Vidaud et al., 2007; Hémadi et al., 2011) ou la fêtuine A (Basset et al., 2013; Huynh et al., 2016). Ces interactions permettent parfois d'expliquer les mécanismes de toxicité de l'uranyle comme dans le cas du complexe cytb₅-cytc où l'uranyle est capable de rompre ce complexe entraînant un processus d'apoptose (Sun et al., 2014; Liu et al., 2015a). D'autres exemples montrent que l'uranyle peut perturber la liaison de facteurs de transcription à l'ADN notamment en ciblant les motifs en doigts de zinc (Hartsock et al., 2007). D'autres conséquences de l'interaction de l'uranyle avec les protéines sont connues comme la propriété photocatalytique de l'uranyle entraînant le clivage protéique ou de l'ADN (Nielsen et al., 1990; He et al., 2020).

Dans la plante, si les impacts toxiques de l'uranyle sont assez bien étudiés, aucune cible protéique de l'uranyle n'a encore été identifiée à notre connaissance. Des études d'identification de protéines fixatrices d'uranium ont été entreprises dans divers organismes comme la bactérie (Cvetkovic et al., 2010), le rat (Frelon et al., 2009), l'écrevisse (Xu et al., 2014a) ou encore l'Homme (Vidaud et al., 2005; Van Horn and Huang, 2006; Pible et al., 2006; Carugo, 2018; Vidaud et al., 2019). Toutes les approches développées dans ces études ont en commun d'utiliser la séparation protéique par colonnes chromatographiques combinée ou non avec la séparation sur gels. Notre objectif a été d'identifier des protéines interagissant *in vivo* avec l'uranium qui pourraient soit être impliquées dans la détoxification de l'uranium soit être des

cibles de toxicité de l'uranium. Pour les identifier, nous avons utilisé une approche de métallogénomique combinant des techniques de séparation des protéines efficaces et qui respectent les interactions uranyle-protéine et des systèmes d'identification des protéines et des métaux très performants (LC-MS/MS couplée ou non à de l'électrophorèse bidimensionnelle et ICP-MS) appliquée à des extraits protéiques issus de cultures cellulaires liquides d'*A. thaliana* exposées à du nitrate d'uranyle. L'utilisation de ce modèle d'étude a permis d'obtenir de grandes quantités de protéines tout en s'affranchissant de la compartimentation histologique des plantes supérieures comme *A. thaliana*.

I - 2. Résultats

i. Mise en place d'un protocole optimisant la fixation *in vivo* de l'uranium aux protéines intracellulaires des cellules d'*A. thaliana*

Dans l'objectif d'identifier des protéines fixatrices d'uranium (UBP) *in cellulo*, il était nécessaire de mettre en place un protocole expérimental maximisant l'entrée d'uranium dans les cellules et, plus particulièrement, la fixation de l'uranium aux protéines. Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences avec des cellules d'*A. thaliana* concentrées à 10 g de masse fraîche pour 100 ml, traitées avec 50 μM de nitrate d'uranyle dans un milieu de Murashige et Skoog contenant 30 μM de phosphate au lieu de 1,5 mM (milieu nommé « Low Phosphate », LP) (Sarhou et al., 2020). Après 24 h de traitement, les cellules ont été récoltées et lavées avec une solution de carbonate de sodium 10 mM afin de désorber l'uranium fixé sur les parois cellulaires. Dans ces conditions expérimentales, 50 μM de nitrate d'uranyle étant une dose sublétales (Berthet et al., 2018), la croissance cellulaire n'est pas affectée (Annexe 2). Après lyse des cellules dans un milieu Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; DTT 1 mM (voir Matériel et Méthodes), le culot (partie insoluble) contient les membranes et la paroi pectocellulosique tandis que le surnageant contient les composés cellulaires solubles dont les protéines cytoplasmiques. La proportion d'uranium présente dans les parties soluble et insoluble d'uranium a été quantifiée par ICP-MS. Dans ces conditions, seulement $1,4 \pm 0,8$ % de l'uranium se retrouve sous forme soluble, la quasi-totalité ($> 96 \pm 5$ %) étant sous forme insoluble (Figure III-1 A). Des protoplastes ont ensuite été isolés par digestion enzymatique des parois cellulaires (voir Matériel et Méthodes). Entre 30 et 40 % de l'uranium présent dans les cellules totales est retrouvé spécifiquement dans les protoplastes ce qui signifie qu'une grande majorité de l'uranium insoluble (60 – 70%) est fixée aux parois (Figure III-1 A). Les protoplastes ont ensuite été lysés dans un milieu Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; DTT 1 mM et la suspension obtenue ultracentrifugée à 105 000 g pendant 20 minutes à 4°C. L'uranium présent dans la fraction soluble (surnageant) a été dosée par ICP-MS dans le surnageant. Dans les protoplastes, la proportion d'uranium soluble représente moins de 5% ($3,8 \pm 2,4$ % de 71 ± 20 $\mu\text{g/g}$ de masse fraîche). La fraction d'uranium insoluble des protoplastes est composée de l'uranium associé soit aux membranes, soit à de gros complexes, soit précipité dans la cellule (Figure III-1 A).

Après dessalage sur une colonne PD10 (G25), la proportion d'uranium présent dans la fraction protéique soluble est passée de 100 ± 50 ng d'uranium par mg de protéine à 25 ± 12 ng

d'uranium par mg de protéine. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la part d'uranium associée à des protéines intracellulaires solubles est très faible. Nous avons donc par la suite cherché à optimiser ces conditions. Le phosphate étant connu pour limiter l'absorption de l'uranium (Misson et al., 2009; Laurette et al., 2012b), nous l'avons éliminé en totalité du milieu, nommé « No Phosphate » (NP). De plus, les quantités de cellules utilisées ont été ajustées à 2 à 3 g de masse fraîche pour 100 ml de milieu NP augmentant ainsi l'exposition à l'uranium par cellule. Dans ces conditions, en plus d'obtenir environ deux fois plus d'uranium par gramme de masse fraîche ($71,5 \pm 20 \mu\text{g/g}$ de masse fraîche en LP contre $156,8 \pm 14,1 \mu\text{g/g}$ de masse fraîche en NP), près de 20 % de l'uranium biosorbé aux cellules ($17 \pm 2,9 \%$) est soluble (Figure III-1 B) contre moins de 2 % en conditions LP. Afin d'éliminer l'uranium non lié aux protéines, l'extrait protéique a été dessalé par 3 cycles de concentration/dilution dans le

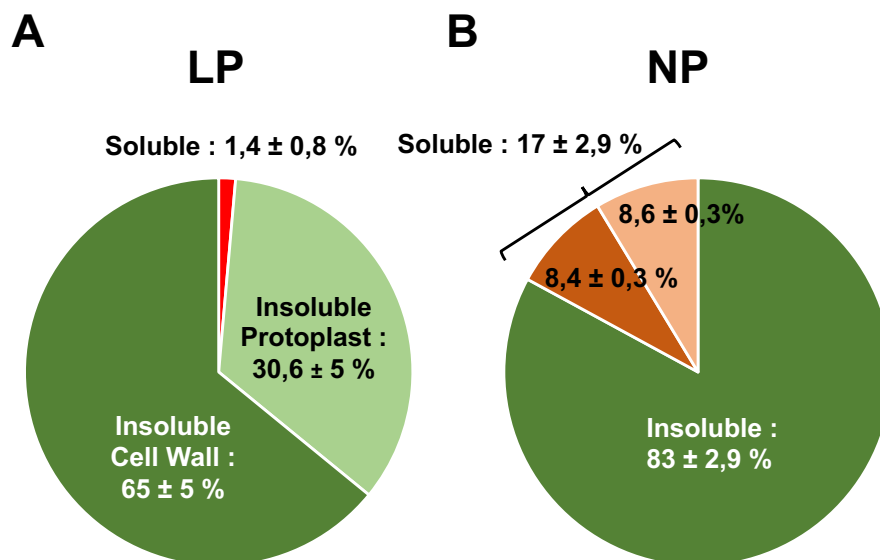


Figure III-1 : Répartition de l'uranium dans des cellules d'*Arabidopsis thaliana* exposées 24h à 50 μM de nitrate d'uranyle, dans un milieu MS contenant 30 μM de phosphate (LP) (A) ou pas de phosphate (NP) (B).

Les cellules ont été cultivées dans du milieu MS jusqu'en milieu de phase exponentielle puis lavées avant resuspension à une dilution de 10g/100ml (A) ou 3g/100 ml dans le milieu LP ou NP, respectivement. (Pour NP n = 5 ; pour LP n = 3) Après exposition au nitrate d'uranyle, les cellules ont ensuite été lavées au carbonate de sodium 10 mM puis à l'eau avant d'être analysées. (A) La proportion d'uranium soluble (rouge) a été déterminée par ICP-MS en dosant l'uranium présent dans le surnageant après lyse des cellules et centrifugation (voir Matériel et Méthodes). La partie insoluble contenue dans les protoplastes (vert clair) a été déterminée après digestion enzymatique de la paroi des cellules végétales puis lyse des protoplastes (voir Matériel et Méthodes). Par différence, la quantité d'uranium présente au niveau de la paroi a été déterminée (vert foncé). (B) La proportion d'uranium soluble a été déterminée comme décrit en (A). Cette partie est composée de l'uranium fixé à des protéines (orange foncé) et celui dit « libre » ou fixé à de petites molécules (métabolites ou peptides) (orange clair). Ces deux sous-fractions ont été obtenues par ultrafiltration du surnageant sur filtre 3K (voir Matériels et Méthodes). En vert, est représentée la proportion d'uranium à l'état insoluble, déterminée par différence entre l'uranium total et celui trouvé à l'état soluble.

tampon de lyse sur unité de filtration 3K. Après dessalage, près de la moitié de l'uranium soluble est retrouvé dans la fraction protéique (dans le rétentat) à un ratio de 169 ± 13 ng d'uranium par mg de protéine (contre 25 ± 12 ng d'uranium par mg de protéine en conditions LP) (Sarhou et al., 2020) soit environ 7 fois plus. Les conditions NP sont donc bien plus favorables à l'incorporation dans la cellule et, en conséquence, à la fixation de l'uranium aux protéines intracellulaires. Il faut noter que des expériences de viabilité ont montré que dans ces conditions les cellules traitées à l'uranium croissent de la même manière que des cellules cultivées en absence d'uranium (Annexe 2). Des cellules cultivées dans ces conditions ont donc été utilisées pour la suite des expériences et l'identification d'UBP.

ii. Deux stratégies de fractionnement chromatographique distinctes

A partir d'extrait protéique issu de cellules traitées, nous avons développé une approche biochimique basée sur le fractionnement successif de l'extrait protéique avec différentes colonnes chromatographiques. L'uranium a été suivi en sortie de chaque colonne dans les différentes fractions récoltées par dosage ICP-MS. Les séparations successives conduisent à l'enrichissement de l'extrait en UBPs avec pour but final de les isoler et les identifier par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). De cette façon, deux stratégies distinctes ont été développées (Figure III-2). Au cours d'expériences préliminaires, nous avons mis en évidence une co-élution de l'uranium avec certaines fractions protéiques après chromatographie sur une colonne échangeuse d'anions (AEC) de type Q-Sepharose et élution à l'aide d'un gradient discontinu de NaCl ce qui suggérait que l'uranium incorporé dans des cellules d'*A. thaliana* en culture était capable de se lier à différentes protéines (Sarhou et al., 2020). Afin d'identifier les populations d'UBPs présentes, nous avons souhaité améliorer la résolution du fractionnement. Pour cela, nous avons utilisé un gradient salin continu lors de la première étape de séparation sur colonne de Q-Sepharose de la stratégie I. Cette stratégie avait comme priorité la meilleure préservation possible des liaisons ioniques, notamment les liaisons protéine-uranium permettant une étude la plus exhaustive envisageable des UBPs. La première étape de Q-Sepharose a été suivie d'une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique (SEC) (ou de gel filtration) de type Superdex 200, qui respecte également au mieux les complexes non covalents et labiles protéines – métaux. A la suite de ces deux étapes de séparation protéique, l'identification des UBPs candidates a été réalisée à l'aide d'une approche basée sur l'analyse différentielle des fractions protéiques impliquant leur séparation sur gels 2D. La seconde stratégie (Stratégie II), quant à elle, a priorisé l'isolement des UBPs ayant les plus fortes affinités pour l'uranium par l'élimination de celles ayant les plus faibles affinités et les interactions

aspécifiques. La stratégie II est composée de trois étapes chromatographiques sur trois types de colonnes, une colonne d'hydroxyapatite, colonne de pseudo-affinité utilisant un support de phosphate de calcium, peu résolutive mais préservant l'uranium lié de manière la plus affine aux protéines au détriment des autres, suivie d'une colonne de gel filtration Superdex 200 puis de la colonne échangeuse d'anion à haute résolution Q-Sepharose.

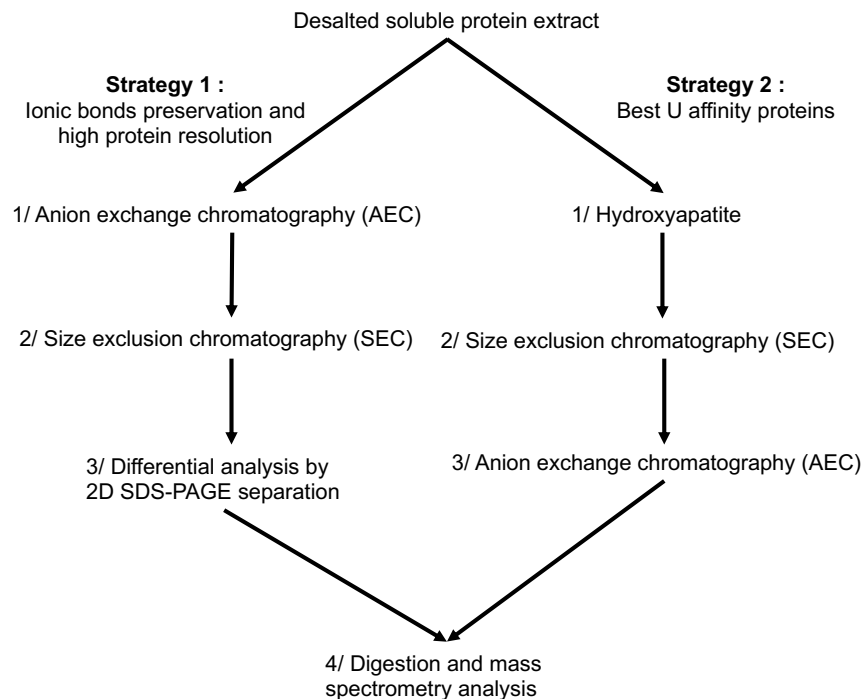


Figure III-2 : Stratégies utilisées pour l'identification de protéines fixatrices d'uranium *in cellulo*.

Deux stratégies par chromatographies successives distinctes ont été utilisées pour l'identification de protéines fixatrices d'uranium à partir d'extraits protéiques solubles issus de cultures cellulaires d'*A. thaliana* traitées 24 h à 50 μM de nitrate d'uranyle dans un milieu MS sans phosphate (NP). L'uranium est quantifié au cours de chaque étape par ICP-MS. La première stratégie se base sur une préservation optimale des liaisons ioniques pour une étude exhaustive des protéines fixatrices d'uranium. Elle utilise une colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose haute résolution en première étape suivie d'une colonne de gel filtration de type Superdex 200. L'étape finale utilise une approche basée sur l'analyse différentielle sur gels 2D SDS-PAGE de fractions en milieu et haut de pic. *A contrario*, la seconde approche vise l'identification des protéines ayant la meilleure affinité pour l'uranium en éliminant les protéines les moins affines à l'aide d'une première étape très sélective basée sur une colonne d'hydroxyapatite puis d'une Superdex 200 suivie d'une Q-Sepharose permettant une étape finale très résolutive. Les protéines candidates ont ensuite été identifiées par LC-MS/MS.

iii. Stratégie I : Vers une étude exhaustive des protéines fixant l'uranium *in vivo*

Pour la stratégie I, au total 3 g de protéines solubles ont été extraits à partir de 200 g de cellules (voir Matériel et Méthodes). L'uranium libre a été éliminé de l'extrait protéique par succession de 3 concentrations/dilutions sur unité de filtration 3 K. Les protéines présentes dans l'extrait ont ensuite été séparées par colonne chromatographique échangeuse d'anions (colonne de Q-Sepharose, QS). Afin de repérer les UBP, l'uranium présent dans les fractions en sortie de colonne a été dosé par ICP-MS, 5 pics d'uranium distincts, nommés pic 1 à 5, ont été identifiés (Figure III-3 A). Ces pics ont été élués de manière très reproductible puisqu'ils ont été observés à chaque itération de la colonne mis à part le pic 5 dont l'intensité était variable d'une

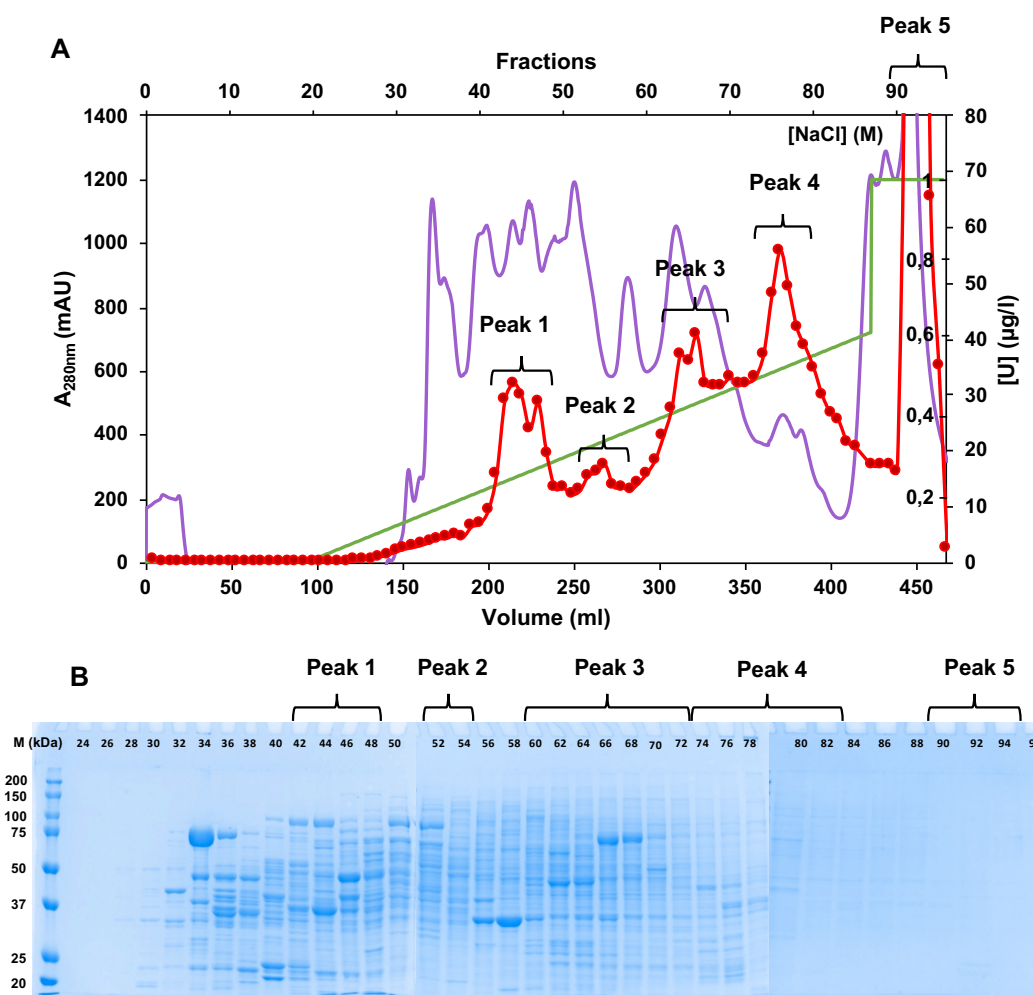


Figure III-3 : Fractionnement des Uranium Binding Proteins (UBP).

Trois grammes de protéines issus de 200 g de cellules d'*A. thaliana* ont été séparés sur colonne de Q-Sepharose par aliquots de 300-400 mg de protéines. L'uranium a été quantifié dans chaque fraction par ICP-MS. Le profil uranium (en rouge), le profil protéique (en violet) ainsi que le gradient salin linéaire de 0 à 0,6 M NaCl (en vert) sont indiqués dans la figure A. L'éluion a mis en évidence 5 pics d'uranium distincts nommés pic 1, 2, 3, 4 et 5. Le graphe est représentatif de la même expérience réalisée 9 fois de manière indépendante. Les gels SDS-PAGE des fractions (10 µl) en sortie de colonne colorés au Bleu de Coomassie sont montrés dans la figure B.

expérience à l'autre. Ce résultat a montré qu'il existe différentes populations protéiques spécifiques affines pour l'uranium. Dans ces 5 pics, la composition protéique était très différente et encore très complexe (Figure III-3 B) ce qui laissait supposer que chacun de ces pics contenait des UBP différentes. Les fractions composant les 5 pics ont été regroupées indépendamment les uns des autres pour une seconde étape de séparation sur colonne de gel filtration Superdex 200. La composition du pic 5 est différente des 4 autres puisqu'en plus de contenir peu de protéines (Figure III-3 B), la majorité de l'uranium présent dans ce pic est sous forme libre ou liée à de petite molécules (< 3 kDa). En effet, lors de la concentration du pic 5 sur unité de filtration 3 K, 80 % de l'uranium se retrouve dans le filtrat alors que dans les pics 1 à 4, cette proportion ne représente qu'entre 5 et 10 %. Prenant en compte cette observation, le pic 5 n'a pas été analysé dans la suite de cette étude. Néanmoins, il sera intéressant dans le futur de savoir, si l'uranium est chélaté à de petites molécules dans ce pic, la nature de ces molécules (acides organiques, phosphate, ...). Les fractions protéiques composant les pics 1, 2, 3 et 4 ont été regroupées pour être séparées sur colonne de gel filtration Superdex 200. Lors de cette étape, une multiplication des pics d'uranium est observée. En effet, les pics 1 et 2 se décomposent en 3 et 4 pics d'uranium distincts après chromatographie sur Superdex 200 (Figure III-4 A et B), le 3 et 4 ne générant qu'un seul pic (Figure III-4 C et D). Les pics d'uranium issus de Superdex 200 (SX) ont été nommés pic I, II, III ou IV selon la nomenclature suivante : QS (Pic 1, 2, 3 ou 4) – SX (Pic I, II, III ou IV selon les cas). Cette observation signifie qu'un pic d'uranium peut contenir plusieurs UBP. Étant donné la grande complexité des profils polypeptidiques sur SDS-PAGE combiné aux faibles quantités d'uranium et de protéines encore présentes, utiliser une autre colonne chromatographique n'était pas envisageable par risque de décrocher la totalité de l'uranium restant, rendant le suivi de protéines fixatrices d'uranium extrêmement complexe. Afin d'identifier les UBP présentes dans les fractions isolées, une stratégie originale basée sur l'analyse comparative de fractions séparées sur gels 2D combinant séparation par focalisation isoélectrique en première dimension et séparation en conditions dénaturantes en seconde dimension (SDS-PAGE) a été développée (Collaboration avec Thierry Rabilloud, LCBM/IRIG/CEA Grenoble). Cette approche consiste à séparer sur gel 2D les fractions protéiques des deux flancs ainsi que du sommet d'un pic d'uranium en sortie de colonne chromatographique. En quantifiant l'intensité relative des spots protéiques sur ces trois fractions, il est possible d'identifier à l'aide du logiciel spécialisé delta2D les spots protéiques dont l'abondance suit le profil du pic d'uranium, c'est-à-dire étant plus abondantes en haut de pic que dans chacun des flancs gauche et droit du pic d'uranium. Les UBP candidates sont

ensuite identifiées par LC-MS/MS. De cette manière, les deux pics QS (Pic 1) – SX (Pic I) et QS (Pic 1) – SX (Pic III) ont été analysés.

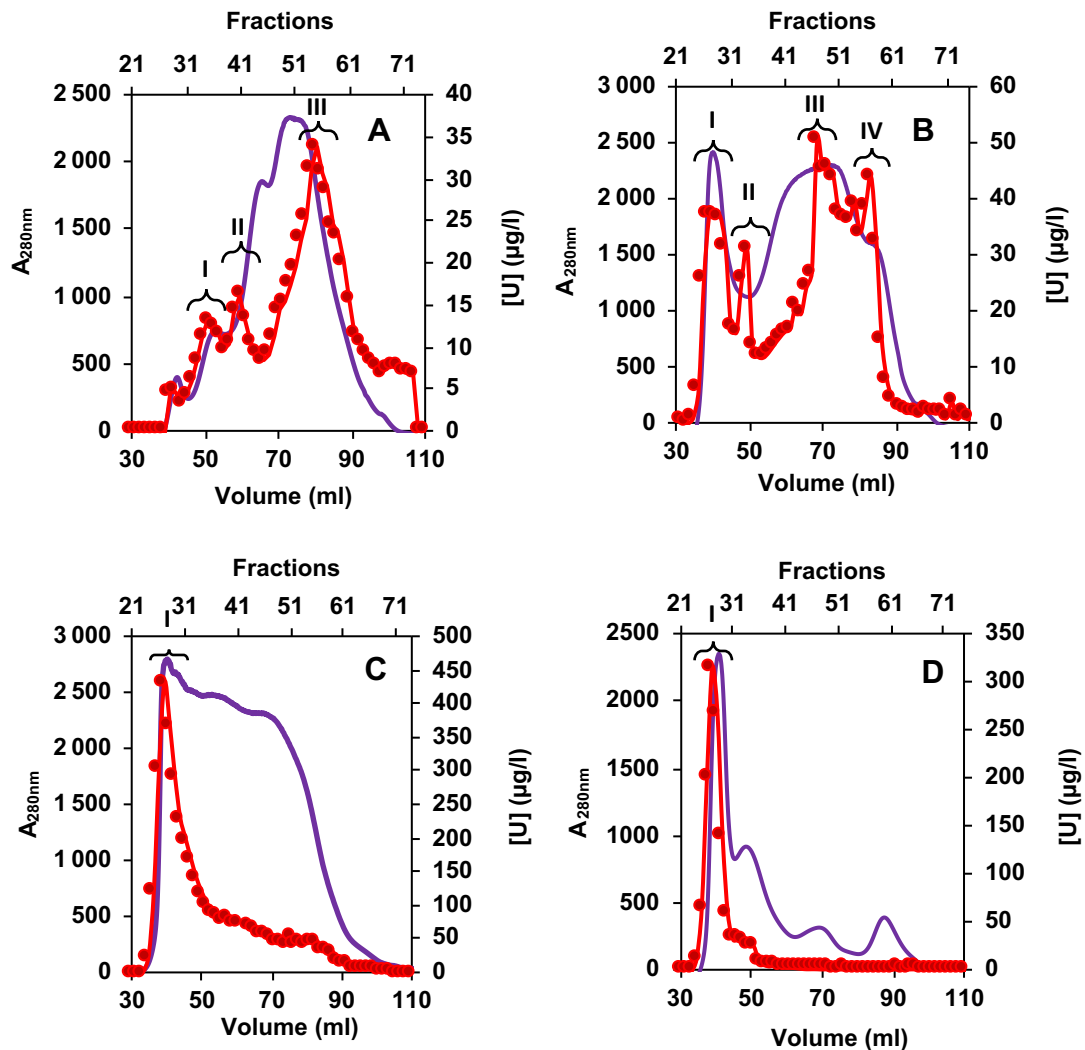


Figure III-4 : Fractionnement des UBP. Deuxième étape de la stratégie I.

Les protéines issues des pics d'uranium 1, 2, 3 et 4 obtenus après une première étape de Q-Sepharose (Figure III-3) ont ensuite été séparées sur une colonne de Superdex 200 (pic 1 (A), 2 (B), 3 (C) et 4 (D)). Les profils uranium (en rouge) et protéique (en violet) sont représentés.

Chacun de ces pics a été analysé sur deux expériences indépendantes. Les spots candidats ont été sélectionnés selon deux critères. Un premier critère dit « faible » qui est satisfait lorsque l'intensité du spot en haut de pic est supérieure à celle des deux milieux de pic sur les deux expériences et un second critère dit « fort » plus drastique qui est satisfait lorsque l'intensité la plus faible des hauts de pic est plus élevée que l'intensité la plus forte des milieux de pic. De cette manière, un spot répondant au critère fort répond forcément au critère faible mais la réciproque n'est pas vraie.

Dans le cas du pic QS (Pic 1) – SX (Pic I), les fractions 32 et 37, flanc gauche et droit et 35 pour le haut de pic (Figure III-5 A) ont été séparées sur gel 2D SDS-PAGE. Seize spots candidats ont été identifiés (Figure III-5 B), 9 spots répondant au critère fort et 7 uniquement au critère faible (Figure III-5 C). La composition en protéines de ces spots a été analysée par spectrométrie de masse. Un total de 16 protéines candidates est obtenu qui sont listées dans le tableau III-1 A avec quelques caractéristiques physico-chimiques telles que les masses moléculaires, le point isoélectrique, la proportion en acides aminés connus pour interagir avec l'uranyle (Glu, Asp, Tyr, His), les résidus phosphorylés (pSer, pThr, pTyr) connus pour renforcer la liaison de l'uranium aux glutamates et aspartates (Pardoux et al., 2012; Lebrun et al., 2014; Sauge-Merle et al., 2017; Starck et al., 2017; Laporte et al., 2019; Garai and Delangle, 2020) ainsi que le lien connu de ces protéines avec les métaux. Ainsi, trois de ces protéines présentent des résidus phosphorylés et 10 sont connues pour lier des métaux ou sont régulées par un stress métallique. L'une d'entre elles, la phosphoenolate carboxykinase est retrouvée dans 3 spots protéiques dont un avec un taux d'enrichissement supérieur à 3 (Spot 4). Cette protéine est multiphosphorylée (5 sites connus) et est impliquée dans la réponse à un stress cadmium (Sarry et al., 2006).

De la même façon, les fractions 53 et 58 (milieu de pic) et 55 (haut de pic) du pic QS (Pic 1) – SX (Pic III) ont été analysées (Figure III-6 A). L'analyse des intensités des spots protéiques met en évidence 30 spots candidats (Figure III-6 B), 22 spots répondant au critère fort et 8 uniquement au critère faible (Figure III-6 C). Un tableau de 29 protéines candidates a été obtenu (Tableau III-1 B). Ces protéines correspondent à des protéines de petites tailles (< 40 kDa) puisqu'elles sont éluées tard sur la colonne de Superdex 200. Dans ce tableau, 6 spots présentent une variation d'abondance (« fold change ») moyenne avec le haut de pic proche de 2 (spots 6, 7, 8, 11, 12 et 13). Parmi eux, le spot 8 correspond à l'aminométhyltransferase connue pour répondre à un stress cadmium, un autre (spot 11) correspond à l'isocitrate déshydrogénase nécessitant un ion Mg^{2+} ou Mn^{2+} comme co-facteur pour son activité. Une autre protéine candidate, la lactoylglutathione lyase aussi nommée glyoxylase, se démarque des autres protéines, puisque c'est une protéine fixatrice de zinc avec un site de liaison impliquant 2 glutamates et 1 histidine, acides aminés ayant de l'affinité pour l'uranium. Elle est aussi impliquée dans la détoxification du méthylglyoxal, composé produit par la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant.

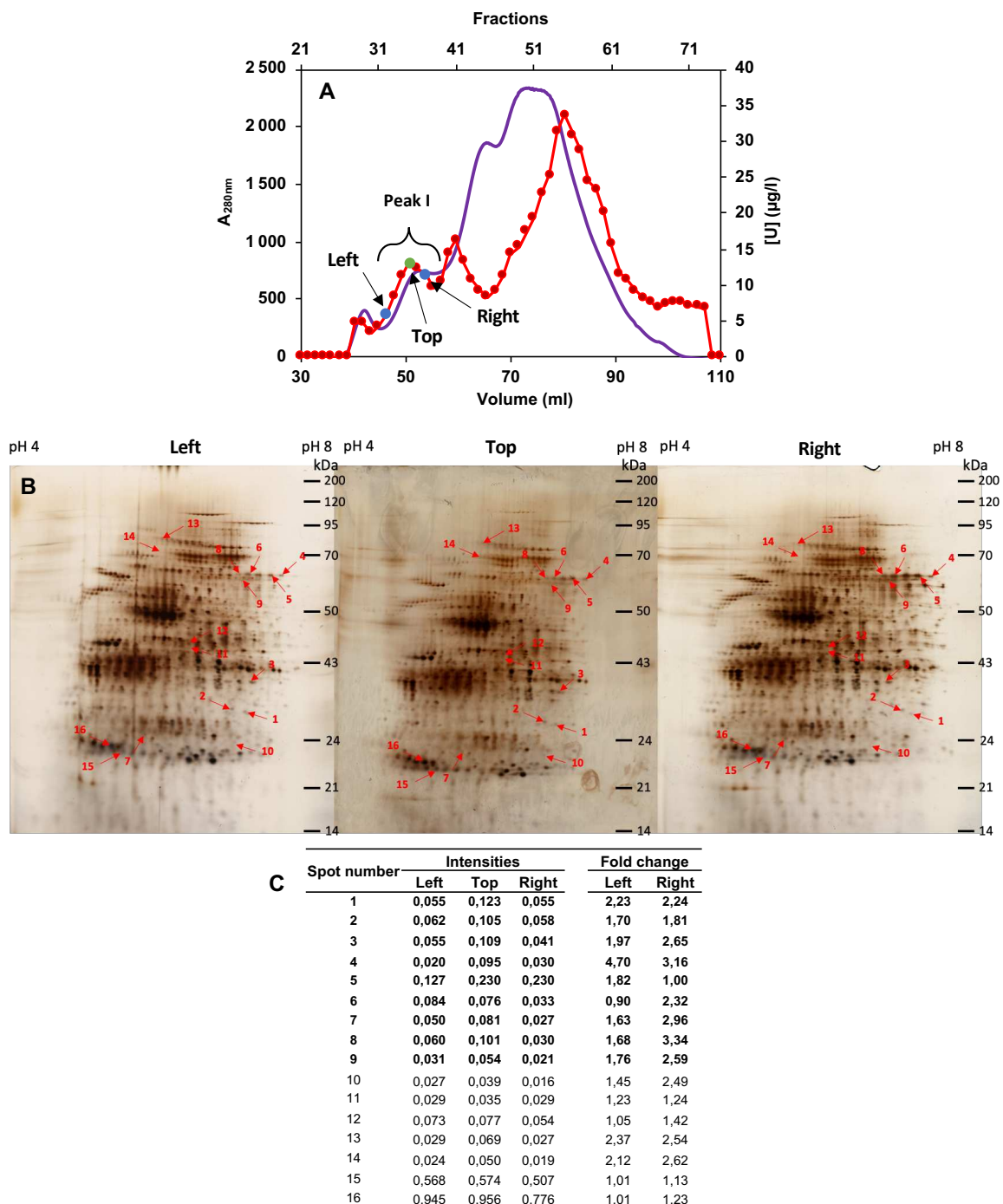


Figure III-5 : Chromatographie sur colonne Superdex 200 des protéines du pic 1 issues de la chromatographie sur colonne Q-Sepharose (A), séparation des fractions sur gel 2D (B) et intensité relative des spots candidats identifiés (C).

Le pic I a été analysé sur des gel 2D colorés au nitrate d'argent avec les fractions de sommet de pic (Top) et de milieu gauche (Left) et droit (Right) du pic. Les flèches montrent les spots protéiques candidats dont l'intensité relative est corrélée avec le pic uranium et qui ont été analysés et identifiés par spectrométrie de masse. Les intensités relatives des spots protéiques ont été analysées avec le logiciel delta2D et présentées dans le panneau C avec les intensités de chacun des spots candidats présents soit avec le critère fort (en gras) soit uniquement le critère faible (en noir) dans les fractions du milieu gauche (Left), du haut (Top) et du milieu droit (Right) du pic ainsi que la variation entre le haut du pic et le milieu gauche (Fold change - left) et celle entre le haut du pic et le milieu droit (Fold change - right). Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

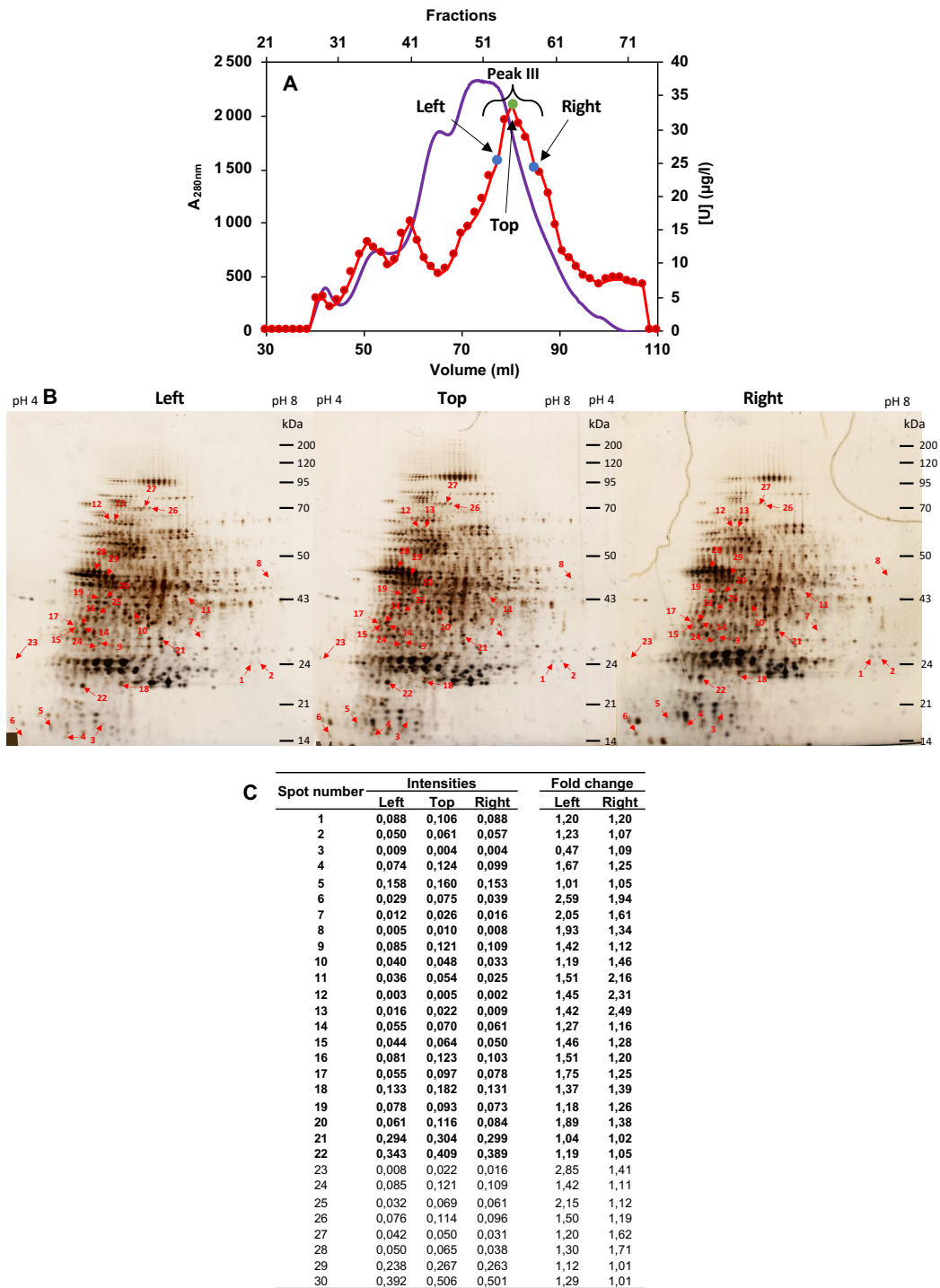


Figure III-6 : Chromatographie sur colonne Superdex 200 des protéines du pic 1 issues de la chromatographie sur colonne Q-Sepharose (A), séparation des fractions sur gel 2D (B) et intensité relative des spots candidats identifiés (C).

Le pic III a été analysé sur gel 2D colorés au nitrate d'argent avec les fractions de sommet de pic (Top) et de milieu gauche (Left) et droit (Right) du pic. Les flèches montrent les spots protéiques candidats dont l'intensité relative est corrélée avec le pic uranium et qui ont été analysés et identifiés par spectrométrie de masse. Les intensités relatives des spots protéiques ont été analysées avec le logiciel delta2D et présentées dans le panneau C avec les intensités de chacun des spots candidats identifiés soit avec le critère fort (en gras) soit uniquement le critère faible (en noir) dans les fractions du milieu gauche (Left), du haut (Top) et du milieu droit (Right) du pic ainsi que la variation entre le haut du pic et le milieu gauche (Fold change - left) et celle entre le haut du pic et le milieu droit (Fold change - right). Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

A	Spot number	Uniprot	Protein name	MW (Da)	Calc. pI	D (%)	E (%)	Y (%)	H (%)	D+E+Y+H (%)	Phospho residue	Relation with metals
	1	Q9SZE1	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1	35 373,2	8,58	5,7	3	1,8	1,5	12	-	-
	2	Q9SCL7	Acetylglutamate kinase	36 596,2	9,04	4,9	4	2	1,7	12,6	-	-
	3	Q8LDN8	UDP-xylose 4-epimerase 3	38 910,7	6,27	5,4	6,3	3,4	2,3	17,4	-	-
	4, 5, 6	Q9T074	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	73 406,8	6,61	4,9	6,3	3,3	3,1	17,6	pS(62, 80, 132), pT(65, 66)	Response to Cd ²⁺
	7	P48491	Triosephosphate isomerase	27 168,2	5,39	4,3	7,5	1,6	0,8	14,2	pS(106, 139), pT131	Cu ²⁺ ion binding; response to Cd ²⁺ /Zn ²⁺
	8 and 9	O04630	Threonine-tRNA ligase	80 939,1	6,53	5,9	7,3	4,1	2,4	19,7	-	Zn ²⁺ binding
	10	Q9CA57	Glutathione S-transferase U10	26 804,8	6,34	4,3	9,9	3,9	2,6	20,7	-	Detoxification
	11	Q9ZT91	Elongation factor Tu	49 409,8	6,25	5,7	6,8	2,4	2,2	17,1	-	Co ²⁺ and Zn ²⁺ ion binding
	12	Q9XF59	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	51 963,9	6,58	5,0	6,3	1,9	2,1	15,3	-	Mn ²⁺ ion binding
	13	P36428	Alanine tRNA ligase	110 489,3	6,05	6,9	7,0	2,2	1,9	18,0	pS52	Zn ²⁺ ion binding; response to Cd ²⁺ ion
	14	P49040	Sucrose synthase 1	92 997,6	5,83	5,4	9,2	4,1	2,8	21,5	-	Response to Cd ²⁺
	15	Q39101	Ferritin-1	28 177,9	5,73	3,9	8,6	3,1	3,5	19,1	-	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ ion binding; response to iron ion
	16	Q9LYN2	Ferritin-3	28 836,6	5,54	3,9	9,7	3,5	3,1	20,2	-	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ ion binding; response to iron ion

B	Spot number	Uniprot	Protein name	MW (Da)	Calc. pI	D (%)	E (%)	Y (%)	H (%)	D+E+Y+H (%)	Phosphoresidue	Relation with metals
	1 and 2	P52422	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	32 170	8,93	3,8	7,5	3,1	2,4	16,8	-	-
	3	F4KEV7	Bifunctional bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	20 400	6,20	8,3	5,6	3,3	2,8	20	-	Histidine triad motif
	4	Q949U7	Peroxioredoxin-2E	24 684	9,12	6	3,4	0,9	0,4	10,7	pS82	-
	5	P36210	50S ribosomal protein L12-1	20 075	5,51	2,6	10,5	1	1,6	15,7	-	-
	6	O82355	Desiccation-related protein	17 846	4,53	10,2	3,6	3	0,6	17,4	-	-
	7	Q9SZE1	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1	35 373	8,58	5,7	3	1,8	1,5	12	-	-
	8	O65396	Aminomethyltransferase	44 445	8,11	6,1	5,4	2,7	3,4	17,6	-	Response to cadmium ion
	9	Q9C8L4	Persulfide dioxygenase ETHE1 homolog	32 332	6,50	6,8	4,1	2,7	3,1	16,7	-	1 Fe ²⁺ /subunit
	10	O22263	Protein disulfide-isomerase like 2-1	39 497	5,80	6,6	8	3,9	1,1	19,6	-	Response to Cd ²⁺
	11	Q8LG77	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 6	40 577	6,71	5,3	4,8	3,2	2,1	15,4	-	1 Mg or Mn ion per subunit
	12 and 13	Q9SQT8	Shikimate dehydrogenase	65 798	6,41	6,3	5,5	3,2	1,7	16,7	-	-
	14 and 15	P0DKC3	Phosphoglycolate phosphatase 1A	39 762	6,90	5,8	5,2	3	1,1	15,1	pS356	-
	16 and 17	Q24JL3	Thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase 2	37 413	5,73	5,8	5,3	2,9	2,6	16,6	-	-
	18	O23193	CBS domain-containing protein CBSX1	25 769	8,59	5,9	5,1	2,1	0,8	13,9	-	-
	19 and 20	Q9SMI9	Probable carboxylesterase 13	36 099	5,36	7	6,4	3	3,6	20	-	-
	21	Q8LAS8	S-formylglutathione hydrolase	31 657	5,91	5,3	5,3	6	3,5	20,1	-	Response to cadmium ion
	22	Q8H0V3	Lactoylglutathione lyase	20 849	5,14	7	8,1	3,2	2,2	20,5	-	1 Zn/subunit (2 GLU, 1 HIS, 1 GLN)
	23	Q8VZ10	Protein suppressor of quenching 1	114 402	5,43	7,0	5,4	2,7	1,0	16,1	-	Metal ion binding
	24	O80934	Uncharacterized protein	34 880	8,37	5,5	5,8	1,5	0,6	13,4	pT309	Cu ²⁺ ion binding
	25	P47998	Cysteine synthase 1	33 805	5,90	3,1	7,8	2,2	0,6	13,7	-	-
	26 and 27	F4IW47	Transketolase-2	79 922	6,12	4,5	6,7	3,0	2,8	17	-	Metal ion binding
	28	Q93WJ8	Monodehydroascorbate reductase 2	47 480	5,25	4,1	9,0	5,3	0,7	19,1	pS417	-
	29	Q9FPF0	Protein DJ-1 homolog A	41 857	5,31	4,3	8,4	1,0	1,3	15	-	Response to Cd ²⁺ ion

Tableau III-1 : Liste des protéines candidates identifiées par spectrométrie de masse dans le pic I (A) et le pic III (B) en sortie de Superdex 200.

Les protéines candidates ont été identifiées par LC-MS/MS après séparation sur des gels 2D en conditions dénaturantes. Les protéines ont été identifiées dans des spots candidats selon le critère « fort » (en gras) ou le critère « faible » (en noir). Les masses moléculaires (MW), le pH isoélectrique calculé (Calc. pI) (ProtParam), les compositions respectives en acides aminés (D aspartate, E glutamate, Y tyrosine et H histidine), les phosphorésidus (PhosphoBase) ainsi que les informations sur ces protéines en lien avec les métaux sont indiqués (source : P3DB et Uniprot).

iv. Stratégie II : Vers une identification des protéines les plus affines pour l'uranium *in cellulo*

Dans la stratégie II, 250 mg de protéines issues de 13 g de cellules traitées à l'uranium ont été utilisées. Elles ont été extraites dans un milieu Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 1 mM puis le milieu a été échangé par une succession de 3 concentrations/dilutions avec du tampon KH₂PO₄/K₂HPO₄ sur une unité de filtration 3 K afin d'éliminer l'uranium libre et de mettre les protéines dans les meilleures conditions avant qu'elles ne soient chromatographiées sur une colonne Bio-Gel HTP Hydroxyapatite. Les profils protéiques et d'uranium sont présentés dans la figure III-7. Un pic d'uranium ultra-majoritaire est observé avant le début du gradient de phosphate. Cette fraction renferme toutes les protéines non retenues par la colonne, systématique dans le cas de colonne d'affinité telle que l'hydroxyapatite, ainsi que l'uranium

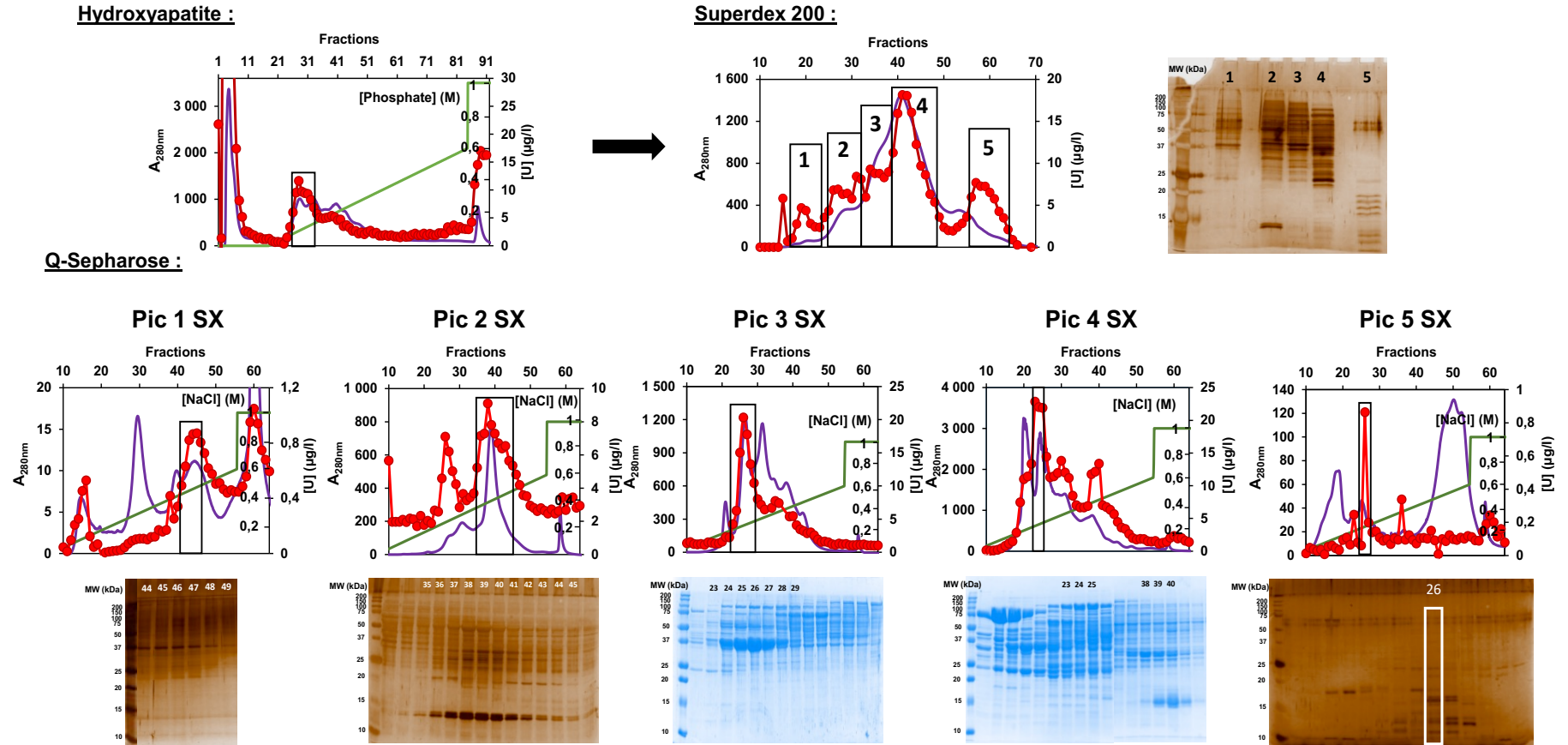


Figure III-7 : Fractionnement des Uranium Binding Proteins selon la stratégie II.

Les protéines de l'extrait soluble issu de cellules d'*A. thaliana* traitées pendant 24 h à 50 µM de nitrate d'uranyle ont été séparées selon trois étapes chromatographiques : une colonne d'hydroxyapatite, de gel filtration (Superdex 200) et de Q-Sepharose. Dans chaque étape, les protéines (en violet) et l'uranium sont quantifiés (en rouge). A la suite de la première étape d'hydroxyapatite, un pic d'uranium a été identifié pour être séparé sur colonne de superdex 200. Le profil uranium à l'issue de cette colonne a été séparé en 5 pics distincts. Chacun de ces 5 pics (Pic 1 à 5 SX) a été déposé sur Q-Sepharose et les protéines ont été éluées avec un gradient salin NaCl de 0 à 1 M. Les gels SDS-PAGE sont indiqués à côté de chaque profil.

faiblement lié aux protéines ou de manière aspécifique qui est précipité par le phosphate présent dans le tampon d'équilibrage de la colonne. Un autre pic d'uranium est élué entre 100 et 200 mM de phosphate qui contient les UBP en complexe stable avec de l'uranium, que nous souhaitons identifier. En effet, contrairement à ce qui est observé pour les protéines ayant une faible affinité pour l'uranium ou liant l'uranium de manière aspécifique, dans le cas de protéines avec une forte affinité pour l'uranium, l'interaction est préservée de la précipitation par le phosphate du milieu (Yang et al., 2017). Les fractions de ce pic ont été regroupées et séparées dans une seconde étape chromatographique sur colonne Superdex 200. Le profil uranium obtenu est composé de 5 pics distincts (Figure III-7) contenant respectivement 0,2 ; 3,5 ; 9,3 ; 18 et 0,3 mg de protéines (Tableau III-2). Le pic 5, qui renferme essentiellement les protéines de faible masse moléculaire (< 20 kDa), contient une faible diversité protéique avec seulement 8 bandes protéiques visibles en coloration au nitrate d'argent du gel SDS-PAGE (Figure III-7). Les protéines présentes dans ces différents pics ont ensuite été séparés lors d'une dernière étape chromatographique sur colonne de Q-Sepharose, très résolutive permettant de localiser le plus

	Protéines (mg)	U (ng)	U (ng/mg protein)
Extrait soluble	250	18092	72,37
Biogel-HTP Hydroxyapatite	60	1027	17,11
Superdex 200			
Pic 1	0,182	17,3	92,2
Pic 2	3,312	147,5	44,5
Pic 3	9,252	131	14,2
Pic 4	17,8	98	5,5
Pic 5	0,278	2,6	9,5
Q-Sepharose			
Pic 5 SX – Fr 26	0,056	0,346	6,18

Tableau III-2 : Bilan du fractionnement des Uranium Binding Proteins (UBP) selon la stratégie II.

Les mesures de protéines et uranium ont été réalisées extemporanément après dessalage des pools de fractions par concentration/dilution successives sur unités de filtration 3 K, avant l'étape. Les quantités en protéines et en uranium durant les différentes étapes de la stratégie 2 sont indiquées. Les mesures ont été réalisées juste avant dépôt sur chacune des trois colonnes (hydroxyapatite, superdex 200 et Q-Sepharose) après regroupement, concentration et changement de tampon des fractions correspondantes.

précisément les fractions contenant les UBP. Le bilan en protéines et uranium est représenté dans le tableau III-2. Le résultat le plus notable concerne le fractionnement du pic 5 de la colonne Superdex 200. En effet, il apparaît que la majorité de l'uranium issu de ce pic est contenue dans la fraction 26 en sortie de Q-Sepharose (Figure III-7). Cette fraction ne renferme que 5 bandes détectables après séparation par SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent. Après analyse par spectrométrie de masse de cette fraction, une liste de 18 protéines candidates (Tableau III-3) a été retenue après un tri des tailles protéiques (< 20 kDa) et classement selon leur abondance relative (« Specific Spectral count »). Les « Glycin-Rich Protein 7 et 8 » (GRP7 et GRP8) se retrouvent en tête de liste.

Accession	Protein name	MW (Da)	SSC	D (%)	E (%)	Y (%)	H (%)	D + E + Y + H (%)	Phosphoresidues	Relation with metals
Q03251	Glycin-rich protein 8	16 579	23	5,3	6,5	5,3	0,0	17,1	pS(84, 103, 110, 161), pY(154, 162)	Response to Zn ²⁺
Q03250	Glycin-rich protein 7	16 890	17	5,7	5,1	5,7	0,6	17,1	pS(105, 112, 117, 132, 139, 140, 170), pY(111, 118, 131, 138)	Response to Cd ²⁺ /Zn ²⁺
Q8LFQ6	Glutaredoxin family protein	14 827	9	5,2	7,4	3,0	1,5	17,1	-	-
Q9FIX2	Avirulence induced gene 2 like protein	19 103	8	7,3	9,7	2,4	2,4	21,8	-	-
Q8LBS4	Thioredoxin superfamily protein	19 125	8	1,1	5,6	1,7	1,1	9,5	-	Iron ion binding
Q42403	Thioredoxin 3	13 109	7	5,1	11,9	0,0	2,5	19,5	-	-
Q39251	Actin depolymerizing factor 2	15 745	5	10,9	6,6	3,6	0,7	21,8	-	-
Q9ZNV8	Histidine-containing phosphotransmitter 2	17 476	5	8,3	5,1	2,6	0,6	16,6	pH82	-
O82355	Late embryogenesis abundant protein	17 846	4	10,2	3,6	3,0	0,6	17,4	-	-
Q8LFJ5	Trm112p-like protein	13 961	3	4,0	12,1	0,8	4,8	21,7	-	-
O48737	Thioredoxin M-type 1	19 665	3	5,0	3,9	2,2	0,0	11,1	-	-
Q9SEU7	Thioredoxin superfamily protein	19 500	3	4,0	6,9	2,9	1,7	15,5	-	-
P39207	Nucleoside diphosphate kinase family protein	16 499	3	4,7	7,4	2,0	2,0	16,1	-	Metal ion binding
A8MRW6	Calcium-dependent lipid-binding	17 187	3	9,0	6,5	3,2	1,9	20,6	-	-
O04922	Glutathione peroxidase 2	18 945	2	6,5	6,5	4,7	0,0	17,7	-	-
O49453	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	16 459	2	4,6	5,2	0,7	0,7	11,2	-	-
Q945Q1	Cystatin-1	11 256	2	6,9	9,9	2,0	5,0	23,8	-	-

Tableau III-3 : Protéines majeures identifiées par LC-MS/MS à l'issue de la stratégie II classées selon leurs abondances relative (Specific Spectral Count).

Les masses moléculaires (MW), leur abondance relative (Specific Spectral Count (SSC)), les compositions respectives en acides aminés (D aspartate, E glutamate, Y tyrosine et H histidine), les phosphoresidus (PhosphoBase) ainsi que les informations sur ces protéines en lien avec les métaux sont indiqués (source : P3DB et Uniprot).

En plus d'être une protéine multiphosphorylée (11 résidus phosphorylés connus), GRP7 a également été identifiée par notre équipe dans une approche complémentaire visant l'identification de protéines fixatrices d'uranium *in vitro*, basée sur l'utilisation de colonne d'affinité IMAC sur laquelle de l'uranium a été fixé (Résultats non publiés). GRP7 est une « RNA binding protein » régulant l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques notamment la régulation du cycle circadien (Staiger, 2001) ainsi que la résistance à des stress abiotiques comme les stress métalliques (Cao et al., 2006; Kim et al., 2008; Kim et al., 2010). Aussi, nous avons choisi de produire et de purifier une forme recombinante de GRP7 afin d'analyser ses caractéristiques biochimiques vis-à-vis de l'uranium.

v. Production et purification de GRP7 recombinante

Dans un premier temps, GRP7 recombinante a été produite avec une étiquette 6His en N-terminal dans des bactéries *E. coli* Rosetta 2 (pour plus de détails, voir le Matériel et Méthodes). L'étiquette 6His permet de purifier la protéine facilement en une étape sur colonne de nickel-Sephrose. Le gel bilan de la purification est présenté dans la figure III-8. A partir de 2 litres de culture bactérienne nous avons obtenu entre 1 et 3 mg de protéine purifiée selon les expériences.

Après purification de la protéine 6His-GRP7, la première étape a consisté à vérifier la capacité de la protéine à fixer l'uranium. Pour cela, une approche de filtration moléculaire à l'aide de colonnes microspin contenant une résine de G-25 a été utilisée dans le but de séparer les complexes protéines/uranium de l'uranium libre qui est retardé sur la colonne. Après une incubation de 30 min de la protéine à la concentration de 20 μM en présence de nitrate d'uranyle (100 μM) (ratio protéine/uranium = 1/5), le mélange a été déposé au sommet de la colonne puis élué par centrifugation avec 150 μl de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Les protéines interagissant avec l'uranium sont éluées dans le tube collecteur, l'uranium « libre » restant dans la résine. De cette façon, un ratio moyen de $0,78 \pm 0,11$ mole d'uranium par mole de protéines a été déterminé sur 4 expériences indépendantes. Ce résultat démontre que la protéine 6His-GRP7 est capable de lier l'uranium de manière quasi-équimolaire.

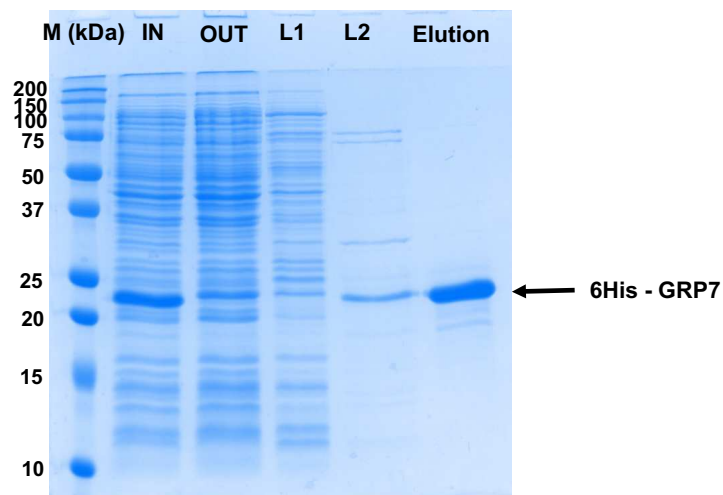


Figure III-8 : Gel bilan de la purification de 6His-GRP7.

Étapes de purification de la protéine 6His-GRP7 sur colonne de nickel. De gauche à droite, l'extract protéique bactérien avec l'expression de GRP7 induit avec 0,4 M d'IPTG (IN) pendant 16h, les protéines non retenues par la colonne (OUT), les protéines éliminées suite à un premier lavage avec un tampon tris-HCl 20 mM pH 8, imidazole 50 mM, NaCl 0,5 M (L1), suite à un deuxième lavage avec un tampon tris-HCl 20 mM pH 8, imidazole 50 mM, NaCl 0,5 M (L2) et enfin l'élué de 6His-GRP7 à l'aide d'un tampon d'élué contenant 250 mM d'imidazole.

vi. Analyse structurale de la protéine 6His-GRP7

Afin de caractériser l'interaction de la protéine 6His-GRP7 avec l'uranium, des approches structurales ont été utilisées en collaboration avec Bernhard Brutscher, Adrien Favier et Alicia Vallet du groupe de résonance magnétique nucléaire (RMN) moléculaire de l'IBS à Grenoble. Grâce à l'utilisation du programme ProtParam, il s'est avéré que la protéine 6His-GRP7 possède un indice d'instabilité élevé de 54,49 en raison de sa très forte teneur en résidus glycine (36,5 %) (une protéine dite stable a un indice d'instabilité inférieur à 40). Par conséquent, cette propriété semblait incompatible *a priori*, avec la formation de cristaux nécessaire à une approche cristallographique. Nous avons donc privilégié la RMN structurale pour en étudier sa structure. La protéine, dans sa forme monomérique, étant de petite taille, était adaptée à des analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN). Une première analyse en ^1H -RMN a montré que 6His-GRP7 possède une zone bien structurée (densité en protons relativement élevée) mais aussi des zones plus flexibles, d'où l'indice de stabilité médiocre (Figure III-9 A). En effet, sur le spectre ^1H , un signal est détecté entre 0 et 0,5 ppm caractérisant un domaine structuré. Toutefois, les signaux présents dans les zones entre 8 et 8,5 ppm et 0,5 et 1 ppm montrent des parties flexibles de la protéine. Cette observation a été appuyée par les analyses 1D HET-SOFAST (Figure III-9 C) qui ont permis de calculer un coefficient $\lambda_{\text{NOE}} = 0,5$ (indice de compacité), caractéristique d'une protéine plutôt bien structurée mais présentant des zones flexibles. Après ajout d'uranium, une perte de signal en 1D standard est observée et le λ_{NOE} baisse à 0,42, reflétant un renforcement de la compacité de la protéine. Ces résultats suggèrent que la structuration de la protéine serait favorisée par l'uranium démontrant une interaction des deux objets. La diffusion des 2 formes (avec ou sans uranium) analysées par expérience DOSY (pour « Diffusion Order SpectroscopY) reste identique ce qui signifie que la perte du signal n'est pas due à une agrégation de la protéine (résultat non montré). Par la suite, une analyse en RMN 2D ^1H - ^1H a été réalisée (Figure III-9 B). En présence d'uranium, il y a un déplacement de résidus au niveau de la zone des aromatiques. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle l'uranium peut interagir avec l'étiquette histidine, mais n'exclue pas la possibilité que certains résidus de la protéine native puissent interagir avec l'uranium. Ainsi, il a été nécessaire d'analyser la forme GRP7 recombinante produite sans étiquette.

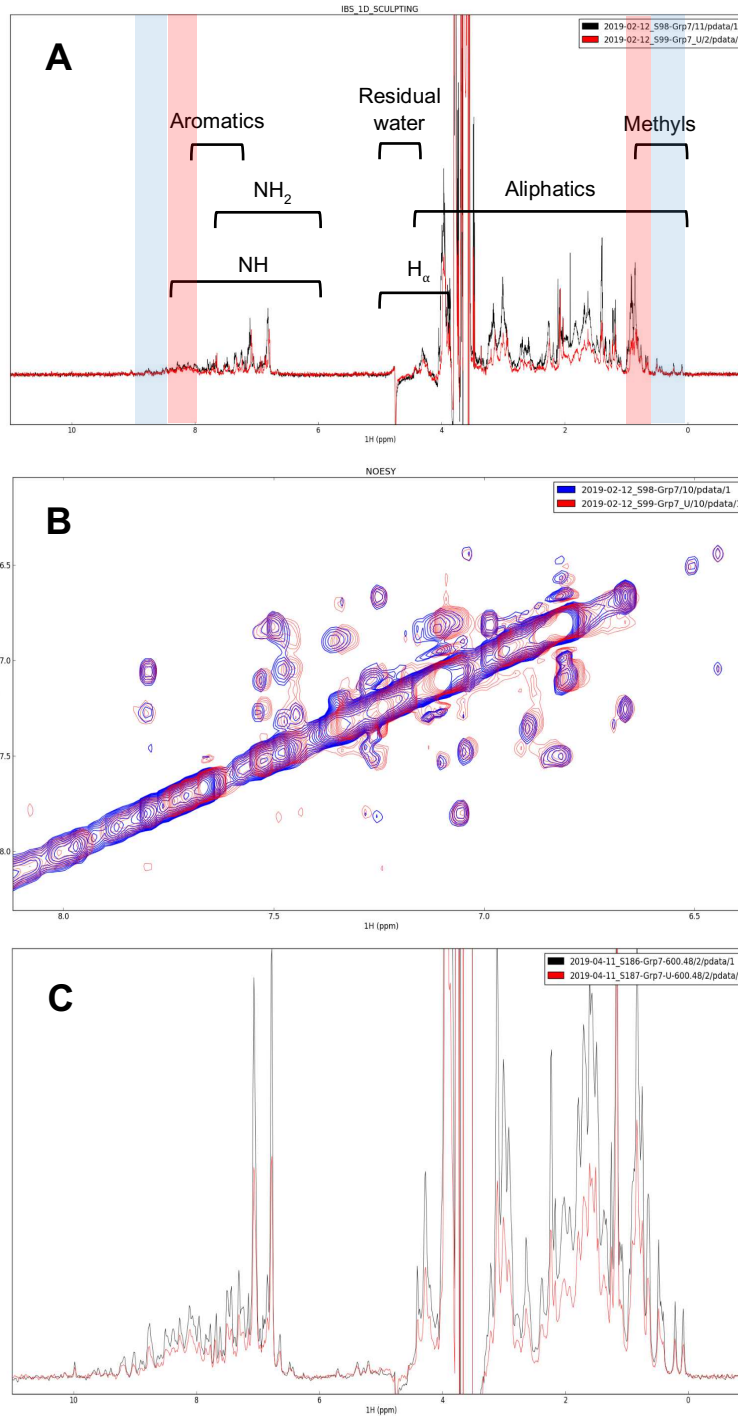


Figure III-9 : Spectres RMN 1D-¹H (A), 2D-¹H-¹H 1D (B) et HET-SOFAST (C) de 6His-GRP7 en présence ou en absence de nitrate d'uranyle.

Le spectre rouge correspond à GRP7 en présence d'uranium, le spectre bleu correspond à la protéine seule. La protéine et l'uranium sont utilisés à, respectivement, 100 et 500 μM dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM. Les zones rouges et bleues (spectre en A) correspondent respectivement aux zones non structurées et structurées.

vii. Purification de GRP7 recombinante sans étiquette

La protéine GRP7 sans étiquette a été produite dans *E. coli* selon un protocole identique à celui utilisé pour produire 6His-GRP7. L'utilisation de colonnes a été précédée d'une étape d'enrichissement par précipitation au sulfate d'ammonium. GRP7 précipite à un degré de saturation compris entre 40 et 60 %. Cette étape a permis d'éliminer de nombreux contaminants

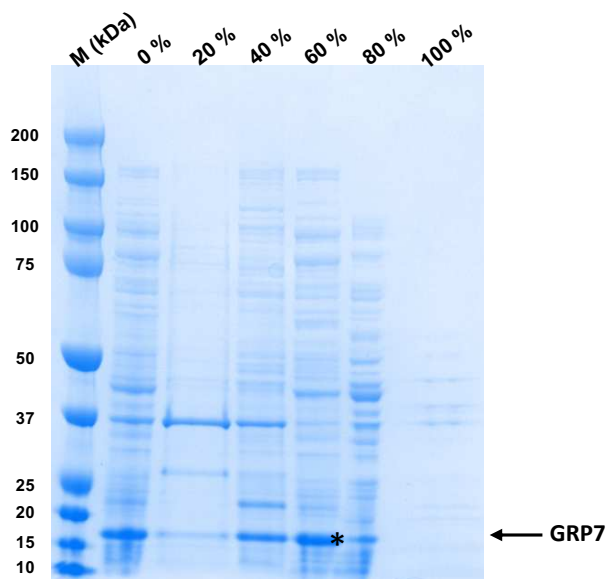


Figure III-10 : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie montrant le profil polypeptidique d'un extrait protéique de bactéries surproduisant GRP7 après précipitation à différents degrés en saturation (0, 20, 40, 60, 80, 100 %) de sulfate d'ammonium.

majeurs (Figure III-10). Après avoir éliminé un nombre important de protéines par précipitation de l'extrait protéique de bactéries surproduisant GRP7 à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium, GRP7 a été précipitée à 60 % et remise en suspension dans du tampon puis a été purifiée en deux étapes chromatographiques : une colonne de Q-Sepharose suivie d'une Superdex 200. La protéine recombinante non taguée étant instable dans un tampon à faible concentration saline, du NaCl à une concentration de 300 mM et du glycérol 10% ont été inclus dans le tampon chromatographique de la colonne de Superdex 200. A partir de 2 litres de culture bactérienne, nous sommes parvenus à purifier jusqu'à 12 mg de GRP7 recombinante. Le gel bilan de la purification est présenté dans la figure III-11. Enfin, nous avons montré que GRP7 purifiée se comporte comme un monomère en solution (Figure III-12).

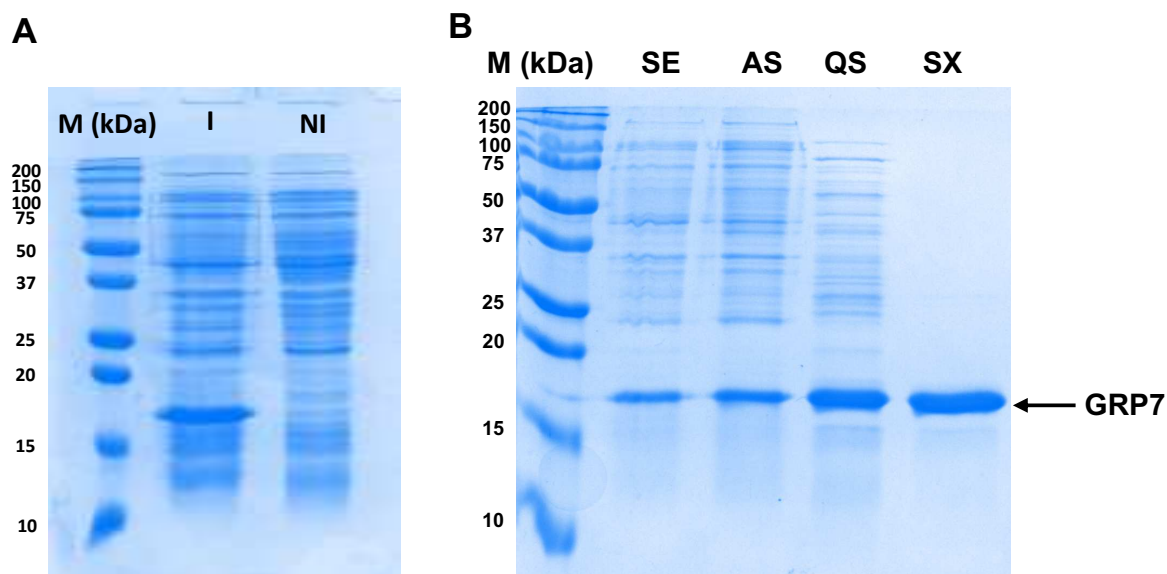


Figure III-11 : Production et purification de GRP7 recombinante non taguée.

La production de GRP7 est induite à l'aide d'IPTG dans les bactéries Rosetta 2 pendant 16 h à 28°C. Le gel A présente les extraits protéiques obtenus avec induction (I) ou sans induction (NI) de l'expression. Le gel B est le gel bilan de la purification de GRP7. SE : « soluble extract » ; AS : « ammonium sulfate extract » ; QS : « Q-Sepharose extract » ; SX : « Superdex 200 extract ».

viii. Analyse de l'affinité de GRP7 pour l'uranium

Afin d'étudier l'affinité de GRP7 pour l'uranium, deux séries d'expériences ont été réalisées. Dans la première, des colonnes microspin contenant de la résine G-25 ont été utilisées de la même façon que pour 6His-GRP7. Les résultats obtenus montrent un ratio U / Protéine de $0,66 \pm 0,05$ mole d'uranium par mole de protéine sur 2 expériences indépendantes de chacune 2 réplicats. Ce ratio sub-stoechiométrique pourrait être compatible avec la liaison d'un ion uranyle à l'interface de deux monomères ou pourrait être le reflet d'une certaine instabilité d'un complexe protéine-uranyle avec un ratio initial de 1 / 1.

La seconde approche est basée sur la mesure de la fluorescence naturelle des tryptophanes et des tyrosines. Si la fluorescence de ces deux acides aminés est affectée (« quenching » ou augmentation) en présence de quantité incrémentale d'uranium et que le phénomène est réversible après ajout d'un ligand d'uranium, il est possible de déterminer une constante de dissociation apparente (K_d app) caractérisant l'affinité de la protéine pour l'uranium. La séquence de GRP7 contient 2 tryptophanes et 10 tyrosines. Lors de cette étude, avec GRP7 utilisée à la concentration de 1 μ M et une excitation à 277 nm, un fort signal d'émission à 350 nm et un plus faible à 300 nm ont été observés. Le premier correspond à la longueur d'onde

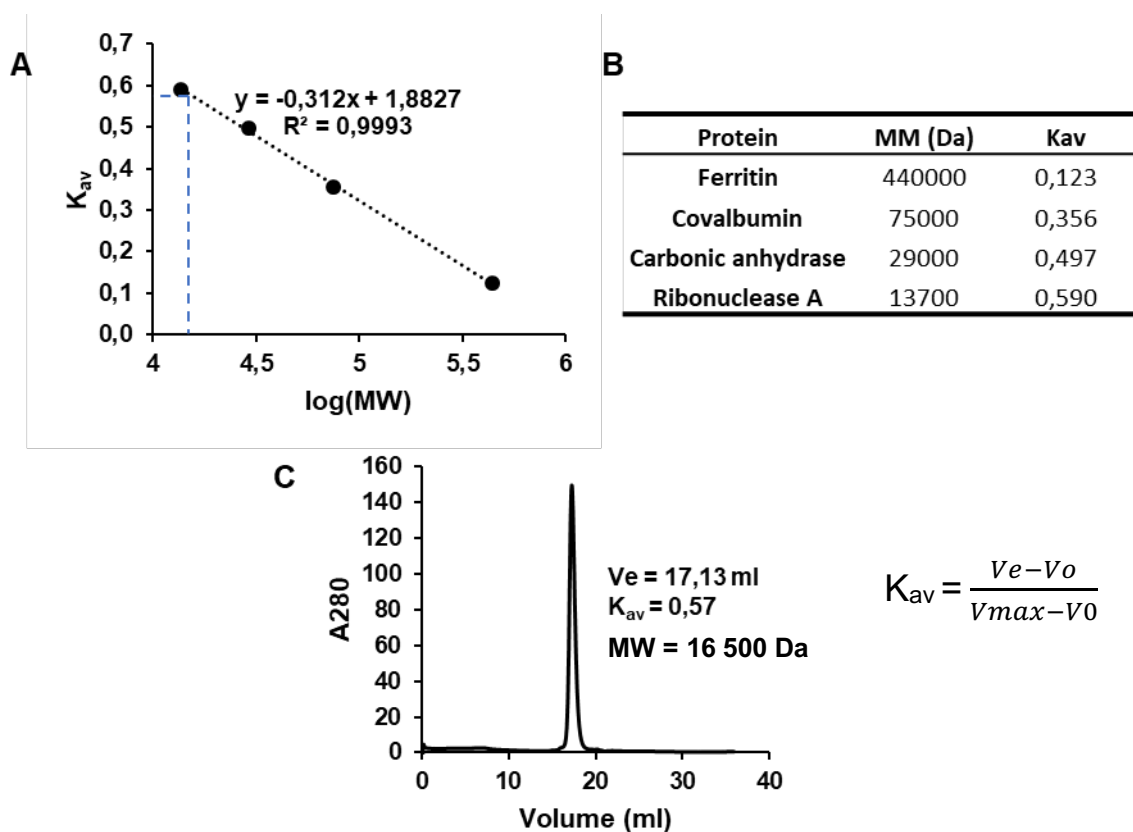


Figure III-12 : Détermination de la masse native apparente de GRP7 par chromatographie sur colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (C).

GRP7 est éluée sur colonne de Superdex 200 Increase 10/300 GL et permet de montrer que GRP7 est présente sous forme de monomère en déterminant sa taille à l'aide d'une gamme étalon (A et B). Le coefficient K_{av} est déterminé à partir du volume d'élué V_e de GRP7 selon la formule suivante : $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_{max} - V_0}$ où V_{max} est le volume total de la colonne et V_0 le volume d'exclusion de la colonne (volume d'élué du bleu de dextran).

d'émission des tryptophanes, le second des tyrosines. Ces deux observations montrent qu'au moins certains des résidus tryptophanes et tyrosines sont accessibles au solvant et que leur fluorescence est observable. Après ajout de 20 équivalents d'uranium le signal du tryptophane était faiblement affecté (Figure III-13). L'absence de « quenching » important de la fluorescence des tryptophanes pourrait signifier une absence d'interaction avec la protéine mais les expériences précédentes sur les colonnes microspin montrent clairement une interaction. Il semble donc que l'interaction de l'uranium sur la protéine n'ait que peu ou pas d'effet sur l'accessibilité des résidus tryptophane, car probablement trop distants du site de liaison du métal. Cette technique n'était donc pas adaptée pour déterminer l'affinité de GRP7 pour l'uranium.

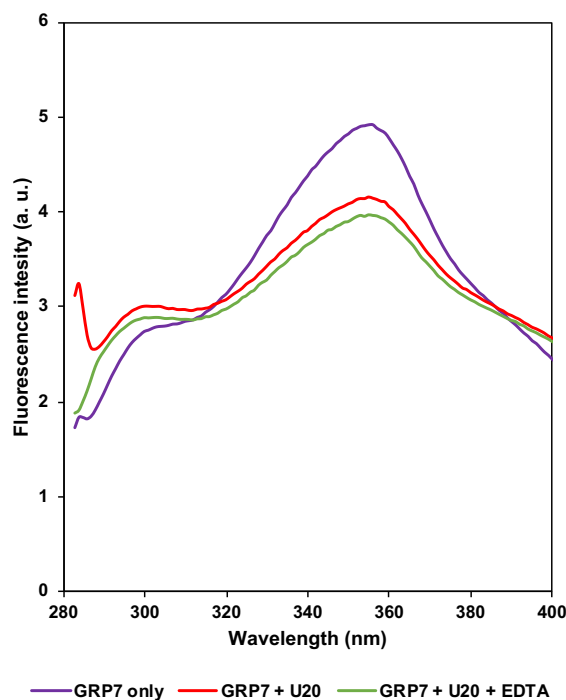


Figure III-13 : Spectres de fluorescence de GRP7.

GRP7 a été étudiée à une concentration de 1 μM dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 0,3 M, IDA 10 μM (en violet), puis après ajout de nitrate d'uranyle 20 μM (en rouge), puis ajout d'EDTA 2,5 mM (en vert). La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 277 nm.

ix. Analyse structurale de GRP7

De la même manière que pour la protéine taguée, des analyses en RMN ont été réalisées : une analyse en ^1H standard, une analyse en ^1H HET-SOFAST ainsi que des expériences de DOSY. Les analyses en 1D ^1H standard ont montré un profil similaire à celui de la protéine 6His-GRP7 avec un signal dans la région des protons associés aux groupements méthyls entre 0 et 1 ppm ainsi que dans la région des protons associés aux groupements amides entre 8 et 10 ppm (Figure III-14 A). Ces observations sont caractéristiques d'une protéine plutôt bien structurée. De plus, les analyses 1D HET-SOFAST permettent de déterminer un coefficient λ_{NOE} de 0,45, caractéristique d'une protéine bien structurée avec des zones plus flexibles (Figure III-13 B). Une protéine très bien structurée présente un λ_{NOE} inférieur à 0,35 alors qu'une protéine non structurée supérieur à 0,75. Après ajout d'uranium, ce coefficient baisse à 0,40 pouvant signifier que l'uranium renforce la structuration de la protéine. De plus, l'ajout d'uranium entraîne une perte de signal de manière uniforme sur toute l'étendue du spectre. Cette observation peut s'expliquer soit par une dénaturation partielle de la protéine soit par une agrégation ou oligomérisation de la protéine, les oligomères formant des objets trop gros pour être visualisés.

Les analyses DOSY montrent qu'en absence d'uranium la diffusion translationnelle est plus rapide qu'en présence d'uranium (Figure III-14 C). Les mesures observées sont compatibles avec une dimérisation de la protéine en présence d'uranium et pourrait expliquer la perte de signal observée dans les expériences 1D ^1H standards et un rapport uranium/protéine proche de 0,5.

x. **Production et purification de GRP7 marquée au ^{13}C et ^{15}N**

A la suite de ces premières expériences, il a été convenu que l'intensité du signal était suffisante pour entreprendre l'analyse structurale par RMN de la protéine marquée de manière homogène au ^{13}C et ^{15}N permettant l'assignation des résidus par l'acquisition de spectre 2D ^{13}C - ^{15}N afin de déterminer lesquels sont affectés par l'ajout d'uranium. La forme marquée a été produite dans des bactéries *E. coli* Rosetta 2 dans un milieu minimum M9 contenant du glucose marqué au ^{13}C et du sulfate d'ammonium marqué au ^{15}N (pour plus de détails, voir la partie Matériels et Méthodes). Elle a ensuite été purifiée selon le même protocole que pour la protéine non marquée. Les analyses structurales par RMN 2D sont en cours.

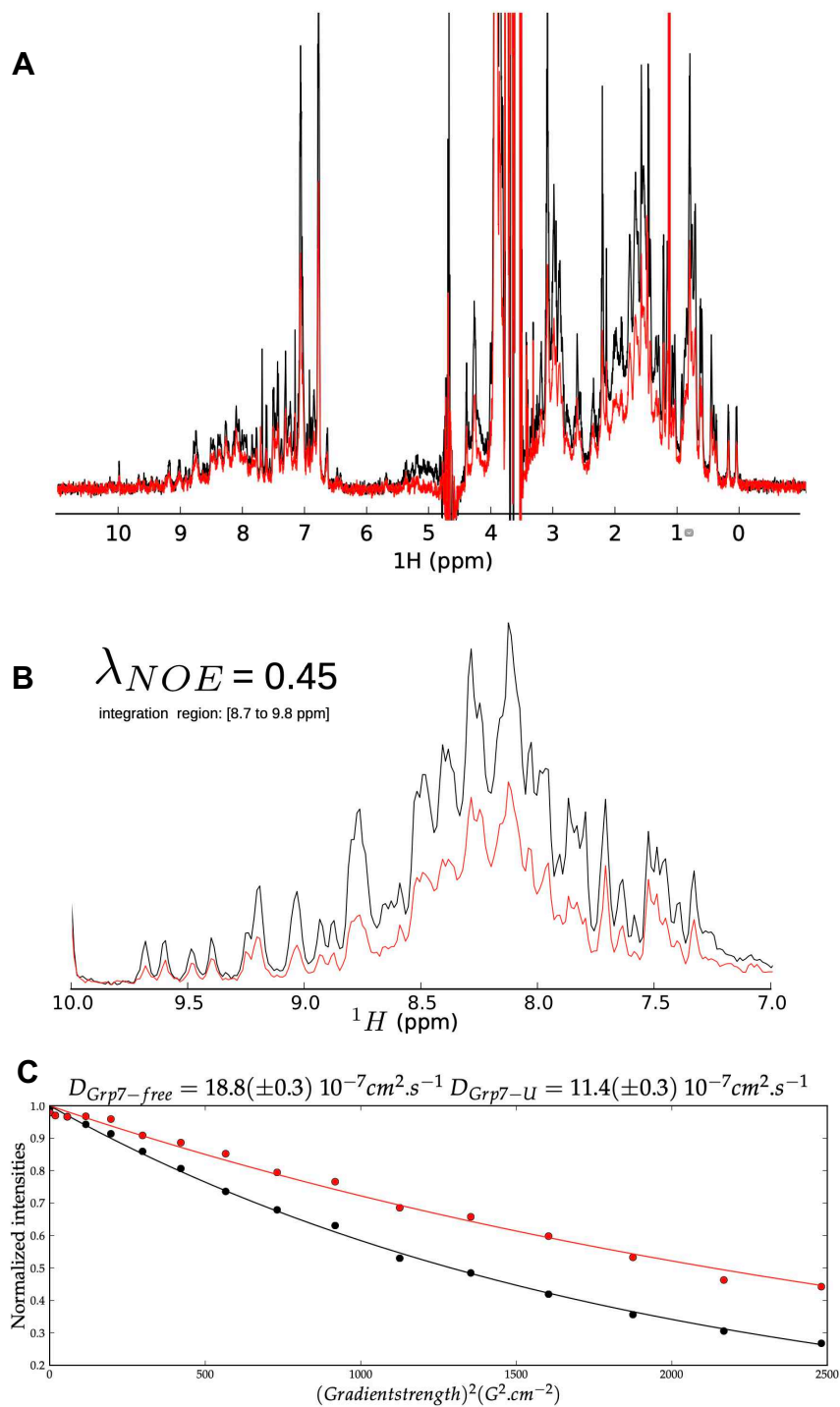


Figure III-14 : Etude par RMN de GRP7 recombinante : 1D 1H (A), 1D HET-SOFAST (B) et DOSY (C).

La protéine GRP7 recombinante non taguée a été étudiée en présence (rouge) ou absence d'uranium (noir) en RMN 1D 1H standard (A), et par une analyse HET-SOFAST (B) avec le spectre 1D de référence (noir) et le spectre saturé (rouge) permettant de déterminer le coefficient λ_{NOE} caractérisant la compacité de l'objet étudié. Une analyse DOSY a également été réalisée (C) montrant la vitesse translationnelle de GRP7 en présence (rouge) et absence (noir) d'uranium (D_{GRP7-U} vs $D_{GRP7-free}$).

I - 3. Discussion

i. Optimisation de l'entrée d'uranium dans les cultures cellulaires d'*A. thaliana*

Dans ce chapitre, plusieurs approches chromatographiques ont été développées pour identifier *in cellulo* des protéines fixatrices d'uranium. Nous avons fait le choix d'utiliser des cellules végétales plutôt que des plantes entières d'*A. thaliana*. Les cultures cellulaires ont l'avantage, en plus de s'affranchir de la compartimentation cellulaire, de se multiplier très rapidement, et permettent d'obtenir une biomasse conséquente en quelques jours seulement. Notre approche nécessitant de grandes quantités de protéines, les cultures cellulaires ont donc été privilégiées. De plus, ces cellules, peu différenciées ont l'avantage de présenter des niveaux d'expression protéiques relativement uniformes du protéome d'*A. thaliana* (Sarhou et al., 2020). De cette manière, aucune protéine très abondante et faiblement affine pour l'uranium n'est susceptible de masquer des UBP avec une bien meilleure affinité pour l'uranium mais très peu exprimées. A titre d'exemple, dans le sérum sanguin, l'albumine a longtemps été considérée comme la principale cible de l'uranyle (Montavon et al., 2009). Or, plus récemment, il a été montré que l'albumine ne fixait en fait que 7 % de l'uranyle présent dans le sérum sanguin alors que la fétuine A, bien plus affine pour l'uranyle ($K_d = 30 \text{ nM}$ vs $1,7 \text{ }\mu\text{M}$ pour l'albumine) mais bien moins abondante que l'albumine, en fixait plus de 80 % (Basset et al., 2013). L'utilisation de souches cellulaires végétales cultivées en conditions hétérotrophiques nous permet donc de nous affranchir ou au moins de limiter ce phénomène.

Lors de nos premières expériences, nous avons exposé les cellules dans un milieu contenant $30 \text{ }\mu\text{M}$ de phosphate au lieu de $1,25 \text{ mM}$ dans un milieu MS standard. En effet, il est connu que le phosphate limite grandement l'absorption d'uranium (Ebbs et al., 1998; Misson et al., 2009; Soudek et al., 2011; Laurette et al., 2012a). La complexation de l'uranium avec le phosphate entraîne la formation de phosphate d'uranyle (Munasinghe et al., 2015), composé très peu soluble ayant tendance à précipiter dans le milieu ou à s'accumuler sur la paroi cellulaires des végétaux. Toutefois, dans ces conditions très peu d'uranium se retrouve sous forme soluble dans la cellule. Afin d'améliorer l'incorporation d'uranium, nous avons agi sur deux paramètres : 1- une densité cellulaire plus faible abaissée de 10 g pour 100 ml de milieu à environ 3 g pour 100 ml dans le but d'augmenter le rapport uranium / biomasse et 2- l'utilisation d'un milieu sans phosphate au moment de l'exposition au nitrate d'uranyle. Ces nouvelles conditions n'affectent ni la viabilité (Berthet et al., 2018) ni la croissance cellulaire sur 24 h

d'exposition (Annexe 2). Dans ces conditions, la proportion d'uranium soluble dans la cellule passe de moins de 2 % (en conditions LP) à près de 20 % de l'uranium total (en conditions NP) dont la moitié est liée à des protéines (Figure III – 1). Ces conditions étaient adéquates pour l'isolation et l'identification d'UBP.

ii. Approches utilisées pour l'identification d'UBP

Afin d'identifier les cibles protéiques de l'uranium dans les cellules végétales, nous avons mis en place une stratégie d'enrichissement chromatographique et une analyse électrophorétique. Le couplage des séparations chromatographiques avec la quantification de l'uranium par ICP-MS, nous permet d'enrichir progressivement les extraits protéiques en UBPs afin de pouvoir les identifier plus facilement par spectrométrie de masse. Cette approche n'avait pas vocation à être exhaustive mais visait plutôt à identifier des protéines qui pourraient être impliquées dans la détoxification de l'uranium, qui à notre connaissance sont inconnues dans le règne végétal. Une telle approche a été utilisée dans le passé pour mettre en évidence le rôle important des phytochélatines, peptides synthétisés à partir de glutathion, dans la chélation et séquestration du cadmium (Howden et al., 1995).

Pour l'identification des UBPs, une approche chromatographique simple et efficace repose sur l'utilisation de colonnes d'affinité de type « immobilized metal affinity column » (IMAC), comme celle qui a été développée par l'équipe de Claude Vidaud et qui utilise les propriétés fixatrices de cations des groupements aminophosphonate pour la liaison de l'uranium (Basset et al., 2008). Cette colonne permet de capturer que les protéines d'un extrait ayant de l'affinité pour l'uranyle. Cette approche a permis d'identifier de nombreuses protéines de cellules rénales ou neuronales humaines capables de lier l'uranium *in vitro* (Dedieu et al., 2009; Vidaud et al., 2019). Une collaboration de notre équipe avec Claude Vidaud a permis d'utiliser cette technique sur des extraits protéiques de racines et de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* qui a abouti à l'identification de 38 protéines affines pour l'uranium dont une, nommée UB25, a été caractérisée plus en détail (résultats non publiés). Cette protéine, particulièrement riche en résidus glutamate, un des sites de liaison privilégié de l'uranium, présente une affinité pour l'uranium de l'ordre du nanomolaire. Néanmoins, cette approche permet uniquement d'identifier des protéines ayant une affinité pour l'uranium *in vitro* mais ne présage pas d'une interaction effective de ces protéines dans des plantes ou des cellules en culture exposées à l'uranium. En effet, dans ces expériences les protéines n'ont jamais été en contact avec l'uranium avant leur passage sur la colonne IMAC.

L'identification de ces cibles protéiques cellulaires de l'uranium, qui est l'objectif central de ce chapitre, pourrait donner des informations cruciales pour la compréhension des impacts cellulaires de l'uranium que ce soit dans les mécanismes de toxicité ou de tolérance. La fixation de l'uranyle sur une protéine cible peut entraîner des changements conformationnels et/ou un déplacement de co-facteurs métallique (Lin, 2020) pouvant mener à des pertes d'activité enzymatique comme dans le cas de la phosphodiesterase activée par la calmoduline et le calcium (Brulfert et al., 2017), de la transferrine (Vidaud et al., 2007), de l'ostéopontine (Qi et al., 2014; Huynh et al., 2016) ou encore de la fétuine A (Huynh et al., 2016). De plus, ces interactions peuvent donner des pistes sur les mécanismes de toxicité de l'uranium à l'échelle de l'organisme comme dans le cas de la fétuine A où une interaction de l'uranyle pourrait expliquer l'entrée massive de l'uranium dans les cellules osseuses (Bourgeois et al., 2015; Huynh et al., 2016).

Plusieurs études d'identification à l'échelle du protéome d'UBP cibles *in vivo* dans divers organismes comme l'écrevisse (Xu et al., 2014a), l'homme (Vidaud et al., 2005; Huynh et al., 2015; Vidaud et al., 2019), le poisson - zèbre (Bucher et al., 2014; Eb-Levadoux et al., 2017) ou encore la bactérie (Cvetkovic et al., 2010) ont été rapportées, mais encore aucune sur la plante. Les deux approches les plus utilisées dans ce but sont des approches chromatographiques et électrophorétiques. Ces deux approches sont souvent combinées. La séparation sur colonnes chromatographiques permet une épuration du profil avec enrichissement en UBPs et l'utilisation de la séparation sur gels 2D en conditions natives suivie de technique d'ablation laser couplée à un ICP-MS (LA-ICP-MS) permet de localiser l'uranium afin d'identifier les UBPs par spectrométrie de masse (LC-MS-MS) (Frelon et al., 2009; Bucher et al., 2014; Xu et al., 2014a; Xu et al., 2014b; Hagège et al., 2015). Finalement, rares sont les études où la séparation protéique par colonne chromatographique seule est suffisante pour aboutir à l'identification d'UBPs soit en raison d'une mauvaise préservation de la liaison uranium-protéine au cours des différentes étapes soit d'une séparation insuffisante. L'étude de Cvetkovic et al. en 2010, prend le parti d'utiliser uniquement des colonnes chromatographiques pour étudier le métallobiotome de bactéries, montrant que l'approche est très efficace pour les métaux essentiels tels que le fer, zinc ou le calcium. Après chaque étape chromatographique un enrichissement des métallobiotines pour le métal concerné est observé. En revanche, pour plusieurs métaux toxiques dont l'uranium, il n'y a pas d'enrichissement. Selon l'étude, la fixation de l'uranium à de nombreuses protéines de manière aspécifique et le décrochage progressif de l'uranium des protéines ayant une réelle affinité à chaque étape permet

d'expliquer ce phénomène. Dans cette même étude, une colonne d'hydroxyapatite basée sur une matrice de phosphate de calcium et un tampon phosphate pour l'élution a été utilisée. Or, comme cité précédemment, le phosphate a une forte affinité pour l'uranium et peut précipiter celui fixé de manière aspécifique aux protéines ou avec une faible affinité (Yang et al., 2017).

Ici, en prenant en compte tous les avantages et limitations des approches utilisées dans les précédentes études, nous avons proposé deux stratégies chromatographiques. La stratégie I consiste à préserver au mieux la liaison uranium – protéine afin d'identifier de manière la plus exhaustive possible les protéines fixant l'uranium indépendamment de leur affinité pour le métal. La stratégie II, quant à elle, vise à isoler essentiellement les protéines ayant la plus forte affinité pour l'uranium par l'élimination des protéines les moins affines (Figure III-2).

iii. Stratégie I : Vers une étude exhaustive des UBP

Lors de nos premiers essais de séparation, nous avons utilisé une colonne échangeuse d'anion de type Q-Sepharose pour fractionner des extraits protéiques issus de cellules en culture liquide d'*A. thaliana* qui permet d'obtenir une bonne résolution de séparation tout en préservant de manière satisfaisante la liaison uranium-protéines. Cette colonne a été utilisée pour le fractionnement d'extraits protéiques dans le but d'identification de métalloprotéines dans la bactérie (Cvetkovic et al., 2010) et de protéines fixatrices d'uranium dans les cellules neuronales humaines (Vidaud et al., 2019). Au cours de nos premières expériences, le fractionnement des protéines solubles de cellules d'*A. thaliana* en culture exposées à l'uranium était réalisé avec un gradient salin discontinu par échelons de 50 – 100 mM NaCl de 0 à 1 M. L'élution a permis d'obtenir 10 fractions dont certaines contenaient des quantités significativement plus élevées d'uranium et des profils protéiques très différents selon les fractions, le protéome de chacune des fractions ayant été identifié par LC-MS/MS (Sarhou et al., 2020). Ces résultats ont permis de montrer qu'il existait des protéines d'*A. thaliana* qui fixent spécifiquement l'uranium *in vivo* et que la liaison uranium – protéine était préservée, au moins en partie, sur cette colonne. Toutefois, le gradient n'était pas assez résolutif pour aller plus loin dans la purification d'UBP. Dans la suite de notre étude nous avons opté pour un gradient continu en NaCl de 0 à 0,6 M ce qui a permis d'obtenir un profil d'uranium très résolu et de mettre en évidence 5 pics majoritaires d'uranium de manière reproductible correspondant à au moins 5 populations d'UBP différentes (Figure III – 3). En seconde étape, nous avons utilisé une colonne chromatographique d'exclusion de taille de type Superdex 200, elle aussi très utilisée car elle permet une bonne préservation de l'interaction uranium – protéine

(Cvetkovic et al., 2010; Qi et al., 2014; Xu et al., 2014a; Eb-Levadoux et al., 2017; Vidaud et al., 2019). Cette étape montre qu'un pic d'uranium en sortie de Q-Sepharose pouvait contenir plusieurs UBP différentes. En effet, 2 de ces pics (pics 1 et 2), après fractionnement sur Superdex200, conduisent chacun à la résolution de 3 pics d'uranium. A la suite de ces deux étapes et malgré l'utilisation de toutes les précautions pour maintenir les interactions uranium – protéines, une forte chute de rendement (rapport uranium / protéine) a été observée nous empêchant de poursuivre le fractionnement avec le même type d'approche chromatographique. Nous avons donc tenté une identification des UBP à partir des fractions déjà obtenues avec une approche originale basée sur la séparation en gel 2D.

La séparation sur gel 2D en conditions natives a été utilisée dans le cas d'identification d'UBP chez l'Homme, le rat ou encore l'écrevisse (Vidaud et al., 2005; Frelon et al., 2009; Xu et al., 2014a). Toutefois, ce type d'approche présente plusieurs limitations. D'une part, la résolution en conditions natives est beaucoup plus faible qu'en conditions dénaturantes rendant difficile la séparation protéique. Toutefois, l'utilisation de gel natif SDS-PAGE en conditions sub-dénaturantes permet une meilleure séparation des protéines en préservant leurs interactions avec les métaux fixés (Nowakowski et al., 2014). D'autre part, la première dimension de la séparation 2D est une focalisation isoélectrique séparant selon le point isoélectrique des protéines, celui-ci étant, par définition, le pH où les protéines sont le moins soluble pouvant donc altérer leur structure et libérer l'uranium. Pour pallier à cette limitation, il est possible d'ajouter des agents kosmotropes qui permettent d'augmenter leur solubilité au pI. De manière générale, il faut trouver un équilibre entre la préservation de la liaison uranium – protéines et la résolution de la séparation protéique. De plus, la difficulté de localisation de l'uranium sur gel est une limitation propre à l'uranium. Dans d'autres études, la détection de l'uranium est réalisée par ablation laser couplée à un ICP-MS (LA-ICP-MS). Ne disposant pas de la technologie et pour contourner tous les inconvénients cités ci-dessus, une approche originale nommée sélection par corrélation d'abondance (« Protein Correlation Profiling » (PCP) en anglais) a été développée.

La sélection par corrélation d'abondance, appliquée aux UBP se base sur le postulat simple que la quantité d'uranium éluée d'une colonne chromatographique est proportionnelle à la quantité d'UBP. Autrement dit, le profil d'uranium suit de manière quantitative l'abondance de l'UBP associée. De cette façon, des fractions positionnées de manière différentes sur un même pic d'uranium (haut de pic, milieu gauche et milieu droit) ont été séparées sur gel 2D en conditions dénaturantes. La quantification des intensités relatives des spots protéiques obtenus avec un

logiciel spécialisé (delta2D) suivie de la comparaison avec celles des spots correspondants dans les autres fractions, a permis d'identifier les spots protéiques qui présentent les mêmes variations d'intensité relative que de la quantité d'uranium. De manière générale, pour qu'un spot soit considéré comme un spot candidat, il doit être plus intense en haut de pic par rapport aux deux milieux de pic correspondants. Deux critères ont été utilisés pour identifier les spots protéiques candidats. Un premier critère dit « faible » qui consiste à identifier les spots ayant une intensité supérieure en haut de pic par rapport à celles des deux milieux de pic respectifs dans deux expériences indépendantes. Le second critère dit « fort », plus drastique, consiste à ne retenir que les spots pour lesquels l'intensité la plus faible des deux hauts de pic des deux expériences reste supérieure à l'intensité la plus forte des quatre milieux de pic.

Cette approche a été testée sur deux pics (Pic I et III) issus de Superdex 200, eux-mêmes issus du pic 1 en sortie de Q-Sepharose. Dans le pic III, la concentration en uranium en haut de pic est environ 1,3 fois plus élevée que sur les bords de ce même pic (Figure III-6). Nous pouvons donc considérer que tous les spots ayant une différence d'intensité du même ordre de grandeur entre le haut et chacun des deux côtés peuvent constituer des spots candidats. Pour le pic I, ce taux est de 2,2 à gauche et 1,13 à droite par rapport au haut de pic (Figure III-5).

Ce type d'approche a souvent été utilisée pour l'identification de protéines en réponse à un stress métallique (Le Lay et al., 2006; Sarry et al., 2006; Fukao et al., 2009). Dans ces études, l'approche est légèrement différente de la nôtre car ce ne sont pas des protéines fixant directement le métal qui sont identifiées mais celles dont l'abondance est modifiée en réponse à un stress métallique en comparant les intensités des spots protéiques en condition de stress par rapport à un contrôle. Néanmoins, l'identification de spots candidats est réalisée par l'analyse de l'intensité relative de chacun des spots. On peut facilement faire une analogie avec notre cas où l'on recherche également des variations d'intensité des spots protéiques en comparant deux conditions. Il est fortement probable que plusieurs UBP soient contenues dans un seul pic d'uranium et cette approche ne nous permet pas d'identifier toutes les UBP présentes dans un spot. Néanmoins, elle pourrait permettre d'identifier les plus abondantes et d'obtenir une liste restreinte d'UBP candidates qui nous appartiendrait ensuite de tester dans leur capacité de fixation d'uranium.

iv. Stratégie II : Vers l'identification des protéines les plus affines pour l'uranium

La stratégie II a pour objectif d'identifier les protéines les plus affines pour l'uranium. Pour cela, une colonne d'hydroxyapatite en première étape de purification a été utilisée. La résine d'hydroxyapatite (ou phosphate de calcium) peut être très préjudiciable pour la liaison uranium - protéine en raison de la forte affinité du phosphate pour l'uranium. Toutefois, lorsque l'affinité de la protéine pour l'uranium est suffisamment forte, la liaison uranium – protéine serait mieux préservée (Yang et al., 2017). De cette façon, cette étape permettrait d'éliminer les protéines avec les plus faibles affinités pour l'uranium et ne garder que les protéines avec la plus forte affinité. Une grande majorité de l'uranium initialement contenu dans l'extrait protéique est retrouvée dans le volume d'exclusion de la colonne. Cette colonne nous permet néanmoins d'obtenir un pic d'uranium bien défini élué autour de 50 mM de phosphate qui ne contient plus que 5,5 % de l'uranium et 24 % des protéines présents initialement, parmi lesquelles sans doute les UBP les plus affines. Son fractionnement sur une colonne de Superdex 200 a permis la résolution de cinq pics distincts d'uranium. Le cinquième pic, correspondant à des protéines de faibles masses moléculaires (< 20 kDa) et contenant qualitativement peu de protéines, semblait particulièrement intéressant (Figure III-7). Son fractionnement ultime sur colonne Q-Sepharose a permis d'obtenir une fraction qui ne contient plus que 5 bandes protéiques majeures après analyse par SDS-PAGE (Figure III-7) et 17 protéines UBP candidates après analyse par LC-MS/MS (Tableau III-3).

v. Identification de 53 UBP candidates, toutes approches confondues

Les deux stratégies d'identification d'UBP développées dans ce chapitre ont donc permis d'identifier un total de 53 protéines candidates (36 pour la stratégie I et 17 pour la stratégie II). Ces protéines candidates ont été classées selon plusieurs critères : la présence d'au moins deux sites de phosphorylation avéré (multiphosphorylation), la capacité à fixer des métaux et/ou leur implication dans la réponse à des stress métalliques et enfin la proportion en résidus avec potentiellement de l'affinité pour l'uranium (Tableau III-4). L'ion uranyle étant un acide dur selon la classification de Pearson, il réagit préférentiellement avec les bases dures comme les fonctions hydroxyles, carbonates, carboxylates et phosphates (Creff et al., 2019). Au niveau des protéines, l'ion uranyle interagit principalement avec les résidus phosphorylés, les groupements carboxyles des chaînes secondaires des aspartates et glutamate (Basset et al., 2013; Lebrun et al., 2014; Safi et al., 2016), la fonction phénolate des tyrosines (Van Horn and Huang, 2006) et

le cycle imidazole des histidines (Wegner et al., 2009). Un modèle prédit sur une protéine modifiée de très haute affinité pour l'uranium (SUP) montre une coordination avec trois résidus : glutamate, aspartate et arginine (Zhou et al., 2014). La teneur moyenne de ces acides aminés (glutamate (D) 5,45 %, aspartate (E) 6,75 %, tyrosine (Y) 2,93 % et histidine (H) 2,27 %) dans les cellules eucaryotes est globalement d'environ 17,39 % (Nakashima and Nishikawa, 1994; Vidaud et al., 2019, Bairoch, 2019). Une grande majorité des protéines candidates identifiées (43/53) répond à au moins un de ces critères (Tableau III-4). Parmi elles, 4 protéines sont multiphosphorylées. Il s'agit de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1), la triosephosphate isomerase (CTIMC) et les protéines riches en glycine 7 et 8 (GRP7 et 8). PCK1 est impliquée dans l'étape de décarboxylation et phosphorylation de l'oxaloacétate dans le processus de gluconéogenèse et dont l'abondance est modifiée en réponse à un stress cadmium (Sarry et al., 2006). CTIMC est aussi impliquée dans la gluconéogenèse, elle est capable de fixer du cuivre (Tan et al., 2010) et son abondance augmente en réponse à des stress zinc et cadmium (Sarry et al., 2006; Fukao et al., 2009). GRP 7 et 8 sont décrites plus bas et font l'objet d'une étude un peu plus approfondie.

Près d'un tiers des protéines candidates (15/53) ont la capacité de fixer des métaux et près d'un quart (11/53) répondent à un stress métallique. Plus de la moitié (34/53) présentent une séquence enrichie en acides aminés ayant de l'affinité pour l'uranium.

Parmi les protéines répondant à plusieurs de ces critères, nous retrouvons aussi les ferritines 1 et 3, capables de fixer le fer (Fe^{3+}) et impliquées dans l'homéostasie du fer en servant de protéines de stockage et de lutte contre le stress oxydant (Briat, 1996). Il est à noter que l'identification de la ferritine a été réalisée dans une fraction en sortie de Superdex 200 présentant une co-élution avec la quasi-totalité du fer (non montré) à un volume d'élution compatible avec la masse moléculaire de la ferritine de plante (> 600 kDa) (Figure III-7). Les isoformes de la ferritine identifiées sont également plus riches que la moyenne en aspartate, tyrosine et histidine. La ferritine bactérienne a déjà identifiée comme fixatrice d'uranium dans le metalloprotéome de l'archaebactérie *Pyrococcus furiosus* cultivée en présence d'uranium (Cvetkovic et al., 2010) ou chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* exposée à une contamination par l'uranium (Xu et al., 2014b). L'identification d'homologues de plante de cette protéine à l'issue de nos approches nous permet donc de valider la ferritine comme UBP et suggérer un rôle de stockage de l'uranium que pourrait avoir la ferritine chez les plantes et donc potentiellement de détoxication.

Protein name	Multi-phosphorylation	Metal fixation	Response to metals	Phosphorylation	High content in D, E, H, Y (%)				
					Total	D	E	Y	H
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	X		X	X	X		X	X	X
Triosephosphate isomerase	X	X	X	X				X	
Glycin-rich protein 7	X		X	X					
Glycin-rich protein 8	X		X	X					
Ferritin-1		X	X				X	X	X
Ferritin-3		X	X				X	X	X
Protein disulfide-isomerase like 2-1			X				X	X	X
Alanine tRNA ligase		X	X	X			X	X	
Sucrose synthase 1			X				X	X	
S-formylglutathione hydrolase			X				X	X	X
Aminomethyltransferase			X				X		X
Lactoylglutathione lyase		X					X	X	X
Uncharacterized protein		X						X	
Monodehydroascorbate reductase 2							X	X	
Threonine-tRNA ligase		X						X	X
Elongation factor Tu		X							
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase		X							
Persulfide dioxygenase ETHE1 homolog		X					X		X
Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 6		X							X
Protein suppressor of quenching 1		X					X		
Transketolase-2		X							X
Thioredoxin superfamily protein		X							
Nucleoside diphosphate kinase family protein		X							
Protein DJ-1 homolog A			X						X
Phosphoglycolate phosphatase 1A							X		X
Peroxisome protein 2E							X		
Histidine-containing phosphotransmitter 2							X		
Probable carboxylesterase 13							X	X	X
Desiccation-related protein							X	X	X
UDP-xylose 4-epimerase 3							X		X
Bifunctional bis(5'-adenosyl)-triphosphatase							X		X
Avirulence induced gene 2 like protein							X		
Thioredoxin 3							X		
Actin depolymerizing factor 2							X		
Late embryogenesis abundant protein							X		
Trm112p-like protein							X		
Calcium-dependent lipid-binding							X		
Glutathione peroxidase 2							X		
Cystatin-1							X		
Glutathione S-transferase U10									X
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase									X
50S ribosomal protein L12-1									X
Cysteine synthase 1									X

Tableau III-4 : Récapitulatif UBP candidates identifiées classées selon les critères suivants : « multiphosphorylation », fixation métallique, réponse aux métaux, et forte proportion en Asp, Glu, Tyr et/ou His.

Dans ce tableau, le symbole « X » signifie que la protéine répond à ce critère. Le critère « multiphosphorylation » correspond à la présence d'au moins 2 acides aminés phosphorylés sur la séquence peptidique. Les critères « metal fixation » et « response to metals » correspondent aux protéines connues pour fixer des métaux (« metal fixation ») ou dont l'abondance ou l'expression des gènes correspondants est modifiée par un stress métallique (« response to metals »). Les seuils de teneur en acides aminés ont été fixés à 17,39 % pour le total, 6 % pour le glutamate (D), 7 % pour l'aspartate (E), 3 % pour les tyrosines (Y) et 2,5 % pour les histidines (H). Ces valeurs ont été déterminées à partir des teneurs moyennes en acides aminés pour les organismes eucaryotes décrites par Bairoch 2019.

La lactoylglutathione lyase est également une UBP candidate intéressante car elle fixe un ion zinc avec un site de fixation composé de 2 glutamates, 1 histidine et 1 glutamine. Ce même site pourrait potentiellement correspondre avec un site de fixation de l'uranium avec une configuration pentagonale bipyramidale, avec les groupements oxygène de l'uranyle occupant les positions axiales (Carugo, 2018; Garai and Delangle, 2020).

Enfin, parmi les 53 protéines candidates identifiées ici, 5 sont communes (ou proches) avec les UBP identifiées par notre équipe selon l'approche complémentaire impliquant l'utilisation d'une colonne d'affinité de type IMAC (approche *in vitro*) évoquée plus haut. Il s'agit de la glutathione S-transférase U10 (GST U10) (similaire à GST F2 = UBP15 dans l'approche *in vitro*) (Tableau III-5) ; la peroxydase-2E (PRX2E), similaire à PRXQ (= UBP29) ; la monohydroascorbate réductase 2 (MDAR2), similaire à MDAR1 (= UBP19) et enfin les Glycine-Rich Proteins GRP7 (= UBP33) et GRP8 (Tableau III-3). GRP7, en plus d'être retrouvée dans les deux approches complémentaires, est la protéine la plus abondante (avec GRP8) identifiée dans la stratégie II (Tableau III-3). De plus ses caractéristiques la rendent particulièrement intéressante à étudier dans sa capacité à fixer l'uranium. GRP7 est une protéine fortement phosphorylée avec 11 sérines et tyrosines phosphorylées (Tableau III-5). Comme déjà vu plus haut, l'uranium a une forte affinité pour les résidus phosphorylés. Elle est également impliquée dans la réponse aux stress métalliques comme le cadmium (Sarry et al., 2006) ou le zinc (Fukao et al., 2009) en plus d'autres stress abiotiques comme le froid (Kyung et al., 2005), le stress osmotique (Kim et al., 2008), hydrique (Kyung et al., 2005), salin (Kyung et al., 2005) et biotiques (Fu et al., 2007). GRP7 est une RNA binding protein (RBP) nucléaire majoritairement impliquée avec GRP8 dans la régulation du cycle circadien comme principaux facteurs de floraisons. GRP7 a la capacité de se fixer aux queues polyU ou polyG des ARNm afin de réguler l'épissage alternatif. GRP7 régule majoritairement ses propres transcrits ainsi que les transcrits de GRP8. (Staiger, 2001; Kim et al., 2010; Kwak et al., 2011; Schmal et al., 2013). De plus, une étude récente qui vise à identifier l'urano-protéome de cellules neuronales a mis en évidence 6 ribonucléoprotéines (hnRNPs) comme UBP candidates (Vidaud et al., 2019). Ces protéines sont des homologues de GRP7 et GRP8 de plante. Un alignement des séquences (Figure III-15) montre de nombreux motifs contenant des résidus aspartate, glutamate, histidine et tyrosine conservés mais aussi plusieurs résidus phosphorylés également conservés chez toutes ces protéines, qui pourraient constituer un ou plusieurs sites communs de liaison à l'uranium.

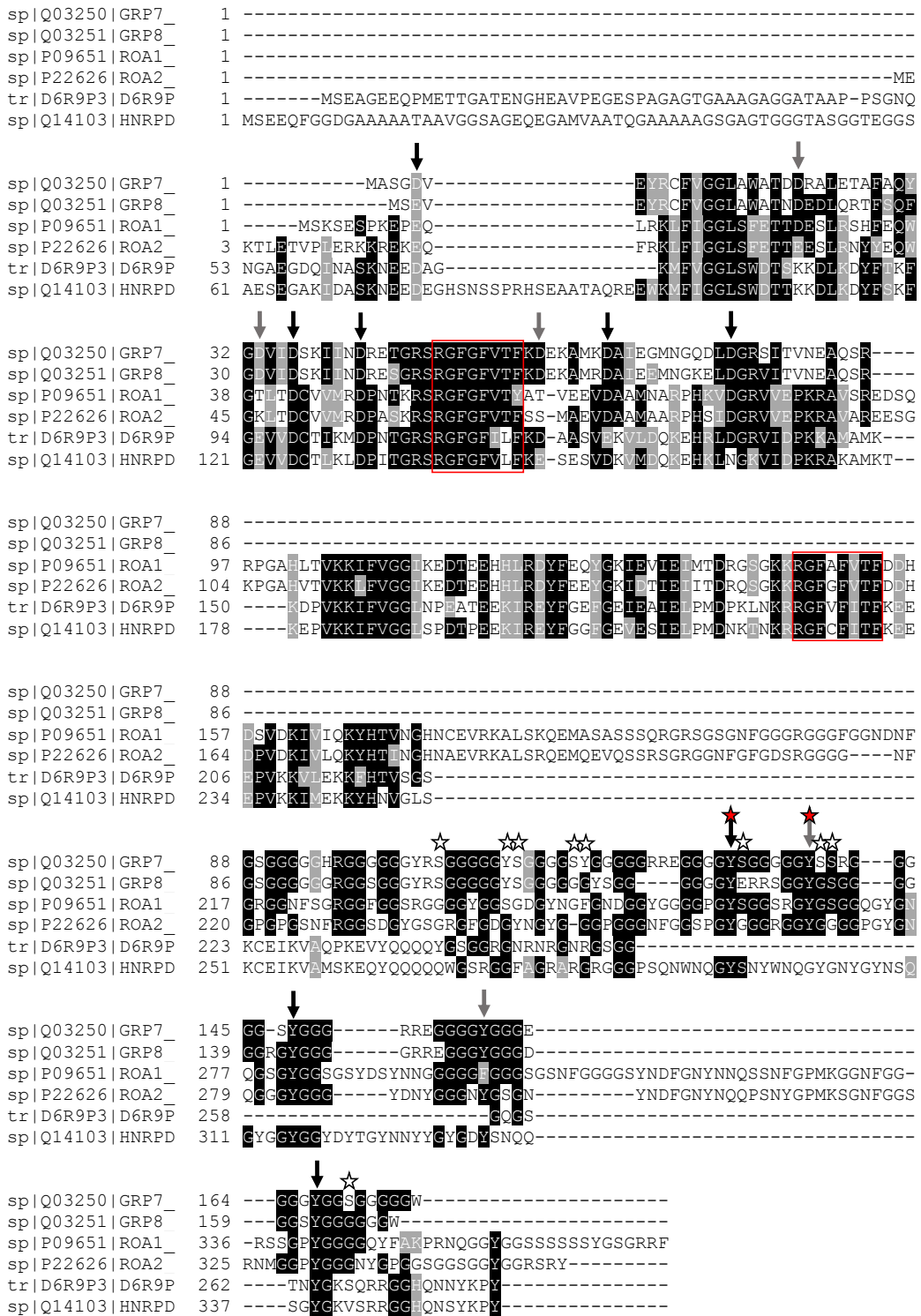


Figure III-15 : Alignement de séquence de GRP7 et GRP8 d'*A. thaliana* avec les protéines homologues « RNA-binding Proteins » chez l'Homme (ROA1, ROA2, D6R9P, HNRPD).

L'alignement a été réalisé avec le logiciel ClustalW et montre les acides aminés conservés (en noir) entre les protéines ainsi que les résidus phosphorylés de GRP7 (étoiles blanches) et ceux conservés avec GRP8 et les RNA binding proteins humaines (étoiles rouges). Les flèches représentent les résidus D, E, H et Y conservés (en noir consensus fort et en gris consensus moyen).

UniProt Name	UBP number	PROTEIN NAME
METE1_ARATH	UBP1	COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE
BGL38_ARATH	UBP2	BETA GLUCOSIDASE 38
SAHH1_ARATH	UBP3	S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEIN HYDROLASE 1
CP41B_ARATH	UBP4	PROTEIN CHLOROPLAST RNA BINDING
BGL37_ARATH	UBP5	BETA GLUCOSIDASE 37
GCSP1_ARATH	UBP6	GLYCINE DECARBOXYLASE P-PROTEIN 1
ALFC2_ARATH	UBP7	FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 2
RBS2B_ARATH	UBP8	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 2B
ICDHC_ARATH	UBP9	NADP+-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE
RBS1A_ARATH	UBP10	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A
BCA1_ARATH	UBP11	SALICYLIC ACID-BINDING PROTEIN 3
GGT1_ARATH	UBP12	ALANINE-2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE 1
ALFC1_ARATH	UBP13	FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 1
MDHC1_ARATH	UBP14	CYTOSOLIC-NAD-DEPENDENT MALATE DEHYDROGENASE 1
GSTF2_ARATH	UBP15	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F2
FNRL2_ARATH	UBP16	FERREDOXIN-NADP(+)-OXIDOREDUCTASE 2
PSBP1_ARATH	UBP17	OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2
BCA2_ARATH	UBP18	BETA CARBONIC ANHYDRASE 2
MDAR1_ARATH	UBP19	MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE 1
ATPBM_ARATH	UBP20	MITOCHONDRIAL ATP SYNTHASE BETA-SUBUNIT
GCST_ARATH	UBP21	GLYCINE CLEAVAGE T-PROTEIN FAMILY
FNRL1_ARATH	UBP22	FERREDOXIN-NADP(+)-OXIDOREDUCTASE 1
RCA_ARATH	UBP23	RUBISCO ACTIVASE
GLNA2_ARATH	UBP24	GLUTAMINE SYNTHETASE 2
PCAP1_ARATH	UBP25	PLASMA-MEMBRANE ASSOCIATED CATION-BINDING PROTEIN 1
CP20C_ARATH	UBP26	CYCLOPHILIN 20-3
CP41A_ARATH	UBP27	CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 kDa
PSBQ2_ARATH	UBP28	PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q-2
PRXQ_ARATH	UBP29	PEROXIREDOXIN Q
PSBQ1_ARATH	UBP30	PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q-1
RRFC_ARATH	UBP31	RIBOSOME RECYCLING FACTOR
PSBP2_ARATH	UBP32	PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P-2
RBG7_ARATH	UBP33	GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7
HS902_ARATH	UBP34	HEAT SHOCK PROTEIN 90-2
GSTF7_ARATH	UBP35	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F7
CP19A_ARATH	UBP36	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE
HSP7C_ARATH	UBP37	HEAT SHOCK 70 kDa PROTEIN 3
CATA3_ARATH	UBP38	CATALASE 3

Tableau III-5 : Liste des 38 protéines identifiées par l'approche dite « *in vitro* » pour l'identification d'UBP (résultats non publiés).

Les 38 UBPs ont été identifiées après chromatographie d'un extrait protéique d'*A. thaliana* (préablement décomplexifié par AEC) sur une colonne d'affinité IMAC sur laquelle de l'uranyle a été fixé. Les protéines retenues spécifiquement sur la colonne ont été nommées UBPs 1 à 38.

vi. GRP7 recombinante est capable de lier l'uranium

Afin de tester l'interaction de GRP7 recombinante avec l'uranium, nous avons réalisé des expériences d'incubation de la protéine en présence d'un excès de nitrate d'uranyle, puis séparation des complexes protéine – uranium formés et de l'uranium libre par chromatographie d'exclusion moléculaire sur micro-colonnes de G25. De cette façon, un rapport d'environ 0,7 mole d'uranium fixée par mole de GRP7 a été établi qui confirme l'interaction de la protéine recombinante avec le métal. Un tel ratio pourrait être le reflet soit d'une interaction stœchiométrique mais instable de l'uranium sur GRP7 soit de la liaison d'un ion uranyle pour deux monomères de protéine (voir plus bas). Comme nous l'avons vu, GRP7 possède *in vivo* 11 résidus phosphorylés qui pourraient expliquer en partie son affinité pour l'uranium *in planta*. En effet, les phosphorylations jouent un rôle important dans la fixation de l'uranium. La contribution déterminante du groupement phosphore pour la fixation de l'uranyle sur la calmoduline est montrée par plusieurs études (Pardoux et al., 2012; Sauge-Merle et al., 2012; Brulfert et al., 2016) De plus, l'ostéopontine, qui est une protéine hautement phosphorylée, a une affinité qui peut être réduite d'un facteur 10 à 100 en l'absence de phosphorylation (Safi et al., 2013; Qi et al., 2014). Dans notre étude, la protéine GRP7 recombinante ne possède pas les phosphorylations présentes *in vivo* car elle est produite dans un système bactérien ne permettant pas les modifications post-traductionnelles. Cette absence de phosphorylation pourrait donc entraîner une plus faible affinité de la forme recombinante de GRP7 pour l'uranium par rapport à la forme native.

L'analyse des variations de la fluorescence naturelle des tryptophanes et tyrosines a souvent été utilisée avec succès comme un moyen indirect d'étudier et de quantifier l'affinité d'une protéine pour un métal et en particulier l'uranium (Cisnetti et al., 2009; Niedźwiecka et al., 2012; Pardoux et al., 2012; Ancel et al., 2013; Lebrun et al., 2014; Starck et al., 2015; Yang et al., 2015; Starck et al., 2017; Laporte et al., 2019; Zhang et al., 2019). GRP7 possédant 2 tryptophanes et 10 tyrosines, nous avons donc tenté d'appliquer à la protéine recombinante cette technique de titration des tryptophane et tyrosine, mais sans succès.

Une approche qui utilise des compétiteurs ayant une affinité connue pour l'uranium pourrait être mise à profit pour déterminer de manière plus directe l'affinité d'une protéine pour un métal. Dans une étude visant à déterminer l'affinité de la protéine modifiée SUP pour l'uranium, l'acide diglycolique (DGA) et le carbonate ont été utilisés pour déterminer la constante de dissociation (K_d) du complexe uranium – SUP (Zhou et al., 2014). En ajoutant des quantités

croissantes de compétiteurs, un profil représentant la proportion d'uranyle fixée à la protéine en fonction de la concentration du compétiteur est obtenu. Pour de faibles concentrations en compétiteur, une majorité d'uranium est liée à la protéine. Plus la concentration en compétiteur augmente, moins d'uranium reste fixé à la protéine. Il y a un point d'inflexion correspondant à la concentration pour laquelle il y a autant d'uranium fixé à l'espèce compétitrice qu'à la protéine étudiée. Un ajustement du profil avec une équation prenant en compte les constantes d'affinité des complexes carbonate – uranyle et DGA – uranyle permet de déterminer la constante de dissociation K_d du complexe uranyle – protéine d'intérêt. Ce type d'approche sera utilisé prochainement avec GRP7 recombinante.

vii. Une fixation de l'uranium au niveau de la zone structurée de GRP7 ?

Afin d'identifier des sites de fixation de l'uranium sur la protéine, deux options étaient envisageables : la cristallographie et l'analyse en résonance magnétique nucléaire (RMN). La cristallographie est une approche efficace pour l'identification de site de fixation d'un métal mais repose sur la cristallisation de la protéine qui dépend étroitement de son état de stabilité et de structuration. L'étude du cristal permet d'obtenir la structure 3D de la protéine et d'avoir accès au(x) site(s) de fixation du métal. Or, GRP7 étant une protéine instable (indice de stabilité = 54,49 selon le programme ProtParam), essentiellement à cause de sa richesse en glycine, l'utilisation de cette approche s'avère délicate.

La seconde technique, l'analyse par RMN s'avère particulièrement intéressante dans l'obtention d'une structure 3D de protéine ainsi que l'identification de sites de liaisons de l'uranium. Cette approche structurale alternative, moins sensible à l'état de flexibilité des protéines est particulièrement adaptée aux protéines de petite taille (< 30 kDa) ce qui est le cas de GRP7 qui est une protéine monomérique de 16 kDa (Figure III-12). Ce type d'expérience a déjà été utilisé avec succès sur la protéine de cyanobactérie SmtA permettant d'identifier en combinaison avec de la modélisation, deux résidus (Glu 34 et Asp 38) responsables de la fixation de l'uranium sur la protéine (Acharya and Blindauer, 2016).

Cette approche a été utilisée dans le cadre de notre étude pour initier la caractérisation structurale de GRP7. A l'issue des premières analyses, nous montrons que GRP7 possède deux domaines : un structuré et l'autre non structuré, probablement le domaine C-terminal riche en résidus glycine). Les expériences d'analyse de diffusion translationnelle de la protéine, réalisées en présence et absence d'uranium suggèrent que l'uranium induit une dimérisation de GRP7. Cette observation serait compatible avec la stœchiométrie de liaison mesurée de l'uranium sur

la protéine. Des expériences préliminaires de RMN 2D réalisées, à l'aide d'un spectromètre RMN de 700 MHz sur GRP7 uniformément enrichie en ^{13}C et ^{15}N montrent des changements spectraux significatifs en présence d'uranium qui pourraient être le reflet de changements de conformation localisés induits par l'interaction avec l'uranium (Figure III-16).

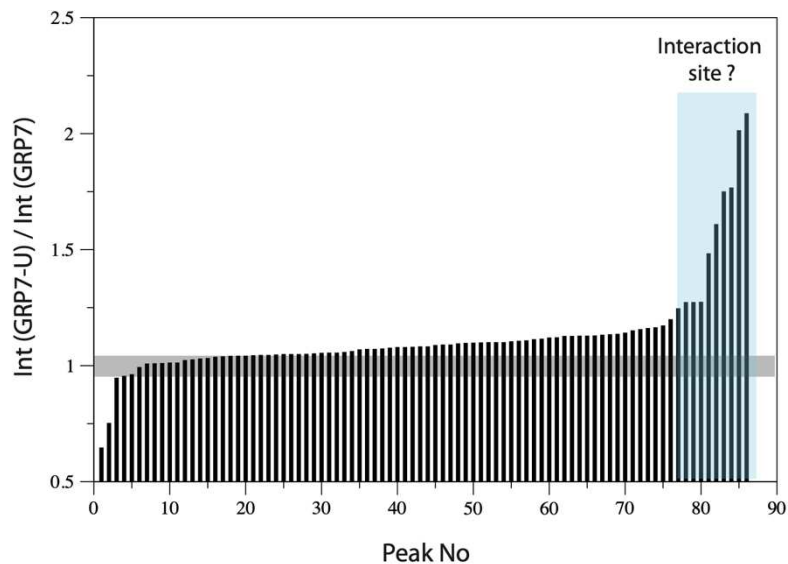


Figure III-16 : Changements spectraux d'intensités des résidus détectés par RMN- ^{13}C - ^{15}N en présence d'uranium par rapport à la protéine seule.

Le rapport 1 signifie que l'intensité d'un résidu est inchangée après ajout d'uranium. Un total de 86 résidus a été détecté sur les 176 acides aminés de GRP7. Une dizaine de résidus présente une intensité plus forte du signal en présence d'uranium qu'en l'absence d'uranium pouvant correspondre à un ou des sites d'interaction de l'uranium avec GRP7 (zone en bleu).

I - 4. Matériel et méthodes

i. Matériel biologique utilisé et conditions de culture

Des cultures cellulaires végétales d'*A. thaliana* (écotype Columbia) ont été cultivées en lumière continue ($40 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 22°C dans un milieu liquide Murashige and Skoog (MS) (contenant 1.25 mM de phosphate) supplémenté avec $1,5\%$ de saccharose (w/v). Les cellules ont été repiquées tous les 4 jours, 3 fois de suite, avant d'être mises en présence d'uranium. Pour cela, des cellules en croissance exponentielle ont été récoltées par centrifugation, lavées une fois et resuspendues dans un milieu MS contenant $30 \mu\text{M}$ de phosphate (Low phosphate (LP) ou pas (No Phosphate (NP))). Les cellules ont été traitées avec $50 \mu\text{M}$ de nitrate d'uranyle pendant 24 h avant récolte. Elles ont ensuite été lavées une fois avec une solution de carbonate de sodium 10 mM , deux fois à l'eau distillée puis séchées par filtration à vide pour être conservées à -80°C avant utilisation.

La souche d'*E. coli* DH5 α a été utilisée pour l'amplification des plasmides codant les protéines recombinantes. La production de protéines recombinantes a été réalisée dans la souche d'*E. coli* Rosetta 2 avec le système de plasmides pET qui a la particularité d'exprimer les ARNt des principaux codons rares de plantes permettant ainsi que la production de protéines végétales ne soit pas limitée par la disponibilité de ces ARNt.

ii. Extraction des protéines solubles de cellules d'*A. thaliana*

Les cellules végétales d'*A. thaliana* ont été broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat est resuspendu dans un tampon TrisHCl 10 mM pH 7,5, dithiothreitol (DTT) 1 mM auxquels a été ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science ref. 04 693 132 001). L'extrait a ensuite été centrifugé à $16\ 000 \text{ g}$ pendant 20 minutes à 4°C . Le surnageant a été récupéré et ultracentrifugé à $105\ 000 \text{ g}$ pendant 15 minutes à 4°C . Afin d'éliminer les ions libres, il a été concentré 100 fois puis dilué 15 fois avec du tampon TrisHCl 10mM pH 7,5, DTT 1 mM (Stratégie I) ou $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,5 20 mM , DTT 1 mM (Stratégie II) sur des unités d'ultrafiltration Amicon Ultra 4 Millipore 3 K (Kikster Biotech Gmbh & co.kg) par centrifugation à $4\ 000 \text{ g}$, cette étape a été répétée 3 fois. L'extrait dessalé et reconcentré est finalement ajusté à concentration protéique avoisinant 10 mg/ml .

iii. Séparation protéique sur colonnes chromatographiques

Toutes les étapes chromatographiques ont été réalisées, à 4°C, par « Fast Liquid Protein Chromatography » sur une Akta purifyer (GE Healthcare).

Stratégie I

1^{ère} étape : Colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose

Des fractions aliquots d'extraits de 400 mg de protéines solubles issues de cellules d'*A. thaliana* exposées à 50 µM de nitrate d'uranyle ont été déposés sur une colonne de Q-Sepharose High Performance 1,6 x 12 cm (23,5 ml) (GE Healthcare). L'étape de fixation sur la résine a été réalisée dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 1 mM (tampon A) à une vitesse de 0,5 ml/min. Ensuite, l'élution des protéines a été réalisée avec un gradient linéaire de NaCl jusqu'à 0,6 M dans le tampon A sur 14 volumes de colonne. Des fractions de 5 ml ont été récoltées en sortie de colonne.

2^{ème} étape : Tamis moléculaire ou colonne de filtration sur gel Superdex200

Les différents pics contenant les UBP élués sur la colonne échangeuse d'anions ont été concentrés, déposés sur une colonne de gel filtration Superdex 200 HiLoad® 16/60 (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, Glycérol 10 % (v/v), NaCl 0,15 M à une vitesse de 1 ml/min, puis élués avec ce même tampon. Des fractions de 1,5 ml ont été récoltées en sortie de colonne.

Stratégie II

1^{ère} étape : Colonne d'affinité d'hydroxyapatite

Des fractions aliquots de 100 mg de protéines solubles de cellules d'*A. thaliana* exposées à 50 µM de nitrate d'uranyle ont été chromatographiées sur une colonne d'hydroxyapatite HTP grade II 5 ml (Bio-Rad) équilibrée dans un tampon phosphate K₂HPO₄/KH₂PO₄ 20 mM pH 7,5, DTT 1 mM. L'élution a été réalisée avec un gradient linéaire de K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,5 jusqu'à 1 M sur 20 volumes de colonne. Des fractions de 5 ml ont été récoltées en sortie de colonne.

2^{ème} étape : Tamis moléculaire ou colonne de filtration sur gel Superdex 200

Les fractions constituant le pic majeur d'UBP élué par le gradient de phosphate ont été regroupées et concentrées à l'aide d'une unité de filtration Amicon Ultra 4 Millipore 3 K (Kikster Biotech GmbH & Co. KG). L'extrait a ensuite été chromatographié sur une colonne de gel filtration Superdex 200 HiLoad® 16/60 (GE Healthcare) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, Glycérol 10 % (v/v), NaCl 0,15 M à une vitesse de 1 ml/min. Des fractions de 1,5 ml ont été récoltées en sortie de colonne.

3^{ème} étape : Colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose

Les fractions des 5 pics d'UBP élués à l'issue de l'étape de gel filtration ont été regroupées puis diluées dans un tampon Tris-HCl pH 8 10 mM. Les extraits ont ensuite été chromatographiés sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose High performance 1 ml (GE Healthcare) à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl jusqu'à 0,6 M sur 14 volumes de colonne. Des fractions de 400 µl ont été récoltées en sortie de colonne.

iv. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines ont été séparées sur des gels de polyacrylamide 12 % ou 15 % (m/v) en conditions dénaturantes et ont été colorées au bleu de Coomassie avec de l'Instant Blue® (Expedeon) ou au nitrate d'argent à l'aide du kit « SilverQuest staining kit » (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

v. Analyse des protéines par électrophorèse bidimensionnelle en conditions dénaturantes

Chromatographie isoélectrique

Des gels à gradient de pH linéaire 4 – 8 de 160 mm (Gianazza et al., 1989) ont été coulés selon la procédure publiée (Rabilloud et al., 1994). Des bandes de 6 mm de largeur ont été coupées et réhydratées sur la nuit avec l'échantillon, dilué dans un volume final de 0,9 ml de solution de réhydratation (7 M urée, 2 M thio-urée, 4 % CHAPS, 0,4 % ampholytes carriers (Pharmalytes 3 – 10) et 100 mM de dithiodiéthanol (Luche et al., 2004).

Les bandes ont ensuite été placées sur une plaque Multiphor (GE Healthcare), et l'étape de chromatographie isoélectrique (IEF) a été réalisée selon les paramètres suivants : 100 V pendant 1 h, puis 300 V pendant 3 heures, puis 1000 V pendant 1 heure, puis 3400 V jusqu'à 60 – 70

kVh. Après l'IEF, les gels ont été équilibrés pendant 20 minutes dans un tampon Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 2,5 %, glycérol 30 % et urée 6 M (Görg et al., 1987). Les bandes ont ensuite été transférées au sommet des gels SDS et scellés avec de l'agarose 1 % dissous dans du Tris 125 mM, HCL 100 mM, SDS 0,4 % et 0,005 % de bleu de bromophénol.

Électrophorèse SDS et détection protéique

Des gels d'acrylamide 10 % (160 x 200 x 1,5 mm) ont été utilisés pour la séparation protéique. Le système de tampon taurine Tris (Tastet et al., 2003) a été utilisé à une force ionique de 0,1 et un pH de 7,9. La composition finale du gel est donc Tris 180 mM, HCl 100 mM, acrylamide 10 % (w/v), bisacrylamide 0,27 %. Un tampon Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1 % a été utilisé pour l'électrode supérieure. Un tampon Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1 % a été utilisé pour l'électrode inférieure. Les gels ont migré à 25 V pendant 1 h, puis 12,5 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bout du gel. La détection des protéines a été réalisée avec une coloration au tetrathionate d'argent (Sinha et al., 2001).

Analyse d'image

Les gels ont été scannés après coloration à l'argent avec un scanner à plat (Epson perfection V750), en utilisant une acquisition d'image en niveau de gris 16 bits. Les images des gels ont ensuite été analysées avec le logiciel Delta 2D (v. 3.6).

vi. Quantification des protéines

Les protéines ont été dosées grâce à la méthode de Bradford (1976) à l'aide du réactif « Protein Assay Dye Reagent Concentrate » (Bio-Rad). Les concentrations ont été déterminées en convertissant l'absorbance à 595 nm en concentration protéique selon une gamme étalon d'albumine sérologique de bœuf (BSA). GRP7 a été quantifiée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un Nanodrop en fonction de son coefficient d'extinction molaire $E_{0,1\%} = 1,474$ pour la forme sans étiquette (GRP7) et $E_{0,1\%} = 1,191$ pour la forme taguée 6His-GRP7.

vii. Quantification des métaux par ICP-MS

Les fractions protéiques ont été minéralisées dans une solution d' HNO_3 20 % (v/v) (Suprapur ; Merck) en chauffant 2 h à 60°C afin d'assurer la dénaturation et le relargage des métaux. Les protéines dénaturées ont été éliminées par centrifugation et les surnageants utilisés pour l'analyse par ICP-MS. Les échantillons minéralisés ont été dilués dans une solution d' HNO_3 0,5% (v/v) puis ont été analysés avec un instrument de masse iCAP RQ quadropole (Thermo

Fisher Scientific GmbH, Germany) équipé avec un nébuliseur en verre concentrique MicroMist U-Series, un refroidisseur à 3°C, une torche à quartz Qnova, deux cônes en nickel avec un insert haute sensibilité couplés à un échantillonneur automatique ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies, USA). L'uranium a été quantifié en utilisant le mode standard et en utilisant les courbes étalon ainsi qu'une solution de standard interne contenant du ^{103}Rh et ^{172}Yb . L'intégration des données a été réalisée avec le logiciel Qtegra (Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany).

viii. Identification des protéines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Les analyses de LC-MS/MS ont été réalisées par deux plateformes différentes selon la stratégie. Lors de la stratégie I, les spots protéiques candidats identifiés ont été analysés par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO) de Strasbourg. Lors de la stratégie II, les fractions protéiques ont été analysées par la plateforme EDyP du CEA Grenoble. Les protéines de chaque fraction analysée ont été concentrées au sommet d'un gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie. Elles ont ensuite été traitées avec du DTT et l'iodoacetamide avant digestion par de la trypsine. Les peptides ont été extraits puis analysés par nanoLC-MS-MS (UltiMate 3000 et LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific) en utilisant un gradient de 120 minutes. Pour cela, ces peptides ont été échantillonnés sur une pré-colonne PepMap C18 300 μm x 5 mm et séparés sur une colonne PepMap C18 75 μm x 150 mm (Thermo Scientific). Les données MS/MS ont été acquises en utilisant Xcalibur (Thermo Scientific). Un distillateur Mascot (Matrix Science) a été utilisé pour produire des fichiers mgf avant identification des peptides et protéines en utilisant Mascot (version 2.3) à travers des recherches dans TAIR (version 10), des bases de données « maison » contenant les contaminants classiques, et les bases de données inverses correspondantes. ESI-TRAP a été choisi comme instrument, trypsine/P comme enzyme, et deux clivages manqués ont été autorisés. Les modifications peptidiques autorisées pendant la recherche étaient : carbamidométhyle (C, fixe) acétyle (protéine N-terminale, variable) et oxydation (M, variable). Les tolérances d'erreur de masse des fragments ont été fixées respectivement à 10 ppm et 0,6 Da. Le logiciel IRMa a été utilisé pour filtrer les résultats : conservation des peptides de rang 1, les peptides avec une identification FDR < 1% (calculé grâce à la stratégie basée sur la base de données inversée) et un minimum d'un peptide spécifique par groupe de protéine identifié. Les résultats triés ont été téléchargés dans une base de données de spectrométrie de masse et hEIDI38 a été utilisé pour

la compilation, le regroupement et la comparaison des groupes de protéines issus des différents échantillons.

ix. Production et purification de GRP7 recombinante

Clonage de GRP7 dans *E. coli*

La séquence codante du gène AtGRP7 (At2g21660) a été amplifiée par PCR à partir d'ADNc d'*A. thaliana* obtenus par RT-PCR, à l'aide des amorces suivantes :
GAGAGACCATGGCGTCCGGTGATGTTGAG (5') et
GAGAGTCGACTTACCATCCTCCACCACCACC (3'). Ces amorces permettent d'introduire les sites uniques de restriction *NcoI* et *SalI*, respectivement, en 5' et 3' de l'ADNc amplifié. Les produits PCR ont été purifiés sur colonne NucleoSpin® (Macherey-Nagel). Les produits PCR ainsi que les plasmides pET28b et pET30b permettant respectivement l'expression avec (6His-GRP7) ou (GRP7) sans étiquette 6 x His de la protéine ont été digérés en parallèle sur la nuit à 37°C avec les enzymes *NcoI*-HF et *SalI*-HF dans le tampon CutSmart® (New England Biolabs). Les produits de digestion ont été purifiés sur gel d'agarose 1 % (m/v) avec le kit NucleoSpin®. La réaction de ligation entre les plasmides et l'insert digéré a été effectuée à 24°C pendant 4 h en présence de l'ADN ligase T4 et de son tampon réactionnel. Des bactéries *E. coli* DH5a ont été transformées avec les produits de ligation. Une sélection des colonies transformées avec des antibiotiques a été réalisée. Après une nuit de culture à 37°C, huit colonies ont été testées par PCR avec des oligonucléotides universels T7 et T7 ter. Plusieurs colonies possédant le plasmide recombinant ont été mises en culture en milieu LB liquide en présence de l'antibiotique adéquat sur une nuit à 37°C. Les plasmides ont été purifiés sur colonne NucleoSpin® (Macherey-Nagel) et séquencés (Eurofins).

Production de GRP7 recombinante dans les bactéries *E. coli* Rosetta 2

Des bactéries compétentes *E. coli* Rosetta 2 ont été transformées avec les plasmides recombinants pET28b-GRP7 et pET30-GRP7 par choc thermique. En bref, les bactéries compétentes ont été mises en présence des deux plasmides indépendamment. Après 30 min dans la glace, le mélange a été incubé 90 secondes à 42°C puis dilué avec du milieu LB. Après 30 min à 37°C sous agitation à 120 rpm, les bactéries ont été étalées sur des boîtes de LB agar contenant les antibiotiques adéquats. Après une nuit à 37°C, les colonies transformées ont été cultivées à 37°C en milieu LB liquide contenant les antibiotiques appropriés jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,6. L'induction de l'expression de la protéine a été déclenchée par ajout

de 0,4 mM d'Isopropyl β -D-1-ThioGalactoPyranoside (IPTG) ou après lavage des bactéries dans un milieu M9 complet contenant du ^{13}C -Glucose et du ^{15}N - NH_4Cl permettant le marquage protéique au ^{13}C et ^{15}N . Après induction, les bactéries ont été cultivées 16 h à 28°C puis récoltées par centrifugation à 4 000 g pendant 20 min.

Extraction protéique avant purification

Après une étape de lavage dans une solution de NaCl 0,9 % (m/v), les culots bactériens ont été resuspendus dans une solution tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, glycérol 10% (v/v), DTT 1 mM avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science) avant une étape de sonication pendant 2 min à 40 % de la puissance maximale à l'aide d'un sonicateur (Branson sonifier 250). Après une centrifugation à 20 000 g pendant 20 min à 4°C, les surnageants contenant les protéines solubles ont été récupérés.

Purification sur colonne de nickel-Sepharose

Dans le cas de la production de 6His-GRP7, une purification sur colonne de nickel-Sepharose (GE Healthcare) a été réalisée selon le protocole du fournisseur. L'extrait protéique est chargé sur la colonne puis les protéines ont été éluées avec des concentrations croissantes d'imidazole (10, 30, 50, 250 mM) dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0,5 M. La fraction contenant la protéine GRP7 purifiée (6His-GRP7), éluée à une concentration en imidazole de 250 mM a ensuite été dessalée sur une colonne de Sephadex G25 (PD-10 GE Healthcare) et finalement concentrée par centrifugation sur unité de filtration Amicon Ultra 4 Millipore 3 K (Merck Millipore).

Production d'anticorps polyclonaux anti-GRP7

Après purification sur colonne de Ni-Sepharose et dessalage, 2 mg de 6His-GRP7 recombinante purifiée ont été séparés des contaminants mineurs résiduels par SDS-PAGE 15 %. La portion de gel contenant la bande correspondante à 6His-GRP7 a été découpée puis la protéine a été électroéluée dans 50 mM de carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Après lyophilisation, l'antigène purifié a été envoyé à la compagnie Covavab (Villeurbanne, France) pour la réalisation du protocole d'immunisation de lapin.

Purification de GRP7 recombinante sans étiquette

La protéine GRP7 sans étiquette a subi une première étape d'enrichissement par précipitation au sulfate d'ammonium. Des pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium croissants (20, 40, 60, 80 %) ont été utilisés. Après 1h d'incubation à 4°C après chaque ajout de sulfate d'ammonium, l'extrait est centrifugé à 20 000 g pendant 30 minutes. La protéine GRP7 recombinante précipite majoritairement entre 40 et 60% de saturation en sulfate d'ammonium, le culot protéique précipité à 60 % de saturation a été dissous dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, glycérol 10 % (v/v), DTT 1 mM. Après dessalage par dialyse sur la nuit contre du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, glycérol 10 % (v/v), GRP7 a été purifiée en deux étapes chromatographiques. Une colonne de Q-Sepharose (2 x 10 cm) a été utilisée en première étape. Sur cette colonne, les protéines ont été éluées à l'aide d'un gradient NaCl linéaire jusqu'à 0,3 M sur 11 volumes de colonne. L'éluion sur la seconde colonne, Superdex 200, a été réalisée avec un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, glycérol 10 % (v/v), NaCl 0,3 M au débit de 1 ml/min.

x. Etude de l'affinité de GRP7 pour l'uranyle

Détermination de la stœchiométrie de liaison de l'uranyle sur GRP7

La protéine GRP7 a été incubée dans un tampon TrisHCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 300 mM pendant 30 min à température ambiante à la concentration de 20 µM en présence de 100 µM de nitrate d'uranyle. Après incubation, le mélange a été déposé sur une colonne G-25 illustra™ MicroSpin™ préalablement équilibrée avec le même tampon. Après 2 min de centrifugation à 735 g, les protéines ont été récupérées, les ions libres restant dans la résine. La quantité de protéines récupérée a été dosée par mesure de l' $A_{280\text{ nm}}$ ainsi que la quantité d'uranium liée par ICP-MS. Un ratio uranium/protéine a été déterminé. Des contrôles sans protéines ont été réalisés en parallèle afin d'en déduire le bruit de fond. Les déterminations ont été réalisées en triplicat.

Mesure des paramètres cinétiques de la liaison par titration de la fluorescence du tryptophane.

La fluorescence du ou des Trp d'une protéine a souvent été utilisée pour démontrer la formation de complexes protéines – métal notamment uranyle et mesurer les constantes de stabilité conditionnelle. Le quenching de la fluorescence des Trp de GRP7 a été suivi par titration d'une solution protéique à 1 µM dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,3 M en présence de 10 µM d'acide di-iminoacétique (IDA) avec différentes concentrations de nitrate d'uranyle

par ajout de 0 à 20 équivalents en protéines par incrément de 0,1 équivalent, pour un volume final de 200 μl . L'utilisation du ligand compétiteur (IDA) permet de contrôler la spéciation du métal et d'éviter la précipitation de formes hydroxylées de l'uranyle. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre BioLogic (MOS-450) connecté à un ordinateur équipé de la version 4.1 du logiciel Bio-Kine32. Les mesures ont été réalisées à 25°C dans une cuve avec un trajet optique de 1 cm. La fluorescence des Trp a été détectée à 350 nm après une excitation à 277 nm. Les fentes d'excitation et d'émission étaient ajustées à 8 nm pour éviter la saturation du signal.

Les constantes de stabilité conditionnelles peuvent être extraites des données spectrales à l'aide du programme SPECIFIT, en tenant compte des constantes de stabilité conditionnelle de l'uranyle avec le compétiteur (IDA) qui sont connues (Starck et al., 2017).

xi. Spectroscopie de Résonance magnétique Nucléaire (RMN structurale liquide)

GRP7 a été analysée par RMN à 100 μM en présence ou non de 500 μM de nitrate d'uranyle. Des expériences de RMN 1D ^1H utilisant un module de suppression du signal de l'eau ainsi que des expériences de HET-SOFAST ont été réalisées sur des spectromètres BRUKER 600, 700 et 850 MHz équipés de cryosondes à triple résonance. L'expérience 1D HET-SOFAST est composée d'un spectre de référence et d'un spectre dit saturé enregistrés sans ou avec pulse inversant sélectivement la région des aliphatiques. Le paramètre λ_{NOE} mesurant la compacité de la molécule est obtenu en calculant le rapport de l'intégrale du spectre saturé et de l'intégrale du spectre de référence en sélectionnant les régions des spectres correspondant aux régions structurées de la protéine entre 8,6 et 9,5 ppm. Ce paramètre λ_{NOE} est compris entre 0 et 1, les valeurs faibles correspondant à des protéines compactes, les valeurs plus élevées correspondant à des conformations dynamiques. Les temps d'acquisition pour les expériences de RMN 1D ^1H , HETSOFAS, DOSY et 2D NOESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ ont été respectivement de 2, 5 – 10, 10 et 6 h. Les données ont été acquises à 25°C, L'exploitation des données a été réalisée à l'aide du logiciel Topspin (BRUKER, Inc).

IV - Conclusion générale et perspectives

Mon projet de thèse a consisté à identifier et caractériser des protéines de transport et de chélation de l'uranium, respectivement, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la plante *Arabidopsis thaliana*. Dans le volet « transport », l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme modèle m'a permis de mettre en évidence et de caractériser un transport « actif » d'uranium puis d'identifier, par le biais d'expériences de compétition, trois voies possibles d'entrée de l'uranium liées aux mécanismes de transport de calcium, de cuivre et de fer dans ce microorganisme.

L'analyse de différents mutants déficients dans le transport des métaux essentiels précédemment cités a révélé que ceux affectés dans les voies d'absorption du Fe^{3+} et du Ca^{2+} sont aussi affectés dans l'absorption d'uranium. Nous avons pu enfin confirmer par complémentation fonctionnelle (expression du gène *MID1* dans le mutant $\Delta mid1$) que le canal MID1/CCH1, transporteur majoritaire de calcium dans la levure contribuait de façon importante au transport de l'uranium dans la levure. Il s'agit là, à notre connaissance, de la première identification d'un transporteur impliqué dans l'import d'uranium dans une cellule vivante, tous règnes confondus. La validation de l'implication de FTR1, transporteur de Fe^{3+} , dans l'import de l'uranium dans la levure est en cours.

Si dans la levure MID1/CCH1 est le seul canal calcique de haute affinité connu, ils sont en revanche nombreux dans la plante avec des affinités et des mécanismes différents. Ils sont classés en trois catégories selon leur dépendance à la polarisation (« voltage-dépendance » : les canaux activés en cas de dépolarisation (DACC), d'hyperpolarisation (HACC), ou indépendante de la polarisation (VICC) (White, 2003)). Parmi ces catégories, il existe six grandes familles, les « Cyclic Nucleotide-Gated Channels » (CNGC), les « ionotropic GLutamate Receptors » (GLR), les « Two-Pore Channels » (TPC), les « MechanoSensitive Like channels » (MSL), les « reduced hyperosmolarity-induced $[\text{Ca}^{2+}]$ increase 1 channels (OSCA1) » et les « Mid1-Complementing Activity channels » (MCA) (Demidchik et al., 2018). Notre attention s'est dirigée vers la famille MCA contenant deux canaux MCA1 et MCA2. En effet, ces transporteurs ont été identifiés par complémentation du double mutant de *S. cerevisiae* *mid1cch1* dans lesquels l'absorption de calcium est fortement réduite (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010). Ils permettent tous les deux de rétablir l'absorption de calcium dans ce mutant. Toutefois, MCA1 et MCA2 sont très différents de MID1 et CCH1 d'un point de vue mécanistique et structural. Un alignement des séquences entre MID1 et MCA1 suggère qu'ils ne sont pas orthologues. Le canal MID1/CCH1 est voltage-dépendant tandis que MCA1 et MCA2 sont mécano-sensibles. De ce fait, si l'entrée d'uranium est déterminée par une

caractéristique propre à un canal voltage-dépendant, MCA1 ou MCA2 ne pourront compléter l'entrée d'uranium même s'ils rétablissent l'entrée de calcium. Les canaux CNGC pourraient représenter de bons candidats pour l'absorption d'uranium puisqu'il sont impliqués dans l'absorption peu spécifiques d'autres métaux divalents comme le Pb^{2+} ou Cd^{2+} en plus du Ca^{2+} dans la plante (Moon et al., 2019). Dans ce cas, la classification de Pearson ne serait pas un aspect déterminant pour la prise en charge par cette famille de transporteurs. En effet, ces canaux seraient capables de transporter indifféremment les acides mous (Cd^{2+}) et durs (Pb^{2+}) comme UO_2^{2+} .

Dans le cas de l'absorption de fer, la plante dispose de deux stratégies, une passant par la réduction du Fe (III) en Fe (II) par une réductase FRO2 (FRE1 – 3 chez la levure). Une autre, uniquement présente chez les monocotylédones, passant par la chélation du Fe (III) par des phytosidérophores, augmentant sa solubilité et permettant son absorption. Il n'existe pas d'homologue fonctionnel de FTR1 chez la plante. C'est le Fe (II) qui est absorbé dans la plante par des transporteurs type IRT1 et NRAMP1. Toutefois, si l'on prend le système de haute affinité pour le fer de la levure FET3/FTR1, c'est bien du Fe (II) qui est pris en charge par l'oxydase FET3 (Askwith et al., 1994). Même si IRT1 et NRAMP1 n'ont aucune homologie structurale ou fonctionnelle avec le complexe FET3/FTR1, ces deux transporteurs sont capables de compléter fonctionnellement des mutants de levures déficients dans leurs transports de haute et basse affinité de fer *Δfet3Δfet4* (Curie et al., 2000; Eckhardt et al., 2001). Une étude récente menée sur IRT1 montre qu'il n'est pas impliqué dans le transport d'uranium dans les conditions utilisées lors de cette étude (Berthet et al., 2018). Nos travaux montrent que dans la levure, l'uranium ne semble pas emprunter le transporteur SMF1 qui est de la famille des NRAMP. De ce fait, NRAMP1 pourrait ne pas être non plus un candidat particulièrement pertinent.

Les voies d'absorption impliquant une étape de chélation du Fe^{3+} à des sidérophores semblent particulièrement pertinentes à étudier car les mécanismes d'absorption des plantes monocotylédones et de la levure semblent proches. Dans la levure, ce sont les transporteurs FIT1 à 3 qui permettent le passage des complexes Fe – sidérophores à travers la paroi puis les transporteurs ARN1 à 4 qui prennent en charge l'entrée du complexe dans le cytoplasme (Heymann et al., 2000; Protchenko et al., 2001). Il y a possibilité de réduction du Fe (III) chélaté par les réductases FRE1 à 3 chez la levure et FRO2 chez la plante. Dans le riz, les complexes Fe – phytosidérophores sont absorbés grâce au transporteur YS1 (Curie et al., 2001; Tseng et al., 2001). De plus, l'uranium est capable de former des complexes avec de nombreux

sidérophores bactériens tels que la desferrioxamine B (Mullen et al., 2007), la pyoverdine (Bouby et al., 1998; Hussien et al., 2013; Rashmi et al., 2013). Si *S. cerevisiae* est incapable de produire des sidérophores, elle est capable d'absorber ceux excrétés par les autres organismes (Philpott and Protchenko, 2008) dont la ferrioxamine B (Froissard et al., 2007). Pour l'étude de ces mécanismes dans la plante, il faudrait changer de modèle végétal pour étudier une monocotylédone comme le riz ou le maïs dans le milieu en présence d'uranium. Il existe également d'autres mécanismes pour faire rentrer le fer comme l'utilisation de dérivés phénoliques comme les coumarines. Les coumarines sont sécrétées par la plante en conditions de carence en fer permettant une meilleure absorption ferrique (Clemens, 2019). Ces transporteurs de complexe fer – composés phénoliques seraient également des candidats à tester pour l'entrée de l'uranium dans la plante.

Dans le cadre du calcium, même s'ils ne sont pas orthologues au système CCH1/MID1 de levure, MCA1 et MCA2 se présentent comme les candidats principaux pour réaliser la complémentation des mutants de levures affectés dans le transport de l'uranium. Quoi qu'il en soit, les mutants de levures affectés dans le transport d'uranium que nous avons identifiés et caractérisés (en particulier $\Delta mid1$ ou $\Delta cch1$) pourront être utilisés comme souches hôtes pour tester, par complémentation fonctionnelle, puis caractériser fonctionnellement, des transporteurs de métaux candidats de plantes potentiellement capables de transporter l'uranium dans la cellule, et ce quel que soit le métal physiologique transporté dans des conditions naturelles par ces transporteurs (approche ciblée). Il pourrait également être intéressant d'exprimer le canal calcique MID1/CCH1 dans des lignées d'*A. thaliana* afin d'étudier la possibilité d'améliorer l'absorption d'uranium par ces plantes.

Quoi qu'il en soit, ces découvertes auront un impact majeur sur les prochaines expériences notamment dans la caractérisation de l'algue verte *Coelastrella sp.*, découverte au laboratoire dans des effluents contaminés par de l'uranium, sur laquelle une étude approfondie débutera prochainement. Les nouvelles connaissances accumulées sur l'entrée d'uranium dans la levure au cours de cette thèse permettront de cibler l'étude sur les transports de fer, calcium et cuivre dans cette algue qui est capable de résister à des concentrations importantes d'uranium.

Concernant le second volet, nous avons développé deux approches métallogénomiques complémentaires visant à isoler des protéines d'*A. thaliana* affines pour l'uranium *in cellulo*, et donc, potentiellement des cibles soit de toxicité soit de tolérance de la plante vis-à-vis de ce métal. Ces deux approches nous ont permis d'atteindre notre objectif de deux façons différentes.

L'une (Stratégie I) privilégiait l'étude la plus exhaustive possible des UBP en préservant de la meilleure façon possible les interactions électrostatiques tandis que la seconde (Stratégie II) privilégiait la sélection et l'identification des protéines avec la meilleure affinité *in vivo* pour l'uranium par élimination des protéines les moins affines.

Au total, 53 UBP candidates ont pu être identifiées grâce à ces deux approches, dont une, GRP7, a été validée *in vitro*. Nous avons montré, en effet, que GRP7 produite dans *E. coli* et purifiée est capable de lier l'uranium *in vitro*. Cependant, la protéine recombinante, contrairement à la forme native n'est pas phosphorylée. Ainsi, il est tout à fait possible que les capacités de liaison à l'uranium ainsi que l'affinité (même si celle-ci n'a pas encore pu être déterminée pour la forme recombinante) de GRP7 *in planta* soient supérieures à celles observées pour la protéine recombinante. Afin de déterminer l'impact de variations de l'expression de GRP7 *in planta* sur la sensibilité ou la tolérance des plantes à un stress uranium et sur le devenir du métal dans les différents compartiments de la plante, des analyses seront réalisées sur des lignées d'*A. thaliana* interrompues dans le gène GRP7 (dont nous disposons) ainsi que sur des lignées surexprimant GRP7 qui seront générées prochainement. Dans ce contexte, l'obtention, dernièrement, d'un anticorps polyclonal spécifique et sensible dirigé contre GRP7 recombinante devrait s'avérer très utile.

L'étude de lignées d'*A. thaliana* modifiées dans l'expression de ces protéines pourraient apporter des connaissances nécessaires à la compréhension des mécanismes cellulaires qui régissent le devenir de l'uranium dans la plante. Dans une étude développée par l'équipe (article en préparation), une UBP végétale, identifiée grâce à l'approche complémentaire sur colonne d'affinité de type IMAC, nommée UBP25, a été caractérisée en détail dans sa fixation à l'uranium. Des lignées d'*A. thaliana* affectées dans l'expression de cette protéine et exposées à un stress uranyle présentent des niveaux altérés d'uranium transloquées dans les feuilles par rapport aux plantes sauvages. Cette analyse montre qu'une UBP peut influencer le devenir de l'uranium dans la plante entière. Il paraît donc logique d'explorer cette même piste dans le cas de GRP7. La fonction de la protéine combinée à l'impact sur la localisation de l'uranium dans la plante pourrait fournir des connaissances primordiales pour la compréhension des mécanismes de toxicité ou de détoxication de l'uranium.

De la même façon, nous retrouvons la ferritine 1 et 3 dans les 53 UBP candidates. La ferritine possède un rôle de stockage cellulaire du fer régulant ainsi l'homéostasie du fer dans la cellule et jouant un rôle important dans la protection contre le stress oxydant (Briat et al., 2010). Les isoformes de la ferritine, identifiées comme cible cellulaire de l'uranium dans le cadre de notre

étude, sont localisés dans le chloroplaste ce qui signifierait que l'uranium serait capable d'entrer dans le chloroplaste. La ferritine pourrait jouer un rôle dans la détoxification de l'uranium en le captant et l'immobilisant. Afin de tester ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier des lignées de plantes affectées dans l'expression de ces isoformes de ferritine (1 et 3) afin d'étudier leur implication dans la tolérance à l'uranium ainsi que dans la localisation de l'uranium dans la plante.

Les analyses structurales par RMN de GRP7 ont montré l'existence d'un domaine structuré et d'une zone désordonnée, la zone riche en glycine. Les expériences DOSY permettant de mesurer la vitesse de diffusion translationnelle de la protéine libre et en présence d'uranium suggèrent que l'ion uranyle induit la dimérisation de GRP7 et semblent indiquer la liaison d'un uranyle à l'interface de deux monomères.

Ces analyses vont être poursuivies et complétées par des expériences 3D triple résonance standards qui devraient permettre de mettre en évidence les acides aminés qui interagissent avec l'uranium et d'étudier de manière détaillée la dynamique moléculaire qui s'opère lorsque la protéine fixe le métal, en particulier au travers de la résolution de la structure tri-dimensionnelle de ces protéines, en présence et en absence d'uranium. Si la structure 3D de la protéine ne peut pas être déterminée par ces expériences, nous pourrions nous appuyer sur un modèle structural de GRP7 que nous avons obtenu par modélisation sur le serveur Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>) en utilisant comme matrice la structure de la protéine SNRNP U1 de *S. cerevisiae* (pdb c5uz5A) (Figure IV-1).

Des expériences de mutagénèse dirigée soutenues par un tel modèle pourraient permettre de tester et valider les sites de liaisons à l'uranium identifiés. Même si la conséquence biologique de la fixation de l'uranium sur GRP7 reste inconnue, cette interaction pourra être exploitée pour le développement d'approches biotechnologiques dans un but de bioremédiation.

L'identification d'un site de fixation de l'uranium pourrait ainsi ouvrir la voie pour l'optimisation de la protéine dans le but d'augmenter son affinité ou sa spécificité pour l'uranium suffisamment pour que la protéine ou des peptides mimétiques dérivés soient utilisables comme biosenseurs ou à des fins de bioremédiation d'eaux contaminées. En effet, la création de sites artificiels d'uranium sur des protéines déjà affines est une piste raisonnable

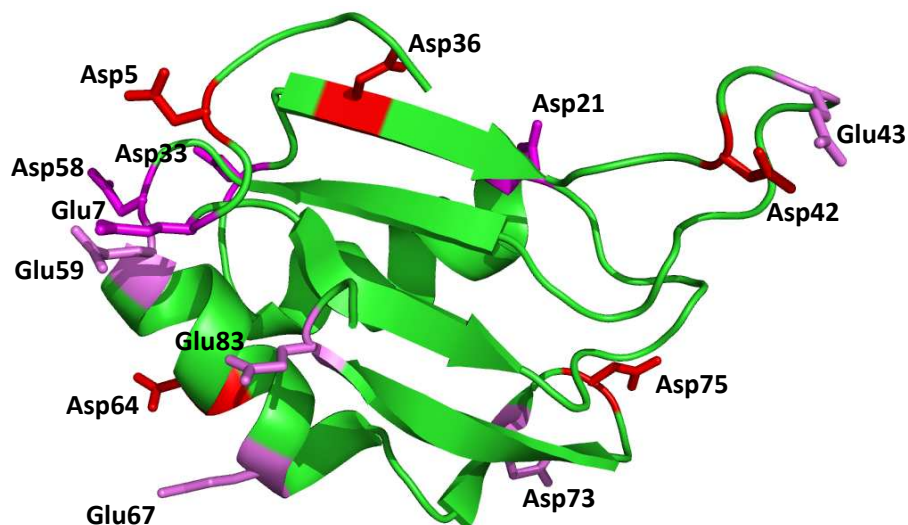


Figure IV-1 : Modèle prédictif de la structure 3D de GRP7 réalisé par le serveur Phyre2.

Ce modèle a été généré en utilisant la structure 3D de la protéine SNRNP U1 de *S. cerevisiae* comme matrice (entrée PDB c5uz5A), avec un indice de confiance de 99.9%. La figure a été produite avec le logiciel PyMOL (DeLano Scientific). Les résidus Asp et Glu conservés chez *A. thaliana* et les protéines RBP d'*Homo sapiens* avec un consensus fort (en rouge), un consensus moyen (en magenta) et ceux conservés dans le règne végétal (en rose) sont indiqués.

pour ce type d'applications. Dans une première étude, l'équipe de He a modifié la protéine NikR, initialement fixatrice de nickel, afin qu'elle puisse fixer l'ion uranyle (Wegner et al., 2009). Dans cette protéine, les deux résidus His 76 et Cys 95 composant le site de fixation naturel du nickel ont été remplacés par un résidu aspartate et une sérine, potentiel résidu donneur de protons pour l'interaction avec un groupe oxo de l'uranyle. Cette modification a permis d'obtenir une protéine NikR modifiée avec un Kd d'environ 53 nM pour l'uranium. Cette protéine a été exprimée à la surface de levures permettant ainsi une meilleure biosorption de l'uranyle (Kuroda et al., 2014). De cette manière, dans un tampon acide à base de citrate, ces levures peuvent être utilisées pour une technique d'adsorption adaptée pour la décontamination des eaux. De plus, ces technologies de bio-engineering permettent de produire des senseurs pour l'uranium permettant de contrôler les concentrations et donc de limiter la pollution. Un peptide mimétique créé et optimisé à partir de la calmoduline pour lier l'uranium, a été utilisé comme biosenseur sélectif pour surveiller la présence d'uranium dans des environnements contaminés (Le Clainche and Vita, 2006; Sauge-Merle et al., 2017). De manière générale, les phosphopeptides mimétiques sont des biomolécules très prometteuses qui devraient être largement développées dans les prochaines années dans un but de bioremédiation (Garai and Delangle, 2020). Récemment, une étude a produit 3 peptides dérivés de NikR reliés à une

électrode en or permettant une détection de l'uranium à partir de 50 nM, plus faible que la concentration maximale en uranium autorisée (126 nM) dans l'eau potable (Weinhold, 2012; Stellato and Lai, 2020). Une autre protéine connue est la « Super Uranyl-binding Protein » (SUP) qui a été produite à l'aide de criblage informatique et possède une affinité pour l'uranium de l'ordre du femtomolaire ($K_d = 7,4 \text{ fM}$) (Zhou et al., 2014). Cette protéine a aussi été utilisée dans un but applicatif en l'immobilisant sur un support solide comme une résine d'amylose. Ce biomatériau permet l'extraction sélective de l'uranium dans l'eau de mer. Plus tard, la protéine a été modifiée afin de créer des microbilles d'hydrogel ou combinée avec d'autres protéines pour former des polymères ou fibres protéiques (Kou et al., 2017; Yang et al., 2018; Yuan et al., 2019). La production de ces polymères, en plus d'augmenter la stabilité de la protéine, permet aussi d'augmenter la capacité d'extraction des ions uranyles.

En conclusion, au cours de cette thèse, deux modèles biologiques ont été étudiés afin de comprendre les mécanismes d'entrée de l'uranium dans la cellule et son interaction *in cellulo* avec des protéines solubles : la levure *S. cerevisiae* et des cellules en culture d'*A. thaliana*. Les résultats que j'ai obtenus à l'aide de ces modèles cellulaires ont permis d'identifier pour la première fois plusieurs voies d'import de l'uranium dans une cellule eucaryote et d'identifier une protéine végétale affine pour l'uranium parmi un certain nombre d'autres UBP candidates. Ces découvertes originales seront très utiles pour orienter les futures recherches sur des plantes entières. Des plantes affectées dans l'expression de GRP7 seront prochainement étudiées et les voies d'absorption du fer et du calcium de la plante sont testées actuellement comme voies potentielles d'entrée de l'uranium dans la plante notamment par l'intermédiaire d'expériences de carences, d'analyses de plantes affectées dans le transport de fer et de calcium, ou encore l'utilisation d'approches génétiques comme l'étude d'association pangénomique (GWAS). La caractérisation de ces protéines (transporteurs et UBP) *in planta* fournira de nouvelles connaissances fondamentales sur le transfert de l'U du sol vers les plantes, sa toxicité chimique et ses modes de détoxification. Ces connaissances sont une condition préalable à une gestion durable de ce radionucléide dans les sols pollués et dans la chaîne alimentaire.

V - Références

- Abdelouas A, Lutze W, Nuttall H.** (1999) Oxidative dissolution of uraninite precipitated on Navajo sandstone. *J Contam Hydrol* **36**: 353–375
- Acharya C, Blindauer CA** (2016) Unexpected Interactions of the Cyanobacterial Metallothionein SmtA with Uranium. *Inorg Chem* **55**: 1505–1515
- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA** (2007) Cold response in *Saccharomyces cerevisiae* : new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 327–341
- Akhtar K, Khalid AM, Akhtar MW, Ghauri MA** (2009) Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. *Bioresour Technol* **100**: 4551–4558
- Ancel L, Niedźwiecka A, Lebrun C, Gateau C, Delangle P** (2013) Rational design of lanthanide binding peptides. *Comptes Rendus Chim* **16**: 515–523
- Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I, Resch CT, Long PE, Dayvault R, Karp K, Marutzky S, Metzler DR, Peacock A, et al** (2003) Stimulating the In Situ Activity of *Geobacter* Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5884–5891
- Anke M, Seeber O, Müller R, Schäfer U, Zerull J** (2009) Uranium transfer in the food chain from soil to plants, animals and man. *Geochemistry* **69**: 75–90
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Aranjuelo I, Doustaly F, Cela J, Porcel R, Müller M, Aroca R, Munné-Bosch S, Bourguignon J** (2014) Glutathione and transpiration as key factors conditioning oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to uranium. *Planta* **239**: 817–830
- Askwith C, Eide D, Ho A Van, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J** (1994) The FET3 Gene of *S. cerevisiae* Encodes a Multicopper Oxidase Required for Ferrous Iron Uptake. *Cell* **76**: 403–410
- ATSDR** (2013) Toxicological profile for uranium.
- Avery S V., Tobin JM** (1992) Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3883–3889
- Ayangbenro A, Babalola O** (2017) A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health* **14**: 94
- Banday AA, Priyamvada S, Farooq N, Yusufi ANK, Khan F** (2008) Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food Chem Toxicol* **46**: 2080–2088

- Bano SA, Ashfaq D** (2013) Role of mycorrhiza to reduce heavy metal stress. *Nat Sci* **05**: 16–20
- Basset C, Averseng O, Ferron P-J, Richaud N, Hagège A, Pible O, Vidaud C** (2013) Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target? *Chem Res Toxicol* **26**: 645–653
- Basset C, Dedieu A, Guérin P, Quéméneur E, Meyer D, Vidaud C** (2008) Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *J Chromatogr A* **1185**: 233–240
- Basu H, Singhal RK, Pimple MV, Saha S** (2018) Graphene oxide encapsulated in alginate beads for enhanced sorption of uranium from different aquatic environments. *J Environ Chem Eng* **6**: 1625–1633
- Batiza AF, Schulz T, Masson PH** (1996) Yeast Respond to Hypotonic Shock with a Calcium Pulse. *J Biol Chem* **271**: 23357–23362
- Baumann N, Arnold T, Haferburg G** (2014) Uranium contents in plants and mushrooms grown on a uranium-contaminated site near Ronneburg in Eastern Thuringia/Germany. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 6921–6929
- Becquerel A** (1896) Sur les radiations émises par les sels d'uranium. *CR. Acad. Sci. Paris*
- Bernhard G, Geipel G, Reich T, Brendler V, Amayri S, Nitsche H** (2001) Uranyl(VI) carbonate complex formation: Validation of the $\text{Ca}^{2+} \text{UO}_2^{2+} (\text{CO}_3^-)_3$ (aq.) species. *Radiochim Acta* **89**: 511–518
- Berthet S, Villiers F, Alban C, Serre NBC, Martin-Laffon J, Figuet S, Boisson AM, Bligny R, Kuntz M, Finazzi G, et al** (2018) Arabidopsis thaliana plants challenged with uranium reveal new insights into iron and phosphate homeostasis. *New Phytol* **217**: 657–670
- Bierkens JGEA** (2000) Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* **153**: 61–72
- Bigalke M, Schwab L, Rehmus A, Tondo P, Flisch M** (2018) Uranium in agricultural soils and drinking water wells on the Swiss Plateau. *Environ Pollut* **233**: 943–951
- Blackwell KJ, Singleton I, Tobin JM** (1995) Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 579–584
- Bleise A, Danesi P., Burkart W** (2003) Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact* **64**: 93–112
- Boles E** (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 85–111
- Bonaccorsi di Patti MC, Felice MR, Camuti AP, Lania A, Musci G** (2000) The essential role of Glu-185 and Tyr-354 residues in the ferroxidase activity of *Saccharomyces cerevisiae* Fet3. *FEBS Lett* **472**: 283–286
- Bouby M, Billard I, MacCordick J, Rossini I** (1998) Complexation of Uranium VI with the Siderophore Pyoverdine. *Radiochim Acta* **80**: 95–100
- Bourgeois D, Burt-Pichat B, Le Goff X, Garrevoet J, Tack P, Falkenberg G, Van Hoorebeke L, Vincze L, Denecke MA, Meyer D, et al** (2015) Micro-distribution of uranium in bone after contamination: new insight into its mechanism of accumulation into bone tissue. *Anal Bioanal Chem* **407**: 6619–6625
- Boutry M, Foury F, Goffeau A** (1977) Energy-dependent uptake of calcium by the yeast *Schizosaccharomyces*

pombe. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **464**: 602–612

Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann Bot* **105**: 811–822

Briat JF (1996) Roles of ferritin in plants. *J Plant Nutr* **19**: 1331–1342

Brongniart A (1854) *Traité des Arts Céramiques ou des poteries*.

Brulfert F, Safi S, Jeanson A, Foerstendorf H, Weiss S, Berthomieu C, Sauge-Merle S, Simoni É (2017) Enzymatic activity of the CaM-PDE1 system upon addition of actinyl ions. *J Inorg Biochem* **172**: 46–54

Brulfert F, Safi S, Jeanson A, Martinez-Baez E, Roques J, Berthomieu C, Solari P-L, Sauge-Merle S, Simoni É (2016) Structural Environment and Stability of the Complexes Formed Between Calmodulin and Actinyl Ions. *Inorg Chem* **55**: 2728–2736

Bryan ND, Abrahamsen L, Evans N, Warwick P, Buckau G, Weng L, Van Riemsdijk WH (2012) The effects of humic substances on the transport of radionuclides: Recent improvements in the prediction of behaviour and the understanding of mechanisms. *Appl Geochemistry* **27**: 378–389

Bucher G, Frelon S, Simon O, Lobinski R, Mounicou S (2014) Development of non-denaturing off-gel isoelectric focusing for the separation of uranium–protein complexes in fish. *Anal Bioanal Chem* **406**: 3517–3520

Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C (2010) High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **22**: 904–917

Cao S, Jiang L, Song S, Jing R, Xu G (2006) AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in arabidopsis. *Cell Mol Biol Lett* **11**: 526–535

Capdevila M, Atrian S (2011) Metallothionein protein evolution: A miniassay. *J Biol Inorg Chem* **16**: 977–989

Carugo O (2018) Structural features of uranium-protein complexes. *J Inorg Biochem* **189**: 1–6

Çevirim-Papaioannou N, Yalçıntaş E, Gaona X, Dardenne K, Altmaier M, Geckeis H (2018) Redox chemistry of uranium in reducing, dilute to concentrated NaCl solutions. *Appl Geochemistry* **98**: 286–300

Chandrajith R, Seneviratna S, Wickramaarachchi K, Attanayake T, Aturaliya TNC, Dissanayake CB (2010) Natural radionuclides and trace elements in rice field soils in relation to fertilizer application: study of a chronic kidney disease area in Sri Lanka. *Environ Earth Sci* **60**: 193–201

Chatterjee M, Sarkar S, Debnath S, Mukherjee A, Chakrabarti A, Bhattacharyya S (2013) Genotypic difference in temporal variation of arsenic accumulation and expression of silicon efflux transporter (*LSi 2*) gene in the field grown rice. *Indian J Genet Plant Breed* **73**: 94

Chen B, Roos P, Zhu Y-G, Jakobsen I (2008) Arbuscular mycorrhizas contribute to phytostabilization of

- uranium in uranium mining tailings. *J Environ Radioact* **99**: 801–810
- Chen C, Hu J, Wang J** (2020a) Biosorption of uranium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *J Environ Radioact* **213**: 106158
- Chen L, Long C, Wang D, Yang J** (2020b) Phytoremediation of cadmium (Cd) and uranium (U) contaminated soils by *Brassica juncea* L. enhanced with exogenous application of plant growth regulators. *Chemosphere* **242**: 125112
- Chen X-Z, Peng J-B, Cohen A, Nelson H, Nelson N, Hediger MA** (1999) Yeast SMF1 Mediates H-coupled Iron Uptake with Concomitant Uncoupled Cation Currents* Downloaded from. *J Biol Chem* **274**: 35089–35094
- Choudhary S, Sar P** (2015) Interaction of uranium (VI) with bacteria: potential applications in bioremediation of U contaminated oxic environments. *Rev Environ Sci Bio/Technology* **14**: 347–355
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R** (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* **90**: 856–867
- Cisnetti F, Gateau C, Lebrun C, Delangle P** (2009) Lanthanide(III) Complexes with Two Hexapeptides Incorporating Unnatural Chelating Amino Acids: Secondary Structure and Stability. *Chem - A Eur J* **15**: 7456–7469
- Le Clainche L, Vita C** (2006) Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide. *Environ Chem Lett* **4**: 45–49
- Clemens S** (2019) Metal ligands in micronutrient acquisition and homeostasis. *Plant Cell Environ* **42**: 2902–2912
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N** (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci* **18**: 92–99
- Cobbett C** (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 211–216
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159–182
- Cohen A, Nelson H, Nelson N** (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* **275**: 33388–33394
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C** (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 3678–3688
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot M Lou** (2002) Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347–1357
- Cothorn RC, Lappenbusch WL** (1983) Occurrence of Uranium in Drinking Water in the U.S. *Health Phys* **45**: 89–99
- Courchesne WE, Vlasek C, Klukovich R, Coffee S** (2011) Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1

- transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **193**: 323–334
- Coyte RM, Jain RC, Srivastava SK, Sharma KC, Khalil A, Ma L, Vengosh A** (2018) Large-Scale Uranium Contamination of Groundwater Resources in India. *Environ Sci Technol Lett* **5**: 341–347
- Creff G, Zurita C, Jeanson A, Carle G, Vidaud C, Den Auwer C** (2019) What do we know about actinides-proteins interactions? *Radiochim Acta* **107**: 993–1009
- Cumberland SA, Douglas G, Grice K, Moreau JW** (2016) Uranium mobility in organic matter-rich sediments: A review of geological and geochemical processes. *Earth-Science Rev* **159**: 160–185
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat J-F** (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* **347**: 749
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat J-F, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346–349
- Cvetkovic A, Menon AL, Thorgersen MP, Scott JW, Poole FL, Jenney FE, Lancaster WA, Praissman JL, Shanmukh S, Vaccaro BJ, et al** (2010) Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* **466**: 779–782
- Cyert MS, Philpott CC** (2013) Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 677–713
- Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch AG, Barriocanall JG** (1990) Genetic Evidence that Ferric Reductase Is Required for Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Downloaded from. *Mol Cell Biol* **10**: 2294–2301
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD** (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393–402
- Davis JA, Meece DE, Kohler M, Curtis GP** (2004) Approaches to surface complexation modeling of Uranium(VI) adsorption on aquifer sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **68**: 3621–3641
- Dedieu A, Bérenguer F, Basset C, Prat O, Quéméneur E, Pible O, Vidaud C** (2009) Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1216**: 5365–5376
- Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I** (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytol* **220**: 49–69
- Ding D-X, Liu X-T, Hu N, Li G-Y, Wang Y-D** (2012) Removal and recovery of uranium from aqueous solution by tea waste. *J Radioanal Nucl Chem* **293**: 735–741
- Dittrich TM, Reimus PW** (2015) Uranium transport in a crushed granodiorite: Experiments and reactive transport modeling. *J Contam Hydrol* **175–176**: 44–59
- Dix D, Bridgham J, Broderius M, Eide D** (1997) Characterization of the FET4 protein of yeast: Evidence for a

- direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* **272**: 11770–11777
- DK G, F T** (2016) Moderate Uranium Disturbs the Nutritional Status and Induces Oxidative Stress in *Pisum sativum* L. *J Plant Physiol Pathol*. doi: 10.4172/2329-955X.1000142
- Domingo JL** (2001) Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol* **15**: 603–609
- Doustaly F, Combes F, Fiévet JB, Berthet S, Hugouvieux V, Bastien O, Aranjuelo I, Leonhardt N, Rivasseau C, Carrière M, et al** (2014) Uranium perturbs signaling and iron uptake response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Metallomics* **6**: 809–821
- Duff MC, Hunter DB, Bertsch PM, Amrhein C** (1999) Factors influencing uranium reduction and solubility in evaporation pond sediments. *Biogeochemistry* **45**: 95–114
- Duraković A** (2001) On depleted uranium: gulf war and Balkan syndrome. *Croat Med J* **42**: 130–4
- Eapen S, Suseelan K., Tivarekar S, Kotwal S., Mitra R** (2003) Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ Res* **91**: 127–133
- Eb-Levadoux Y, Frelon S, Simon O, Arnaudguilhem C, Lobinski R, Mounicou S** (2017) In vivo identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure. *Metallomics* **9**: 525–534
- Ebbs SD, Brady DJ, Kochian L V.** (1998) Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J Exp Bot* **49**: 1183–1190
- Eckhardt U, Mas Marques A, Buckhout TJ** (2001) Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol Biol* **45**: 437–448
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot M Lou** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 5624–5628
- Eide DJ** (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **18**: 441–469
- Ervanne H** (2004) Uranium oxidation states in allanite, fergusonite and monazite of pegmatites from Finland. *Neues Jahrb für Mineral - Monatshefte* **2004**: 289–301
- Faghihian H, Peyvandi S** (2012) Adsorption isotherm for uranyl biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *J Radioanal Nucl Chem* **293**: 463–468
- Fan SK, Fang XZ, Guan MY, Ye YQ, Lin XY, Du ST, Jin CW** (2014) Exogenous abscisic acid application decreases cadmium accumulation in *Arabidopsis* plants, which is associated with the inhibition of IRT1-mediated cadmium uptake. *Front Plant Sci* **5**: 1–8
- Favas PJC, Pratas J, Mitra S, Sarkar SK, Venkatachalam P** (2016) Biogeochemistry of uranium in the soil-plant and water-plant systems in an old uranium mine. *Sci Total Environ* **568**: 350–368

- Fischer M, Schnell N, Chattaway J, Davies P, Dixon G, Sanders D** (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett* **419**: 259–262
- Fortin C, Dutel L, Garnier-Laplace J** (2004) Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environ Toxicol Chem* **23**: 974
- Fowle DA, Fein JB, Martin AM** (2000) Experimental Study of Uranyl Adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environ Sci Technol* **34**: 3737–3741
- Fox PM, Davis JA, Zachara JM** (2006) The effect of calcium on aqueous uranium(VI) speciation and adsorption to ferrihydrite and quartz. *Geochim Cosmochim Acta* **70**: 1379–1387
- Francis AJ, Dodge CJ, Gillow JB, Papenguth HW** (2000) Biotransformation of Uranium Compounds in High Ionic Strength Brine by a Halophilic Bacterium under Denitrifying Conditions. *Environ Sci Technol* **34**: 2311–2317
- Frankel RB** (2003) Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Rev Mineral Geochemistry* **54**: 95–114
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ, Lim RP** (2000) pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat Toxicol* **48**: 275–289
- Frelon S, Guipaud O, Mounicou S, Lobinski R, Delissen O, Paquet F** (2009) In vivo screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney. *Radiochim Acta* **97**: 367–373
- Froissard M, Belgareh-touzé N, Dias M, Buisson N, Camadro JM, Haguenaer-tsapis R, Lesuisse E** (2007) Trafficking of siderophore transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and intracellular fate of ferrioxamine B conjugates. *Traffic* **8**: 1601–1616
- Fu ZQ, Guo M, Jeong B, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR** (2007) A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**: 284–288
- Fukao Y, Ferjani A, Fujiwara M, Nishimori Y, Ohtsu I** (2009) Identification of zinc-responsive proteins in the roots of *Arabidopsis thaliana* using a highly improved method of two-dimensional electrophoresis. *Plant Cell Physiol* **50**: 2234–2239
- Gadd GM, Fomina M** (2011) Uranium and Fungi. *Geomicrobiol J* **28**: 471–482
- Garai A, Delangle P** (2020) Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides. *J Inorg Biochem* **203**: 110936
- Gardarin A, Chédin S, Lagniel G, Aude J-C, Godat E, Catty P, Labarre J** (2010) Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Mol Microbiol* **76**: 1034–1048
- Gianazza E, Celentano F, Magenes S, Etori C, Righetti PG** (1989) Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes. *Electrophoresis* **10**: 806–808
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909–930

- Gok C, Aytas S** (2009) Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution using calcium alginate beads. *J Hazard Mater* **168**: 369–375
- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM** (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research *. *Biochemistry* **5**: 467–477
- Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L** (1987) Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* **8**: 122–124
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH** (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 439–443
- Gupta DK, Chatterjee S, Datta S, Veer V, Walther C** (2014) Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere* **108**: 134–144
- Gupta M, Mahur AK, Varshney R, Sonkawade RG, Verma KD, Prasad R** (2013) Measurement of natural radioactivity and radon exhalation rate in fly ash samples from a thermal power plant and estimation of radiation doses. *Radiat Meas* **50**: 160–165
- Hagège A, Huynh TNS, Hébrant M** (2015) Separative techniques for metalloproteomics require balance between separation and perturbation. *TrAC - Trends Anal Chem* **64**: 64–74
- Hahn O, Strassmann F** (1938) Über die Entstehung von Radiumisotopen aus Uran durch Bestrahlen mit schnellen und verlangsamten Neutronen. *NW*
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1–11
- Hartley-Whitaker J, Woods C, Meharg AA** (2002) Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New Phytol* **155**: 219–225
- Hartsock WJ, Cohen JD, Segal DJ** (2007) Uranyl Acetate as a Direct Inhibitor of DNA-Binding Proteins. *Chem Res Toxicol* **20**: 784–789
- Haslbeck M** (2002) Cellular and Molecular Life Sciences sHsps and their role in the chaperone network. *C Cell Mol Life Sci* **59**: 1649–1657
- Hassett RF, Romeo AM, Kosman DJ** (1998) Regulation of High Affinity Iron Uptake in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **273**: 7628–7636
- El Hayek E, Torres C, Rodriguez-Freire L, Blake JM, De Vore CL, Brearley AJ, Spilde MN, Cabaniss S, Ali A-MS, Cerrato JM** (2018) Effect of Calcium on the Bioavailability of Dissolved Uranium(VI) in Plant Roots under Circumneutral pH. *Environ Sci Technol* **52**: 13089–13098
- He W-M, Lin Y-W, Yu D-H** (2020) Uranyl photocatalysis: precisely controlled oxidation of sulfides with ground-state oxygen. *Sci China Chem* **63**: 291–293
- Hémadi M, Ha-Duong N-T, El Hage Chahine J-M** (2011) Can Uranium Be Transported by the Iron-Acquisition

- Pathway? Ur Uptake by Transferrin. *J Phys Chem B* **115**: 4206–4215
- Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G** (2000) Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 221–227
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H** (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139–146
- Hoarau M, Koebke KJ, Chen Z, Marsh ENG** (2019) Probing Metal Ion Discrimination in a Protein Designed to Bind Uranyl Cation With Femtomolar Affinity. *Front Mol Biosci* **6**: 1–7
- Hong M-P, Vu K, Bautos JM, Tham R, Jamklang M, Uhrig JP, Gelli A** (2013) Activity of the Calcium Channel Pore Cch1 Is Dependent on a Modulatory Region of the Subunit Mid1 in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **12**: 142–150
- Horemans N, Van Hees M, Van Hoeck A, Saenen E, De Meutter T, Nauts R, Blust R, Vandenhove H** (2015) Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in *Lemna minor* L. *Plant Biol* **17**: 91–100
- Horikoshi T, Nakajima A, Sakaguchi T** (1979) Uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agric Biol Chem* **43**: 617–623
- Van Horn J, Huang H** (2006) Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coord Chem Rev* **250**: 765–775
- Hossain MA, Piyatida P, Teixeira Da Silva JA, Fujita M** (2012) Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J Bot* **2012**: 37
- Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P** (2005) Enriched But Not Depleted Uranium Affects Central Nervous System In Long-Term Exposed Rat. *Neurotoxicology* **26**: 1015–1020
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-Sensitive, *cad1* Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059–1066
- Hu N, Zhang H, Ding D, Tan Y, Li G** (2020) Influence of Uranium Speciation on Plant Uptake. pp 181–191
- Huang JW, Blaylock MJ, Kapulnik Y, Ensley BD** (1998) Phytoremediation of Uranium-Contaminated Soils: Role of Organic Acids in Triggering Uranium Hyperaccumulation in Plants. *Environ Sci Technol* **32**: 2004–2008
- Hussien SS, Desouky OA, Abdel-Haliem MEF, El-Mougith AA** (2013) Uranium (VI) Complexation with Siderophores-pyoverdine Produced by *Pseudomonas Fluorescens* SHA 281. *Int J Nucl Energy Sci Eng* **3**: 95
- Hüttner S, Veit C, Schoberer J, Grass J, Strasser R** (2012) Unraveling the function of *Arabidopsis thaliana* OS9 in the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *Plant Mol Biol* **79**: 21–33

- Huynh T-NS, Bourgeois D, Basset C, Vidaud C, Hagège A** (2015) Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions. *Electrophoresis* **36**: 1374–1382
- Huynh T-NS, Vidaud C, Hagège A** (2016) Investigation of uranium interactions with calcium phosphate-binding proteins using ICP/MS and CE-ICP/MS. *Metallomics* **8**: 1185–1192
- Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura, And MS, Anraku1' Y** (1994) MID1, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Gene Encoding a Plasma Membrane Protein, Is Required for Ca²⁺ Influx and Mating. *Mol Cell Biol* **14**: 8259–8271
- Iida K, Tada T, Iida H** (2004) Molecular cloning in yeast by in vivo homologous recombination of the yeast putative $\alpha 1$ subunit of the voltage-gated calcium channel. *FEBS Lett* **576**: 291–296
- Iida K, Teng J, Tada T, Saka A, Tamai M, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Iida H** (2007) Essential, Completely Conserved Glycine Residue in the Domain III S2–S3 Linker of Voltage-gated Calcium Channel $\alpha 1$ Subunits in Yeast and Mammals. *J Biol Chem* **282**: 25659–25667
- Isayenkov S V., Maathuis FJM** (2008) The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Lett* **582**: 1625–1628
- Istok JD, Senko JM, Krumholz LR, Watson D, Bogle MA, Peacock A, Chang Y-J, White DC** (2004) In Situ Bioreduction of Technetium and Uranium in a Nitrate-Contaminated Aquifer. *Environ Sci Technol* **38**: 468–475
- Jentschke G, Godbold DL** (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol Plant* **109**: 107–116
- Jeong BC, Hawes C, Bonthron KM, Macaskie LE** (1997) Localization of enzymically enhanced heavy metal accumulation by *Citrobacter* sp. and metal accumulation in vitro by liposomes containing entrapped enzyme. *Microbiology* **143**: 2497–2507
- Jiang GCT, Aschner M** (2006) Neurotoxicity of Depleted Uranium: Reasons for Increased Concern. *Biol Trace Elem Res* **110**: 1–18
- Kamiya T, Tanaka M, Mitani N, Ma JF, Maeshima M, Fujiwara T** (2009) NIP1;1, an Aquaporin Homolog, Determines the Arsenite Sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **284**: 2114–2120
- Kathren RL, Burklin RK** (2008) Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys* **94**: 170–179
- Keilin D** (1936) The action of sodium azide on cellular respiration and on some catalytic oxidation reactions. *Proc R Soc London Ser B - Biol Sci* **121**: 165–173
- Khan E, Gupta M** (2018) Arsenic–silicon priming of rice (*Oryza sativa* L.) seeds influence mineral nutrient uptake and biochemical responses through modulation of Lsi-1, Lsi-2, Lsi-6 and nutrient transporter genes. *Sci Rep* **8**: 10301
- Khani MH, Keshtkar AR, Meysami B, Zarea MF, Jalali R** (2006) Biosorption of uranium from aqueous solutions by nonliving biomass of marine algae *Cystoseria indica*. *Electron J Biotechnol* **9**: 100–106

- Khare D, Kumar R, Acharya C** (2020) Genomic and functional insights into the adaptation and survival of *Chryseobacterium* sp. strain PMSZPI in uranium enriched environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **191**: 110217
- Kim JS, Jung HJ, Lee HJ, Kim KA, Goh CH, Woo Y, Oh SH, Han YS, Kang H** (2008) Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**: 455–466
- Kim JY, Kim WY, Kwak KJ, Oh SH, Han YS, Kang H** (2010) Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *J Exp Bot* **61**: 2317–2325
- Kitano Y, Oomori T** (1971) The coprecipitation of uranium with calcium carbonate. *J Oceanogr Soc Japan* **27**: 34–42
- Klaproth M** (1789) Chemische untersuchung des uranits, einer neuentdeckten metallische substanz. *Chem Ann Freunde Naturl* **2**: 387–403
- Knight SAB, Labbe S, Kwon LF, Kosman DJ, Thiele DJ** (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* **10**: 1917–1929
- Konietschke F, Placzek M, Schaarschmidt F, Hothorn LA** (2015) nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals. *J Stat Softw* **64**: 1–17
- Kou S, Yang Z, Sun F** (2017) Protein Hydrogel Microbeads for Selective Uranium Mining from Seawater. *ACS Appl Mater Interfaces* **9**: 2035–2039
- Kruckeberg AL** (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **166**: 283–292
- Kuo CL, Campbell JL** (1983) Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication genes: isolation of the CDC8 gene and two genes that compensate for the cdc8-1 mutation. *Mol Cell Biol* **3**: 1730–1737
- Kuroda K, Ebisutani K, Iida K, Nishitani T, Ueda M** (2014) Enhanced adsorption and recovery of uranyl ions by NikR mutant-displaying yeast. *Biomolecules* **4**: 390–401
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A** (2006) Kidney Toxicity of Ingested Uranium From Drinking Water. *Am J Kidney Dis* **47**: 972–982
- Kushnir S** (1995) Molecular Characterization of a Putative *Arabidopsis thaliana* Copper Transporter and Its Yeast Homologue. *J Biol Chem* **270**: 28479–28486
- Kwak KJ, Park SJ, Han JH, Kim MK, Oh SH, Han YS, Kang H** (2011) Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *J Exp Bot* **62**: 4003–4011
- Kyung JK, Yeon OK, Kang H** (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J Exp Bot* **56**: 3007–3016

- Laliberté J, Labbé S** (2008) Les bases moléculaires de l'approvisionnement en cuivre. *médecine/sciences* **24**: 277–283
- Laporte FA, Lebrun C, Vidaud C, Delangle P** (2019) Phosphate-Rich Biomimetic Peptides Shed Light on High-Affinity Hyperphosphorylated Uranyl Binding Sites in Phosphoproteins. *Chem – A Eur J* **25**: 8570–8578
- Laroche L, Henner P, Camilleri V, Morello M, Garnier-Laplace J** (2005) Root uptake of uranium by a higher plant model (*Phaseolus vulgaris*) - bioavailability from soil solution. *Radioprotection* **40**: S33–S39
- Laurette J, Larue C, Llorens I, Jaillard D, Jouneau PH, Bourguignon J, Carrière M** (2012a) Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: A XAS and TEM study. *Environ Exp Bot* **77**: 87–95
- Laurette J, Larue C, Mariet C, Brisset F, Khodja H, Bourguignon J, Carrière M** (2012b) Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: Oilseed rape, sunflower and wheat. *Environ Exp Bot* **77**: 96–107
- Lauria DC, Ribeiro FCA, Conti CC, Loureiro FA** (2009) Radium and uranium levels in vegetables grown using different farming management systems. *J Environ Radioact* **100**: 176–183
- Le Lay P, Isaure M-P, Sarry J-E, Kuhn L, Fayard B, Le Bail J-L, Bastien O, Garin J, Roby C, Bourguignon J** (2006) Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie* **88**: 1533–1547
- Lebrun C, Starck M, Gathu V, Chenavier Y, Delangle P** (2014) Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding. *Chem - A Eur J* **20**: 16566–16573
- Lee M, Yang M** (2010) Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *J Hazard Mater* **173**: 589–596
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N** (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol Biochem* **48**: 673–682
- Li L, Kaplan J** (1998) Defects in the Yeast High Affinity Iron Transport System Result in Increased Metal Sensitivity because of the Increased Expression of Transporters with a Broad Transition Metal Specificity. *J Biol Chem* **273**: 22181–22187
- Li P-F, Mao Z-Y, Rao X-J, Wang X-M, Min M-Z, Qiu L-W, Liu Z-L** (2004) Biosorption of uranium by lake-harvested biomass from a cyanobacterium bloom. *Bioresour Technol* **94**: 193–195
- Lin Y-W** (2020) Uranyl Binding to Proteins and Structural-Functional Impacts. *Biomolecules* **10**: 457
- Lin Y, Wu H, Smart N, Wai C.** (1998) Investigation of adducts of lanthanide and uranium β -diketonates with organophosphorus Lewis bases by supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* **793**: 107–113
- Liu F, Du K-J, Fang Z, You Y, Wen G-B, Lin Y-W** (2015a) Chemical and biological insights into uranium-induced apoptosis of rat hepatic cell line. *Radiat Environ Biophys* **54**: 207–216

- Liu H, Fang HHP** (2002) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol Bioeng* **80**: 806–811
- Liu H, Zhao H, Wu L, Liu A, Zhao F-J, Xu W** (2017) Heavy metal ATPase 3 (HMA3) confers cadmium hypertolerance on the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *New Phytol* **215**: 687–698
- Liu J, Shi X, Qian M, Zheng L, Lian C, Xia Y, Shen Z** (2015b) Copper-induced hydrogen peroxide upregulation of a metallothionein gene, *OsMT2c*, from *Oryza sativa* L. confers copper tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Hazard Mater* **294**: 99–108
- Liu M, Dong F, Yan X, Zeng W, Hou L, Pang X** (2010) Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions. *Bioresour Technol* **101**: 8573–8580
- Liu Q, Luo L, Zheng L** (2018) Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *Int J Mol Sci* **19**: 335
- Liu R, Ma W, Jia C, Wang L, Li H-Y** (2007) Effect of pH on biosorption of boron onto cotton cellulose. *Desalination* **207**: 257–267
- Llobet J, Sirvent J, Ortega A, Domingo J** (1991) Influence of Chronic Exposure to Uranium on Male Reproduction in Mice. *Toxicol Sci* **16**: 821–829
- Lloyd JR, Leang C, Myerson ALH, Coppi M V., Cuifo S, Methe B, Sandler SJ, Lovley DR** (2003) Biochemical and genetic characterization of *PpcA*, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* **369**: 153–161
- Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y, Cunningham KW** (2000) A Homolog of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels Stimulated by Depletion of Secretory Ca²⁺ in Yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 6686–6694
- Lovley DR, Phillips EJP** (1992) Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 850–856
- Lu X, Zhou X, Wang T** (2013) Mechanism of uranium(VI) uptake by *Saccharomyces cerevisiae* under environmentally relevant conditions: Batch, HRTEM, and FTIR studies. *J Hazard Mater* **262**: 297–303
- Luche S, Diemer H, Tastet C, Chevallet M, Van Dorselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T** (2004) About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **4**: 551–561
- Macaskie L, Empson R, Cheetham A, Grey C, Skarnulis A** (1992) Uranium bioaccumulation by a *Citrobacter* sp. as a result of enzymically mediated growth of polycrystalline H₂UO₂PO₄. *Science* (80-) **257**: 782–784
- Macaskie LE, Bonthron KM, Yong P, Goddard DT** (2000) Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology* **146**: 1855–1867
- MacDiarmid CW** (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 2845–2855

- Madic C, Genet M** (2001) L'uranium : de l'environnement à l'Homme.
- Malaviya P, Singh A** (2012) Phytoremediation Strategies for Remediation of Uranium-Contaminated Environments: A Review. *Crit Rev Environ Sci Technol* **42**: 2575–2647
- Malik A** (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int* **30**: 261–278
- Manara A** (2012) Plants and Heavy Metals. *Signal Transduct.*
- Manikandan N, Siva Prasath CS, Prakash S** (2011) Biosorption of uranium and thorium by Marine micro algae. *Indian J Mar Sci* **40**: 121–124
- Markotić A** (2002) Balkan syndrome. *Lancet* **359**: 166
- Martinez RJ, Beazley MJ, Taillefert M, Arakaki AK, Skolnick J, Sobecky PA** (2007) Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Environ Microbiol* **9**: 3122–3133
- Matsumoto TK, Ellmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM** (2002) An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 33075–33080
- Maynard E, WL D, Hodge H** (1953) Oral toxicity of uranium compounds. *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*. New York, McGraw-Hill, USA
- Mehta VS, Maillot F, Wang Z, Catalano JG, Giammar DE** (2016) Effect of Reaction Pathway on the Extent and Mechanism of Uranium(VI) Immobilization with Calcium and Phosphate. *Environ Sci Technol* **50**: 3128–3136
- Meng JG, Zhang XD, Tan SK, Zhao KX, Yang ZM** (2017) Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP 1 mediated by miR167 in *Brassica napus*. *BioMetals* **30**: 917–931
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, Whittaker T, Xu J, Ejniak JW, Hamilton MM, Parlette E, John TS, Gerstenberg HM, et al** (1998) Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* **106**: 465–471
- Minkin VI** (1999) Glossary of terms used in theoretical organic chemistry. *Pure Appl Chem* **71**: 1919–1981
- Misson J, Henner P, Morello M, Floriani M, Wu T-D, Guerquin-Kern J-L, Février L** (2009) Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environ Exp Bot* **67**: 353–362
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490–498
- Mondani L, Benzerara K, Carrière M, Christen R, Mamindy-Pajany Y, Février L, Marmier N, Achouak W, Nardoux P, Berthomieu C, et al** (2011) Influence of Uranium on Bacterial Communities: A

Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. *PLoS One* **6**: e25771

- Monleau M, Bussy C, Lestaevél P, Houpert P, Paquet F, Chazel V** (2005) Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett* **390**: 31–36
- Montavon G, Apostolidis C, Bruchertseifer F, Repinc U, Morgenstern A** (2009) 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
- Moon J, Belloeil C, Ianna M, Shin R** (2019) Arabidopsis CNGC Family Members Contribute to Heavy Metal Ion Uptake in Plants. *Int J Mol Sci* **20**: 413
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P** (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 894–904
- Mosa KA, Saadoun I, Kumar K, Helmy M, Dhankher OP** (2016) Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Front Plant Sci* **7**: 1–14
- Mountney G, WA G** (1988) *Practical Food Microbiology and Technology*. AVI Books, Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA
- Muchhal US, Pardot JM, Raghothama KG** (1996) Phosphate transporters from the higher plant Arabidopsis thaliana (ion uptake/yeast complementation). *Plant Biol* **93**: 10519–10523
- Mullen L, Gong C, Czerwinski K** (2007) Complexation of uranium (VI) with the siderophore desferrioxamine B. *J Radioanal Nucl Chem* **273**: 683–688
- Müller J, Toev T, Heisters M, Teller J, Moore KL, Hause G, Dinesh DC, Bürstenbinder K, Abel S** (2015) Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Dev Cell* **33**: 216–230
- Munasinghe PS, Elwood Madden ME, Brooks SC, Elwood Madden AS** (2015) Dynamic interplay between uranyl phosphate precipitation, sorption, and phase evolution. *Appl Geochemistry* **58**: 147–160
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, et al** (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 3639–3644
- Nakajima A, Tsuruta T** (2002) Competitive Biosorption of Thorium and Uranium by Actinomycetes. *J Nucl Sci Technol* **39**: 528–531
- Nakashima H, Nishikawa K** (1994) Discrimination of Intracellular and Extracellular Proteins Using Amino Acid Composition and Residue-pair Frequencies. *J Mol Biol* **238**: 54–61
- Nevin KP, Lovley DR** (2000) Potential for Nonenzymatic Reduction of Fe(III) via Electron Shuttling in Subsurface Sediments. *Environ Sci Technol* **34**: 2472–2478
- Niedźwiecka A, Cisnetti F, Lebrun C, Delangle P** (2012) Femtomolar Ln(III) Affinity in Peptide-Based Ligands

Containing Unnatural Chelating Amino Acids. *Inorg Chem* **51**: 5458–5464

Nielsen PE, Møllegaard NE, Jeppesen C (1990) DNA Conformational analysis in solution by uranyl mediated photocleavage. *Nucleic Acids Res* **18**: 3847–3851

Nongkhlaw M, Joshi SR (2019) Molecular insight into the expression of metal transporter genes in *Chryseobacterium* sp. PMSZPI isolated from uranium deposit. *PLoS One* **14**: e0216995

Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH (2014) Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* **6**: 1068–1078

Ohnuki T, Ozaki T, Yoshida T, Sakamoto F, Kozai N, Wakai E, Francis AJ, Iefuji H (2005) Mechanisms of uranium mineralization by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 5307–5316

Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, Klausner RD (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J* **15**: 3515–3523

Paidhungat M, Garrett S (1997) A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol Cell Biol* **17**: 6339–6347

Palma JM, Sevilla F, Jiménez A, del Río LA, Corpas FJ, Álvarez de Morales P, Camejo DM (2015) Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. *Ann Bot* **116**: 627–636

Panda BB, Panda KK, Patra J, Sahu GK, Mitra RK (2001) Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of uranyl nitrate in *Allium* assay system. *Indian J Exp Biol* **39**: 57–62

Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S, &NA; V, Gourmelon P (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* **90**: 139–147

Pardoux R, Sauge-Merle S, Lemaire D, Delangle P, Guilloreau L, Adriano J-M, Berthomieu C (2012) Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS One* **7**: e41922

Park CJ, Seo YS (2015) Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol J* **31**: 323–333

Pasilis SP, Pemberton JE (2003) Speciation and Coordination Chemistry of Uranyl(VI)–Citrate Complexes in Aqueous Solution. *Inorg Chem* **42**: 6793–6800

Payne RB, Gentry DM, Rapp-Giles BJ, Casalot L, Wall JD (2002) Uranium Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* Strain G20 and a Cytochrome *c3* Mutant. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3129–3132

Péligot E (1841) Research on uranium.

- Philpott CC, Protchenko O** (2008) Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **7**: 20–27
- Pible O, Guilbaud P, Pellequer J-L, Vidaud C, Quéméneur E** (2006) Structural insights into protein–uranyl interaction: towards an in silico detection method. *Biochimie* **88**: 1631–1638
- Popa K, Cecal A, Drochioiu G, Pui A, Humelnicu D** (2003) *Saccharomyces cerevisiae* as uranium bioaccumulating material: The influence of contact time, pH and anion nature. *Nukleonika* **48**: 121–125
- Portnoy ME, Culotta VC** (2003) *Iron and Manganese Transporters in Yeast*. *Microb. Transp. Syst.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, pp 447–462
- Poston TM, Hanf RW, Simmons MA** (1984) Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water Air Soil Pollut* **22**: 289–298
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC** (2001) Three Cell Wall Mannoproteins Facilitate the Uptake of Iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 49244–49250
- Qi L, Basset C, Averseng O, Quéméneur E, Hagège A, Vidaud C** (2014) Characterization of UO₂²⁺ binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics* **6**: 166–176
- Qiu Z, Bossier P, Wang X, Bojikova-Fournier S, MacRae TH** (2006) Diversity, structure, and expression of the gene for p26, a small heat shock protein from *Artemia*. *Genomics* **88**: 230–240
- Quintanar L, Gebhard M, Wang T-P, Kosman DJ, Solomon EI** (2004) Ferrous Binding to the Multicopper Oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and Human Ceruloplasmin: Contributions to Ferroxidase Activity. *J Am Chem Soc* **126**: 6579–6589
- Rabilloud T, Valette C, Lawrence JJ** (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**: 1552–1558
- Ragnarsdottir K V., Charlet L** (2000) Uranium behaviour in natural environments. *Environ Mineral Interact Anthropol Influent Contam Waste Manag*. doi: 10.1180/MSS.9.14
- Rashmi V, ShylajaNacyar M, Rajalakshmi R, D’Souza SF, Prabakaran D, Uma L** (2013) Siderophore mediated uranium sequestration by marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU 130911. *Bioresour Technol* **130**: 204–210
- Ratnikov AN, Sviridenko DG, Popova GI, Sanzharova NI, Mikailova RA** (2020) The Behaviour of Uranium in Soils and the Mechanisms of Its Accumulation by Agricultural Plants. pp 113–135
- Reeves RD** (2006) *Hyperaccumulation of trace elements by plants*. *Phytoremediation Met. Soils*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 25–52
- Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M** (1997) Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *Eur J*

Biochem **245**: 324–333

- Ren C-G, Kong C-C, Wang S-X, Xie Z-H** (2019) Enhanced phytoremediation of uranium-contaminated soils by arbuscular mycorrhiza and rhizobium. *Chemosphere* **217**: 773–779
- Renninger N, Knopp R, Nitsche H, Clark DS, Keasling JD** (2004) Uranyl Precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via Controlled Polyphosphate Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7404–7412
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* **11**: 4705–4713
- Rikhvanov EG, Varakina NN, Rusaleva TM, Rachenko EI, Voinikov VK** (2002) Sodium Azide Reduces the Thermotolerance of Respiratively Grown Yeasts. *Curr Microbiol* **45**: 394–399
- Rothstein A** (1948) The relationship of the cell surface to metabolism.
- Rufyikiri G, Huysmans L, Wannijn J, Van Hees M, Leyval C, Jakobsen I** (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. *Environ Pollut* **130**: 427–436
- Rufyikiri G, Wannijn J, Wang L, Thiry Y** (2006) Effects of phosphorus fertilization on the availability and uptake of uranium and nutrients by plants grown on soil derived from uranium mining debris. *Environ Pollut* **141**: 420–427
- Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, Vandenhove H, Biermans G, van Hees M, Wannijn J, Vangronsveld J, Cuypers A** (2015) Oxidative stress responses induced by uranium exposure at low pH in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants. *J Environ Radioact* **150**: 36–43
- Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, Vandenhove H, Biermans G, Van Hees M, Wannijn J, Vangronsveld J, Cuypers A** (2014) The pH strongly influences the uranium-induced effects on the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiol Biochem* **82**: 254–261
- Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, Vandenhove H, Biermans G, Van Hees M, Wannijn J, Vangronsveld J, Cuypers A** (2013) Effects of pH on uranium uptake and oxidative stress responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem* **32**: 2125–2133
- Safi S, Creff G, Jeanson A, Qi L, Basset C, Roques J, Solari PL, Simoni E, Vidaud C, Den Auwer C** (2013) Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem - A Eur J* **19**: 11261–11269
- Safi S, Jeanson A, Roques J, Solari PL, Charnay-Pouget F, Den Auwer C, Creff G, Aitken DJ, Simoni E** (2016) Thermodynamic and Structural Investigation of Synthetic Actinide–Peptide Scaffolds. *Inorg Chem* **55**: 877–886
- Sakamoto F, Nankawa T, Kozai N, Fujii T, Iefuji H, Francis AJ, Ohnuki T** (2007) Protein Expression of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Uranium Exposure. *J Nucl Radiochem Sci* **8**: 133–136
- Sakamoto F, Nankawa T, Ohnuki T, Fujii T, Iefuji H** (2012) Yeast Genes Involved in Uranium Tolerance and Uranium Accumulation: A Functional Screening Using the Nonessential Gene Deletion Collection.

Geomicrobiol J **29**: 470–476

Sakamoto F, Ohnuki T, Fujii T, Iefuji H (2010) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Heavy Element Stress: Lead vs. Uranium. *Geomicrobiol J* **27**: 240–244

Salvétat M (1857) Leçons de céramique professées à l'Ecole centrale des arts et manufactures, ou Technologie céramique: comprenant les notions de chimie, de technologie et de pyrotechnie.

Sánchez DJ, Bellés M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL (2001) Nephrotoxicity of Simultaneous Exposure to Mercury and Uranium in Comparison to Individual Effects of These Metals in Rats. *Biol Trace Elem Res* **84**: 139–154

Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vailhen D, et al (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6**: 2180–2198

Sarthou MCM, Revel BH, Villiers F, Alban C, Bonnot T, Gigarel O, Boisson A-M, Ravanel S, Bourguignon J (2020) Development of a metalloproteomic approach to analyse the response of *Arabidopsis* cells to uranium stress. *Metallomics* **12**: 1302–1313

Sasaki A, Yamaji N, Ma JF (2014) Overexpression of OshMA3 enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice. *J Exp Bot* **65**: 6013–6021

Sauge-Merle S, Brulfert F, Pardoux R, Solari PL, Lemaire D, Safi S, Guilbaud P, Simoni E, Merroun ML, Berthomieu C (2017) Structural Analysis of Uranyl Complexation by the EF-Hand Motif of Calmodulin: Effect of Phosphorylation. *Chem - A Eur J* **23**: 15505–15517

Sauge-Merle S, Lecomte-Pradines C, Carrier P, Cuié S, DuBow M (2012) Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure. *Chemosphere* **88**: 918–924

Schachtman DP, Schroeder JI (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655–658

Schmal C, Reimann P, Staiger D (2013) A Circadian Clock-Regulated Toggle Switch Explains AtGRP7 and AtGRP8 Oscillations in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Comput Biol* **9**: e1002986

Senko JM, Istok JD, Suflita JM, Krumholz LR (2002) In - Situ Evidence for Uranium Immobilization and Remobilization. *Environ Sci Technol* **36**: 1491–1496

Senko JM, Suflita JM, Krumholz LR (2005) Geochemical Controls on Microbial Nitrate-Dependent U(IV) Oxidation. *Geomicrobiol J* **22**: 371–378

Serre NBC, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S (2019) Uncovering the physiological and cellular effects of uranium on the root system of *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* **157**: 121–130

Shahandeh H, Hossner LR (2002) Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water Air Soil Pollut* **141**: 165–180

- Shlewit H, Alibrahim M** (2008) Recovery of uranium from phosphate by carbonate solutions. *J Radioanal Nucl Chem* **275**: 97–100
- Siddique N, Waheed S** (2012) Evaluation of laboratory performance using proficiency test exercise results. *J Radioanal Nucl Chem* **291**: 817–823
- Sikorski RS, Hieter P** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19–27
- De Silva DM, Askwith CC, Eide D, Kaplan J** (1995) The FET3 Gene Product Required for High Affinity Iron Transport in Yeast Is a Cell Surface Ferroxidase. *J Biol Chem* **270**: 1098–1101
- Sinha P, Poland J, Schnölzer M, Rabilloud T** (2001) A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**: 835–840
- Slater EC** (1967) [8] Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. *Methods Enzymol.* pp 48–57
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS** (1997) Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J* **12**: 875–884
- Song Q, Ma L, Liu J, Bai C, Geng J, Wang H, Li B, Wang L, Li S** (2012) Preparation and adsorption performance of 5-azacytosine-functionalized hydrothermal carbon for selective solid-phase extraction of uranium. *J Colloid Interface Sci* **386**: 291–299
- Song W-Y, Mendoza-Cozatl DG, Lee Y, Schroeder JI, Ahn S-N, Lee H-S, Wicker T, Martinoia E** (2014) Phytochelatin-metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **37**: 1192–1201
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cozatl DG, Suter-Grottemeyer M, Shim D, Hortensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, et al** (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 21187–21192
- Soudek P, Petrová Š, Benešová D, Dvořáková M, Vaněk T** (2011) Uranium uptake by hydroponically cultivated crop plants. *J Environ Radioact* **102**: 598–604
- Staiger D** (2001) RNA-binding proteins and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **356**: 1755–1759
- Starck M, Laporte FA, Oros S, Sisommay N, Gathu V, Solari PL, Creff G, Roques J, Den Auwer C, Lebrun C, et al** (2017) Cyclic Phosphopeptides to Rationalize the Role of Phosphoamino Acids in Uranyl Binding to Biological Targets. *Chem - A Eur J* **23**: 5281–5290
- Starck M, Sisommay N, Laporte FA, Oros S, Lebrun C, Delangle P** (2015) Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl. *Inorg Chem* **54**: 11557–

- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A** (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* (80-) **271**: 1552–1557
- Stellato CC, Lai RY** (2020) Engineering uranyl-chelating peptides from NikR for electrochemical peptide-based sensing applications. *J Electroanal Chem* **858**: 113698
- Steuftner R, Arnold T, Geipel G, Bernhard G** (2010) Fluorescence spectroscopic study on complexation of uranium(VI) by glucose: a comparison of room and low temperature measurements. *J Radioanal Nucl Chem* **284**: 421–429
- Storm HH, Jørgensen HO, Kejs AMT, Engholm G** (2006) Depleted uranium and cancer in Danish Balkan veterans deployed 1992–2001. *Eur J Cancer* **42**: 2355–2358
- Strandberg GW, Shumate SE, Parrott JR** (1981) Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accumulation of Uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **41**: 237–245
- Sun M-H, Liu S-Q, Du K-J, Nie C-M, Lin Y-W** (2014) A spectroscopic study of uranyl-cytochrome b5/cytochrome c interactions. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* **118**: 130–137
- Suzuki Y, Suko T** (2006) Geomicrobiological factors that control uranium mobility in the environment: Update on recent advances in the bioremediation of uranium-contaminated sites. *J Mineral Petrol Sci* **101**: 299–307
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 1–15
- Takeda A, Tsukada H, Takaku Y, Hisamatsu S, Nanzyo M** (2006) Accumulation of uranium derived from long-term fertilizer applications in a cultivated Andisol. *Sci Total Environ* **367**: 924–931
- Tamás M, Sharma S, Ibstedt S, Jacobson T, Christen P** (2014) Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules* **4**: 252–267
- Tan Y-F, O’Toole N, Taylor NL, Millar AH** (2010) Divalent Metal Ions in Plant Mitochondria and Their Role in Interactions with Proteins and Oxidative Stress-Induced Damage to Respiratory Function. *Plant Physiol* **152**: 747–761
- Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T** (2003) A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* **24**: 1787–1794
- Tewari R, Horemans N, Nauts R, Wannijn J, Van Hees M, Vandenhove H** (2015) Uranium exposure induces nitric oxide and hydrogen peroxide generation in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* **120**: 55–64
- Theodorakopoulos N, Chapon V, Coppin F, Floriani M, Vercouter T, Sergeant C, Camilleri V, Berthomieu C, Février L** (2015) Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to reveal interactions between uranium and *Microbacterium* sp. A9, a strain isolated from the Chernobyl exclusion zone. *J Hazard*

- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 4991–4996
- Tökés-Füzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sümegi B, Rab A, Miseta A** (2002) Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **44**: 1299–1308
- La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI** (1987) Absorption and Biokinetics of U in Rats Following an Oral Administration of Uranyl Nitrate Solution. *Health Phys* **53**: 147–162
- Tseng Y-H, Saier MH, Yen M-R** (2001) Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology* **147**: 2881–2883
- Uraguchi S, Fujiwara T** (2013) Rice breaks ground for cadmium-free cereals. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 328–334
- Vandenhove H, Cuypers A, Van Hees M, Koppen G, Wannijn J** (2006) Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiol Biochem* **44**: 795–805
- Vanhoudt N, Cuypers A, Horemans N, Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Bello DM, Havaux M, Wannijn J, Van Hees M, et al** (2011a) Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part II: Responses in the leaves and general conclusions. *J Environ Radioact* **102**: 638–645
- Vanhoudt N, Horemans N, Biermans G, Saenen E, Wannijn J, Nauts R, Van Hees M, Vandenhove H** (2014) Uranium affects photosynthetic parameters in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* **97**: 22–29
- Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N, Martinez Bello D, Van Hees M, Wannijn J, Carleer R, Vangronsveld J, Cuypers A** (2011b) Uranium induced effects on development and mineral nutrition of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Nutr* **34**: 1940–1956
- Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N, Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Bello DM, Wannijn J, Van Hees M, Vangronsveld J, et al** (2011c) Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part I: Responses in the roots. *J Environ Radioact* **102**: 630–637
- Vanhoudt N, Vandenhove H, Smeets K, Remans T, Van Hees M, Wannijn J, Vangronsveld J, Cuypers A** (2008) Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **46**: 987–996
- Vera Tomé F, Blanco Rodríguez P, Lozano JC** (2009) The ability of *Helianthus annuus* L. and *Brassica juncea* to uptake and translocate natural uranium and ²²⁶Ra under different milieu conditions. *Chemosphere* **74**: 293–300
- Vera Tomé F, Blanco Rodríguez P, Lozano JC** (2008) Elimination of natural uranium and ²²⁶Ra from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. *Sci Total Environ* **393**: 351–357

- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot M Lou, Briat J-F, Curie C** (2002) IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* **14**: 1223–1233
- Vidaud C, Dedieu A, Basset C, Plantevin S, Dany I, Pible O, Quéméneur E** (2005) Screening of Human Serum Proteins for Uranium Binding. *Chem Res Toxicol* **18**: 946–953
- Vidaud C, Gourion-Arsiquaud S, Rollin-Genetet F, Torne-Celer C, Plantevin S, Pible O, Berthomieu C, Quéméneur E** (2007) Structural Consequences of Binding of UO₂²⁺ to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry* **46**: 2215–2226
- Vidaud C, Robert M, Paredes E, Ortega R, Avazeri E, Jing L, Guignonis J-M, Bresson C, Malard V** (2019) Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol* **93**: 2141–2154
- Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barceló A, Ariño J** (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 43614–43624
- Volesky B, May-Phillips HA** (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 797–806
- Wall JD, Krumholz LR** (2006) Uranium Reduction. *Annu Rev Microbiol* **60**: 149–166
- Wang T, Zheng X, Wang X, Lu X, Shen Y** (2017) Different biosorption mechanisms of Uranium(VI) by live and heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* under environmentally relevant conditions. *J Environ Radioact* **167**: 92–99
- Wegner S V., Boyaci H, Chen H, Jensen MP, He C** (2009) Engineering A Uranyl-Specific Binding Protein from NikR. *Angew Chemie Int Ed* **48**: 2339–2341
- Weinhold B** (2012) Unknown Quantity: Regulating Radionuclides in Tap Water. *Environ Health Perspect* **120**: 350–356
- Wetle R, Bensko-Tarsitano B, Johnson K, Sweat KG, Cahill T** (2020) Uptake of uranium into desert plants in an abandoned uranium mine and its implications for phytostabilization strategies. *J Environ Radioact* **220–221**: 106293
- White PJ** (2003) Calcium in Plants. *Ann Bot* **92**: 487–511
- Wijsman M, Świat MA, Marques WL, Hettinga JK, van den Broek M, Torre Cortés P de la, Mans R, Pronk JT, Daran J-M, Daran-Lapujade P** (2019) A toolkit for rapid CRISPR- Sp Cas9 assisted construction of hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res* **19**: 1–12
- Williams KH, Bargar JR, Lloyd JR, Lovley DR** (2013) Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: a systems approach to subsurface biogeochemistry. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 489–497
- Wu Z, Ren H, McGrath SP, Wu P, Zhao F-J** (2011) Investigating the Contribution of the Phosphate Transport Pathway to Arsenic Accumulation in Rice. *Plant Physiol* **157**: 498–508

- Xu H, Barton LL, Zhang P, Wang Y** (1999) TEM Investigation of U⁶⁺ and Re⁷⁺ Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*, a Sulfate-Reducing Bacterium. *MRS Proc* **608**: 299
- Xu M, Frelon S, Simon O, Lobinski R, Mounicou S** (2014a) Development of a non-denaturing 2D gel electrophoresis protocol for screening in vivo uranium-protein targets in *Procambarus clarkii* with laser ablation ICP MS followed by protein identification by HPLC–Orbitrap MS. *Talanta* **128**: 187–195
- Xu M, Frelon S, Simon O, Lobinski R, Mounicou S** (2014b) Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium–protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS. *Anal Bioanal Chem* **406**: 1063–1072
- Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, et al** (2010) MCA1 and MCA2 that mediate Ca²⁺ uptake have distinct and overlapping roles in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1284–1296
- Yang C-T, Han J, Gu M, Liu J, Li Y, Huang Z, Yu H-Z, Hu S, Wang X** (2015) Fluorescent recognition of uranyl ions by a phosphorylated cyclic peptide. *Chem Commun* **51**: 11769–11772
- Yang D, Wang X, Song G, Zhao G, Chen Z, Yu S, Gu P, Wang H, Wang X** (2017) One-pot synthesis of arginine modified hydroxyapatite carbon microsphere composites for efficient removal of U(VI) from aqueous solutions. *Sci Bull* **62**: 1609–1618
- Yang X, Wei J, Wang Y, Yang C, Zhao S, Li C, Dong Y, Bai K, Li Y, Teng H, et al** (2018) A Genetically Encoded Protein Polymer for Uranyl Binding and Extraction Based on the SpyTag–SpyCatcher Chemistry. *ACS Synth Biol* **7**: 2331–2339
- Yang Y, Feng Y, Wang Y, Wang L, Shi W** (2013) Interactions between U(VI) and bovine serum albumin. *J Radioanal Nucl Chem* **298**: 903–908
- Yonkovich J, McKendry R, Shi X, Zhu Z** (2002) Copper Ion-sensing Transcription Factor Mac1p Post-translationally Controls the Degradation of Its Target Gene Product Ctr1p. *J Biol Chem* **277**: 23981–23984
- Yuan Y, Yu Q, Wen J, Li C, Guo Z, Wang X, Wang N** (2019) Ultrafast and Highly Selective Uranium Extraction from Seawater by Hydrogel-like Spidroin-based Protein Fiber. *Angew Chemie Int Ed* **58**: 11785–11790
- Zhang J, Chen X, Zhou J, Luo X** (2020) Uranium biosorption mechanism model of protonated *Saccharomyces cerevisiae*. *J Hazard Mater* **385**: 121588
- Zhang Z-H, Wu Q-Y, Huang X-F, Zhai F-W, Yuan L-Y, Chai Z-F, Burns PC, Shi W-Q** (2019) Interactions of phosphorylated cyclohexapeptides with uranyl: insights from experiments and theoretical calculations. *J Radioanal Nucl Chem* **322**: 677–689
- Zhao F-J, McGrath SP, Meharg AA** (2010) Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 535–559
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* **181**: 777–794

Zheng XY, Shen YH, Wang XY, Wang TS (2018) Effect of pH on uranium(VI) biosorption and biomineralization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* **203**: 109–116

Zhou L, Bosscher M, Zhang C, Özçubukçu S, Zhang L, Zhang W, Li CJ, Liu J, Jensen MP, Lai L, et al (2014) A protein engineered to bind uranyl selectively and with femtomolar affinity. *Nat Chem* **6**: 236–241

VI - Publications et présentations

Publications

Revel BH*, Sarthou MCM*, Villiers F*, Alban C, Bonnot T, Gigarel O, Boisson A-M, Ravanel S, Bourguignon J. “Development of a metalloproteomic approach to analyse the response of Arabidopsis cells to uranium stress”. Metallomics (2020) 12, 1302. doi: 10.1039/d0mt00092b.

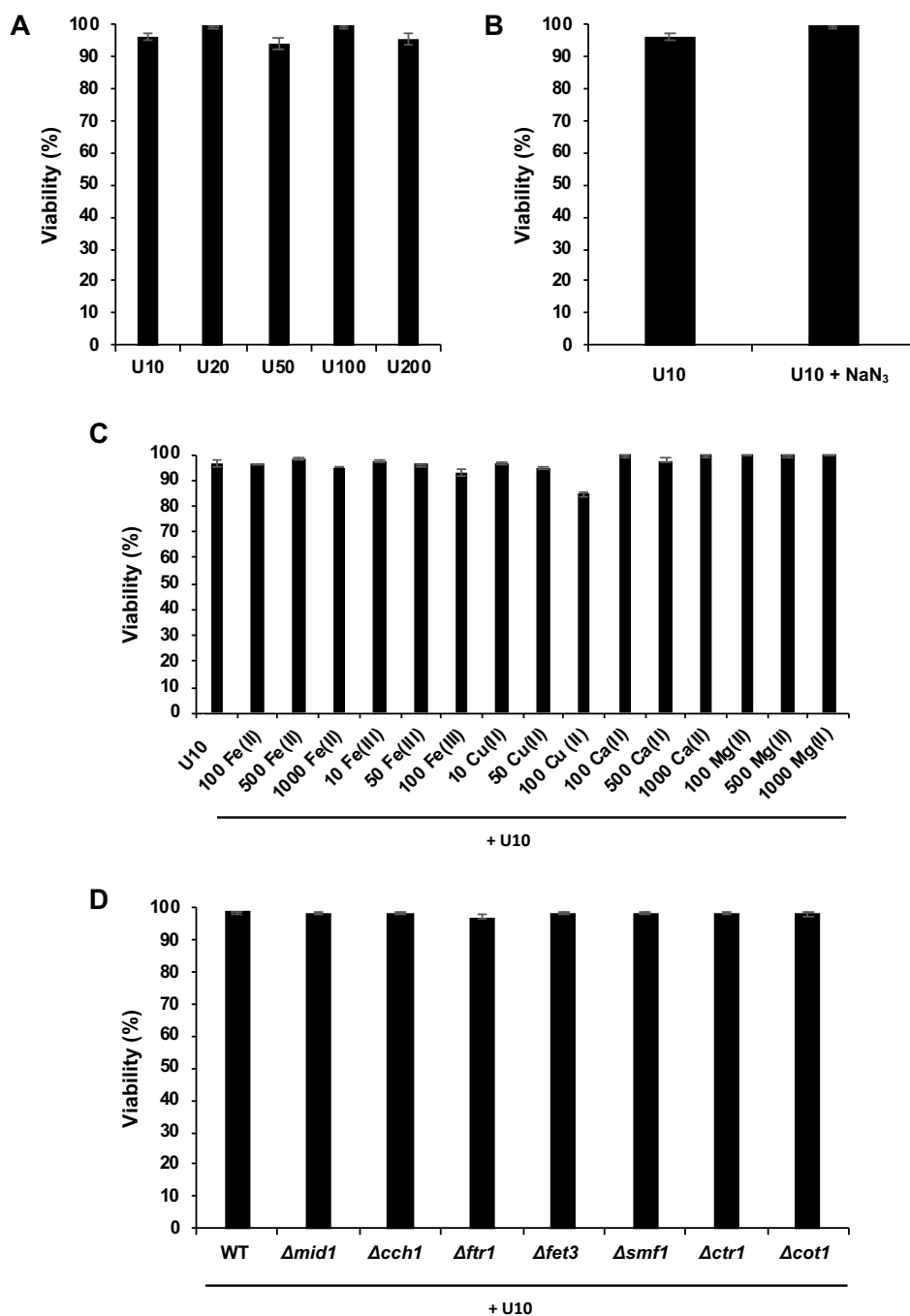
(*co-premiers auteurs)

Présentation des travaux

Benoît Revel*, Martin-Laffon J., Boisson A.M., Vidaud C., Armengaud J., Favier A., Vallet A., Brutscher B., Ravanel S., Bourguignon J., Alban C. Exploring the fate of Uranium in plants: Identification of U-binding proteins. 7th International Symposium on Metallomics, Warsaw (Poland), 2019, June 30-July 3_ **Communication orale***

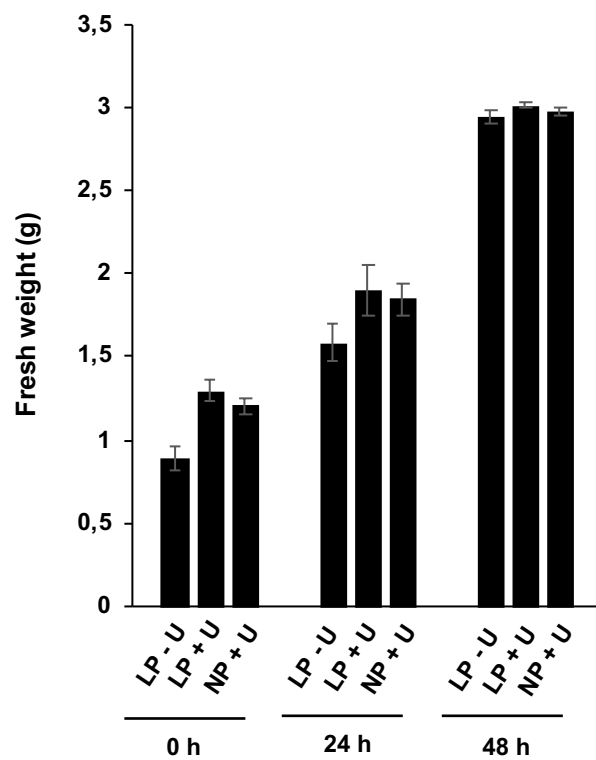
Benoît Revel*, Martin-Laffon J., Catty P., Ravanel S., Bourguignon J. et Alban C. Identification de protéines impliquées dans le devenir de l’uranium dans la plante. Identification of proteins involved in the fate of uranium in plants. Journée Annuelle des Doctorants 2019 - Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant. DLST, Grenoble, June 20th 2019 _ **Communication orale***

VII - Annexes



Annexe 1 : Viabilité des souches de levures *S. cerevisiae* au cours des différentes expériences réalisées durant de ce travail.





La viabilité des cellules (souche sauvage BY4742 ou mutants de transport) est mesurée l'aide du kit Yeast Viability Kit (LogosBiosystems) après 4 h de traitement des cellules en présence de nitrate d'uranyle aux concentrations indiquées (voir Matériels et Méthodes). Le détail des conditions expérimentales est décrit dans les figures suivantes. A- Détermination d'un K_m apparent d'incorporation d'uranium dans la levure (Figure II – 3) ; B- Effet de l'azide de sodium sur l'incorporation d'uranium dans *S. cerevisiae* (Figure II – 4) ; C- Effet de la présence de métaux essentiels (Figure II – 5) ; D- Cinétiques d'absorption d'uranium dans différentes souches *S. cerevisiae* délétées dans divers transporteurs de métaux (Figure II – 6). Les barres d'erreur (écart types) sont calculées sur la base de 2 à 6 expériences indépendantes.



Annexe 2 : Croissance de cellules d'*A. thaliana* en milieu de phase exponentielle (4 jours) dans 100 ml de milieu MS avec 30 μ M de phosphate (Low Phosphate ; LP) ou sans phosphate (No Phosphate ; NP) en présence (+ U) ou absence (- U) de 50 μ M de nitrate d'uranyle après 0, 24 et 48 h de traitement.


 Cite this: *Metallomics*, 2020, 12, 1302

Development of a metalloproteomic approach to analyse the response of Arabidopsis cells to uranium stress†

 Manon C. M. Sarthou,‡ Benoît H. Revel,‡ Florent Villiers,‡§ Claude Alban, , Titouan Bonnot,  ¶ Océane Gigarel, Anne-Marie Boisson, Stéphane Ravel  * and Jacques Bourguignon  *

Uranium is a naturally occurring radionuclide that is absorbed by plants and interferes with many aspects of their physiology and development. In this study, we used an ionic, metalloproteomic, and biochemical approach to gain insights into the impact of uranyl ions on the proteome of *Arabidopsis thaliana* cells. First, we showed that most of the U was trapped in the cell wall and only a small amount of the radionuclide was found in the cell-soluble fraction. Also, the homeostasis of several essential elements was significantly modified in the cells challenged with U. Second, the soluble proteome from *Arabidopsis* cells was fractionated into 10 subproteomes using anion-exchange chromatography. Proteomic analyses identified 3676 proteins in the different subproteomes and the metal-binding proteins were profiled using inductively coupled plasma mass spectrometry. Uranium was detected in several chromatographic fractions, indicating for the first time that several pools of *Arabidopsis* proteins are capable of binding the uranyl ion *in vivo*. Third, we showed that the pattern of some lysine and arginine methylated proteins was modified following exposure to U. We further identified that the ribosomal protein RPS10C was dimethylated at two arginine residues in response to uranyl ion stress. Together, these results provide the first clues for the impact of U on the *Arabidopsis* proteome and pave the way for the future identification of U-binding proteins.

 Received 8th April 2020,
Accepted 27th May 2020

DOI: 10.1039/d0mt00092b

rsc.li/metallomics

Significance to metallomics

Knowledge of the mechanisms of metal toxicity depends largely on understanding the impact of metals on cellular proteins. The development of ionic, proteomic, metalloproteomic, and biochemical approaches is essential to achieve this objective. Here, we used this strategy to gain insight into the consequences of uranyl ion exposure on the proteome of *Arabidopsis thaliana* cells. The inventory of native *Arabidopsis* proteins fractionated by anion-exchange chromatography, together with their biochemical properties and coelution with metals, provides a unique tool for targeted biochemical characterization, including the analysis of metal-binding proteins, post-translational modifications, or protein complexes.

Introduction

Uranium (U) is a non-essential trace metal element that is ubiquitous in Earth's crust, with average worldwide concentrations

of 3 ppm (mg kg^{-1}) in soil and 3 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$) in sea water. The radionuclide is primarily redistributed in the environment by anthropogenic activities related to U mining and milling industries, civil and military nuclear activities, and extensive enrichment of agricultural soils with phosphate fertilizers, which may be significantly contaminated with U.^{1–3} The accumulation of U in soil, water and air can lead to potential risks to ecosystems, agrosystems, and ultimately human health, as the radionuclide has both chemical and radiological effects. Natural U is of low radiotoxicity due to its isotopic composition (>99% ²³⁸U) but the uranyl ion (UO_2^{2+}) that is prevalent in oxidizing environments is highly chemotoxic for all living organisms.⁴ As predicted by the hard and soft acid and base principle,⁵ UO_2^{2+} is a hard acid that reacts preferentially with hard

Univ. Grenoble Alpes, CEA, INRAE, CNRS, IRIG, LPCV, 17 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France. E-mail: stephane.ravel@cea.fr, jacques.bourguignon@cea.fr; Fax: +33 438783383, +33 438784688; Tel: +33 438783383, +33 438784688

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0mt00092b
‡ MS, BR and FV contributed equally to this work.

§ Present address: Bayer Crops Science, Lyon, La Dagoire, France.

¶ Present address: Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside, 92507 Riverside, USA.

oxygen donors such as phosphate, carboxylate, carbonate and hydroxyl groups, mainly through electrostatic interactions. Therefore, the biological ligands of U can be very diverse, including metabolites, proteins or peptides.⁶ The identification of molecular targets of uranyl ions is an essential step in understanding the mechanisms of radionuclide toxicity, and possibly detoxification, in a given organism.

Uranium is absorbed by plants and interferes with many aspects of their physiology and development.^{7–11} Uranium inhibits plant growth, modifies root growth and architecture, disrupts mineral nutrition and homeostasis, and affects photosynthesis.^{12–19} At the cellular level, U induces nitric oxide and hydrogen peroxide production and triggers defence mechanisms against oxidative stress.^{19,20} Also, U perturbs iron, phosphate and manganese homeostasis^{9,14,21,22} and triggers important changes in the metabolome.²³ At the molecular level, U has been shown to alter the expression of genes involved in iron and phosphate homeostasis, hormone synthesis and signalling, and cell wall metabolism in *Arabidopsis thaliana*.²¹ *Vicia faba* plants challenged with U also displayed important changes of their transcriptome.²³ Despite these studies, the effects of uranyl ions on the dynamics of proteomes and the molecular targets of U in plants are still not known. Since the uranyl ion is able to bind strongly to biomolecules *via* carboxylate, phosphate or sulphate moieties, proteins are expected to be the primary targets of U. The most relevant strategy for the identification of uranyl–protein complexes formed *in vivo* is a metalloproteomic approach combining efficient protein separation techniques that preserve uranyl–protein interactions with powerful protein and metal identification systems, *i.e.* protein tandem mass spectrometry (MS/MS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), respectively.^{24,25}

Metalloproteins account for more than a third of total proteins and are involved in a wide array of functions related to the functional, structural and regulatory roles of bound metals.^{26,27} The main challenge in the identification of metalloproteins by using the top-down proteomic approaches is to preserve the non-covalent and labile metal–protein complexes during protein fractionation steps.²⁵ Metalloproteomic studies in plants are scarce and, thus, plant iono- or metalloproteomes are largely uncharacterized. A few studies have described the identification of copper-binding proteins in *Arabidopsis* roots,²⁸ and copper-, zinc- and cobalt-binding proteins from *Arabidopsis* mitochondria²⁹ using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). To our knowledge, the proteome-wide identification of true native metal-binding proteins, and not proteins that are able to bind metals *in vitro* as identified by IMAC strategies, has never been done for plants. In contrast, such studies have been performed on microorganisms^{24,30,31} or human cells such as primary neuron and astrocyte culture.³² These studies used a combination of non-denaturing electrophoretic and/or chromatographic steps combined with ICP-MS analyses and identified a large array of proteins that bind essential and non-essential elements. *In vivo* identification of potential U-binding proteins has been described for the Archaea *Pyrococcus furiosus*,³⁰ the crayfish species *Procambarus clarkia*,³³

zebrafish,³⁴ and human dopaminergic cells³⁵ challenged with the radionuclide. The identified U-binding proteins are involved in iron homeostasis (*e.g.* ferritin), carbohydrate metabolism, oxidative stress regulation, cytoskeleton, or protein ubiquitination.

In the present study, we developed an ionomic, top-down proteomic, and biochemical approach to gain insights into the impact of uranyl ions on the proteome of *Arabidopsis thaliana* cells. First, we showed that *Arabidopsis* cells challenged with U displayed significant changes in the homeostasis of essential elements and that only a small amount of the radionuclide was retrieved in the cell-soluble fraction. Second, the soluble proteome from *Arabidopsis* cells was fractionated into 10 subproteomes using anion-exchange chromatography that allowed a reduction of sample complexity. Proteomic analyses identified 3676 proteins in the different subproteomes and the metal-binding proteins were profiled using ICP-MS. Uranium was detected in several chromatographic fractions, indicating for the first time that a number of *Arabidopsis* proteins are able to bind U *in vivo*. Third, we analysed the consequences of U stress on the expression patterns of lysine (Lys) and arginine (Arg) methylated proteins. We identified an Arg methylated protein involved in translation that is highly methylated in response to U stress. Together, these results show for the first time the effects of U on the *Arabidopsis* proteome and pave the way for the future purification and identification of U-binding proteins in *Arabidopsis*.

Methods

Arabidopsis cell growth conditions

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) cells in suspension cultures were grown under continuous light (40 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 22 °C with rotary agitation at 125 rpm in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.5% (w/v) sucrose. Cells were subcultured every 4 days for 3 cycles before being challenged with U. Toward this aim, exponentially growing cells were harvested by centrifugation, washed once and re-suspended in MS medium with low phosphate content, 30 μM KH_2PO_4 instead of 1.25 mM in regular MS. Cells (about 10 g fresh weight in 200 mL of medium) were challenged with 50 μM uranyl nitrate or maintained in MS low Pi for 24 h before harvesting. The incubation period is sufficient to allow the cells to absorb almost all of the radionuclide from the medium while preserving cellular integrity. Cells were washed once in 10 mM Na_2CO_3 , then twice in distilled water, and dried by vacuum filtration using a Buchner funnel. Cells were used immediately or stored at -80 °C for further analyses.

Preparation of protoplasts and soluble fractions

Freshly harvested cells (about 1 g) were used to prepare protoplasts by enzymatic digestion of cell walls. Cells were suspended in 1.5 mL of digestion buffer [2% (w/v) cellulase (Onozuka R-10, Fisher Scientific), 0.5% (w/v) pectolyase (Y-23, Fisher Scientific), 0.6 M mannitol, 25 mM MES, and pH 5.5] and incubated at 28 °C with rotary agitation at 120 rpm until protoplasts were released.

The protoplasts were harvested by filtration through a 78 μm nylon mesh, diluted 10-fold in washing buffer (0.7 M mannitol, 15 mM MES, 10 mM Tris, and pH 7.0), and centrifuged at $100 \times g$ for 5 min. Protoplasts were washed twice in the same buffer to remove any trace of digestion enzymes. A fraction of the protoplasts was lysed by osmotic shock following resuspension in 10 mM Tris, pH 7.0, and three cycles of freezing (liquid nitrogen) and thawing (water bath at 30 °C). The protoplast-soluble fractions were recovered by ultracentrifugation at $105\,000 \times g$ for 20 min.

Preparation of protein extracts and fractionation

Total soluble proteins from cultured cells were extracted by grinding powdered samples in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, and a cocktail of protease inhibitors (Roche Applied Science, ref. 04693132001). Samples were centrifuged at $16\,000 \times g$ for 20 min at 4 °C and the supernatant was used as a source of soluble proteins. After desalting on PD10 Sephadex G25 (M) columns (GE Healthcare), soluble proteins were fractionated by chromatography on Q-Sepharose High Performance (GE Healthcare) columns (1.6 \times 5 cm) equilibrated with the extraction buffer, and stepwise elution was performed using discontinuously increasing NaCl concentrations in the same buffer (from 0 to 1 M NaCl). Collected fractions were stored at -80 °C for further analyses.

Protein determination and immunoblotting analyses

Proteins were measured by the Bradford method using Bio-Rad protein assay reagent, with BSA as a standard.³⁶ Protein fraction aliquots (30 μg) were concentrated by precipitation with 10% (v/v) trichloroacetic acid, resolved by SDS-PAGE, and either stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 or electroblotted onto nitrocellulose membranes, and probed using rabbit polyclonal antibodies to trimethylated lysine (ab76118, abcam) or to asymmetric dimethyl arginine (adme-R, Cell Signaling Technology). Protein detection was achieved using the ECL Plus™ Western blotting detection reagents and a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences).

Mass spectrometry analyses

Protein identification in the Q-Sepharose fractions – Proteins contained in each fraction were concentrated at the top of the SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Blue. Proteins were treated in a gel with dithiothreitol and iodoacetamide before digestion using trypsin. The resulting peptides were extracted and analysed by an online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific) system using a 120 min gradient. For this, peptides were sampled on a 300 $\mu\text{m} \times 5$ mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 $\mu\text{m} \times 150$ mm PepMap C18 column (Thermo Scientific). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Mascot Distiller (Matrix Science) was used to produce mgf files before identification of peptides and proteins using Mascot (version 2.3) through concomitant searches against TAIR (version 10), a database (homemade) of classical contaminants, and the corresponding reversed databases. ESI-TRAP was chosen as

the instrument, trypsin/P was used as the enzyme, and 2 missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set, respectively, at 10 ppm and 0.6 Da. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethyl (C, fixed), acetyl (protein N-terminus, variable) and oxidation (M, variable). The IRMa software³⁷ was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR <1% (as calculated by employing the reverse database strategy), and a minimum of 1 specific peptide per identified protein group. The filtered results were uploaded onto a relational mass spectrometry identification database and hEIDI³⁸ was used for the compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples.

Analysis of post-translational modifications in Arabidopsis cells exposed to U stress – Protein bands were cut out before in-gel treatment with dithiothreitol and iodoacetamide and digestion with trypsin. The resulting peptides were extracted and analysed by an online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 RSLCnano and Q-Exactive Plus, Thermo Scientific) system using a 40 min gradient. For this, peptides were sampled on a 300 $\mu\text{m} \times 5$ mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific) and separated on a 75 $\mu\text{m} \times 250$ mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μm , Dr Maisch). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). RAW files were processed using MaxQuant³⁹ version 1.5.5.1. Spectra were searched using the Uniprot database (*Arabidopsis thaliana* taxonomy, December 2016 version), the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant, and the corresponding reversed databases. Trypsin was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set at their default values. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethyl (C, fixed), acetyl (protein N-terminus, variable), oxidation (M, variable), methyl (KR, variable) and dimethyl (KR, variable). The minimum numbers of peptides, razor + unique peptides, and unique peptides were set to 1. Maximum false discovery rates were set to 0.01 at peptide, protein and site levels. The match between runs option was activated.

ICP-MS analyses

Cells, protoplasts, and soluble fractions were digested at 90 °C for 4 hours in 65% (w/v) HNO₃ (Suprapur, Merck). Protein fractions from AEC were incubated with 10% (v/v) HNO₃ for 2 h at 55 °C to ensure denaturation and release of bound elements. Denatured proteins were removed by centrifugation and the supernatants were used for ICP-MS analysis. Mineralized samples were diluted in 0.5% (v/v) HNO₃ and analysed using an iCAP RQ quadrupole mass instrument (Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany) equipped with a MicroMist U-Series glass concentric nebulizer, a quartz spray chamber cooled at 3 °C, a Qnova quartz torch, a nickel sample cone, a nickel skimmer cone with a high-sensitivity insert, and an ASX-560 autosampler (Teledyne CETAC Technologies, USA). Elements were analysed using either the standard mode (for ²⁴Mg, ²⁵Mg, ³⁹K, ⁴³Ca, ⁴⁴Ca, ⁹⁵Mo, ⁹⁸Mo, and ²³⁸U) or the kinetic energy discrimination mode with helium as the collision cell gas (for ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁷Fe, ⁶³Cu,

^{65}Cu , ^{64}Zn , and ^{66}Zn). Concentrations were determined using standard curves and corrected using an internal standard solution containing ^{103}Rh and ^{172}Y added online. Data integration was done using the Qtegra software (Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany).

Results and discussion

Ionic analysis of Arabidopsis cells challenged with uranium

We analysed the ionome of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures challenged with U. Cells growing exponentially in standard MS medium were transferred into MS medium with a low phosphate content (30 μM instead of 1.25 mM) supplemented or not with 50 μM uranyl nitrate. Low phosphate conditions have been used to reduce the interaction between U and phosphate that limits the bioavailability of the radionuclide.^{9,22} Cells were harvested after 24 h of U stress and extensively washed with Na_2CO_3 and distilled water to remove elements that are loosely adsorbed to the cell surface. Protoplasts were isolated from freshly harvested cells following cell wall digestion and further lysed by osmotic shock and ultracentrifuged to recover the soluble fractions. Each fraction (whole cells, protoplasts, and soluble fractions) was mineralized in nitric acid and analysed by ICP-MS to determine the effect of U on the ionome of Arabidopsis cells (Table 1). Potassium (K), magnesium (Mg), and calcium (Ca) were the most abundant elements found in Arabidopsis cells, followed by iron (Fe), zinc (Zn), manganese (Mn), molybdenum (Mo), and copper (Cu). After 24 h of treatment with uranyl nitrate, the amount of U in cells was $7 \pm 2 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein, which is an intermediate value between the amounts of macro- and microelements. Uranium triggered a significant decrease in the amounts of Fe (27%) and K (11%) in Arabidopsis cells but did not change the amounts of other elements (Table 1). In protoplasts, the amount of U was $2.7 \pm 0.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein, which is about five times those of the most abundant microelements Fe and Zn. However, the effect of U treatment on ion homeostasis in protoplasts was significant only for K (25% decrease) and Mg (14% decrease) (Table 1). Elemental analyses of whole cells and protoplasts allowed us to calculate the

distribution of U and other elements between the cell wall and the protoplast, assuming that cell wall proteins account for 0.5 to 6% of the total cellular proteins.⁴⁰ This calculation showed that 65% U was present in the cell wall (Fig. 1). A similar distribution was observed for Mg, Mn, Fe, Zn, and Mo. Potassium was also mainly present in the cell wall (about 80–90%), whereas 80–90% of the pools of Ca and Cu was associated with the protoplast (Fig. 1). These results suggested that the cell wall is a major site for the storage of several essential elements as well as U, at least in cultured Arabidopsis cells. In the soluble fractions of protoplasts the amount of U was low ($0.10 \pm 0.05 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein) (Table 1), indicating that in protoplasts, most of the radionuclide was associated with membranes or with molecules forming complexes or precipitates eliminated by ultracentrifugation. In addition, the amount of Mn, Zn and Mg was significantly reduced (22, 19, and 16%, respectively) in the soluble fraction of Arabidopsis protoplasts upon U stress (Table 1). One cannot exclude the possibility that a small amount of U measured in the cell-soluble fraction was due to elemental redistribution during the fractionation procedure. However, the identification of U-enriched protein fractions by anion exchange chromatography (see below) supports the formation of U–protein complexes *in cellulo* following the incorporation of the radionuclide within the Arabidopsis cell. Together, these data indicated that, despite the existence of important barriers for the uptake of U (cell wall, membranes and putative chelators), a limited amount of the toxic element reached the soluble phase of Arabidopsis cells, where it can probably interact with soluble protein targets.

Fractionation of the soluble proteome from Arabidopsis cells

A key step towards the identification of proteins interacting with U is the fractionation of the soluble proteome while preserving the labile protein–metal interaction.^{30,33–35} Toward this aim, the soluble proteome prepared from Arabidopsis-cultured cells was resolved by anion exchange chromatography (AEC) using a High Performance Q-Sepharose column. A sodium chloride step gradient was set up to obtain a homogeneous distribution of the amount of proteins in each fraction (Fig. 2A). The Arabidopsis cell proteome was separated into ten

Table 1 Ionic analysis of Arabidopsis cells challenged with U. Exponentially-growing Arabidopsis cells were transferred into MS medium with low Pi content in the absence (U0) or presence of 50 μM uranyl nitrate (U50). Cells were harvested after 24 h of incubation and used to prepare protoplasts and soluble fractions. Cell samples were digested in nitric acid and analysed by ICP-MS. Elemental content is expressed as $\mu\text{g element mg}^{-1}$ protein. Means \pm SD are shown ($n = 6$ independent cultures for U0 and U50). Statistical significance for the comparison of U50 to U0 was determined using a non-parametric Dunnett's test, with $p < 0.05$ (*), and $p < 0.01$ (**)

	Cells		Protoplasts		Soluble fractions	
	U0	U50	U0	U50	U0	U50
Mg	24.7 \pm 1.6	24.0 \pm 2.7	9.8 \pm 1.0	8.4 \pm 0.6**	13.4 \pm 1.5	11.2 \pm 1.4*
K	513.6 \pm 37.4	453.2 \pm 25.6*	84.6 \pm 7.7	63.3 \pm 12.1**	128.1 \pm 23.8	101.4 \pm 30.5
Ca	15.7 \pm 1.6	17.6 \pm 2.6	13.5 \pm 3.8	16.1 \pm 3.7	10.8 \pm 1.3	10.9 \pm 1.8
Mn	0.87 \pm 0.24	0.97 \pm 0.24	0.27 \pm 0.11	0.30 \pm 0.09	0.18 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02*
Fe	1.96 \pm 0.25	1.43 \pm 0.34*	0.62 \pm 0.25	0.58 \pm 0.16	0.31 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03
Cu	0.023 \pm 0.004	0.020 \pm 0.002	0.019 \pm 0.005	0.019 \pm 0.009	0.013 \pm 0.002	0.013 \pm 0.004
Zn	1.51 \pm 0.43	1.64 \pm 0.39	0.54 \pm 0.20	0.55 \pm 0.16	0.46 \pm 0.07	0.37 \pm 0.03**
Mo	0.106 \pm 0.015	0.114 \pm 0.021	0.037 \pm 0.004	0.031 \pm 0.006	0.055 \pm 0.008	0.060 \pm 0.010
U	0.00 \pm 0.00	7.15 \pm 2.07**	0.00 \pm 0.00	2.67 \pm 0.48**	0.00 \pm 0.00	0.10 \pm 0.05**

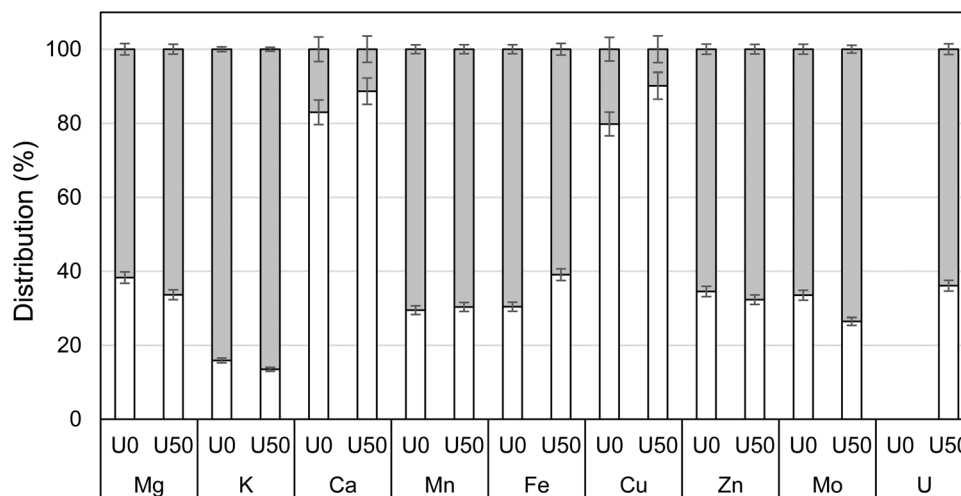


Fig. 1 Distribution of elements between the cell wall and the protoplast in *Arabidopsis* cells challenged with U. The elemental composition of *Arabidopsis* cells and protoplasts challenged (U50) or not (U0) with uranyl nitrate is given in Table 1. These data allowed us to calculate the distribution of elements between the cell wall (■) and the protoplast (□), assuming that cell wall proteins account for 0.5 to 6% of total cellular proteins.⁴⁰ Means \pm SD are shown ($n = 6$ independent cultures for U0 and U50).

fractions corresponding to the flow through (fraction F0) and nine fractions corresponding to proteins eluted at 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, and 1000 mM NaCl (fractions F50 to F1000, respectively). For both the control and U-treated *Arabidopsis* cells, the fractionation procedure allowed the complexity of the protein samples to be reduced in a highly reproducible manner and to enrich low-abundant proteins (Fig. 2).

Identification of proteins in the 10 sub-proteomes from *Arabidopsis* cells by using LC-MS/MS

We used three of the four replicate experiments of fractionation (Fig. 2B) to identify the proteins present in each of the fractions resolved by AEC. Using LC-MS/MS, a total of 6603 proteins were identified by shotgun proteomics in the 10 sub-proteomes (Table S1, ESI[†]). Proteins identified with only one peptide

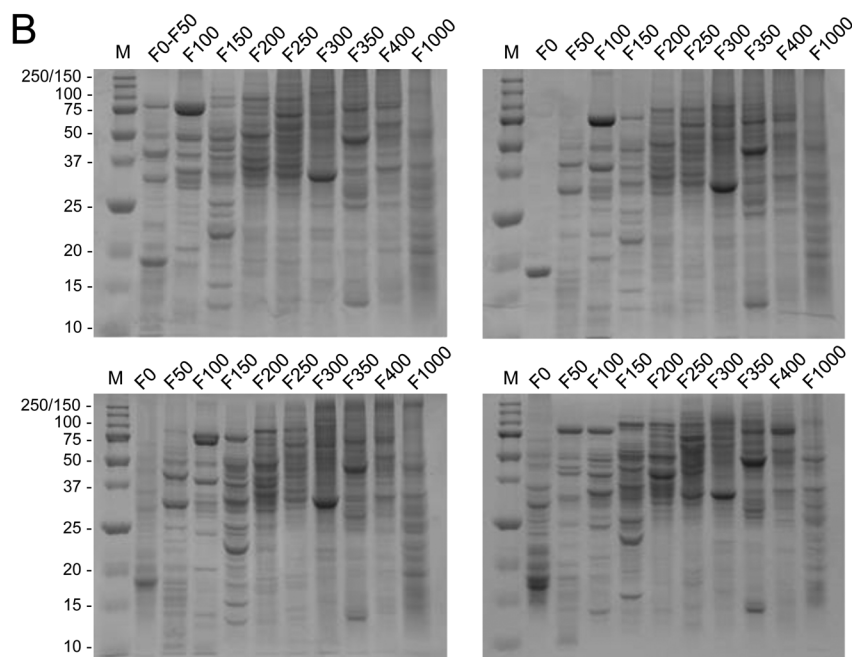
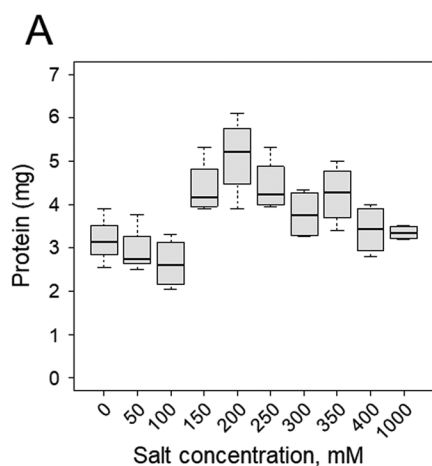


Fig. 2 Fractionation of *Arabidopsis* soluble proteins by anion-exchange chromatography. (A) Distribution of proteins in the 10 fractions from the AEC column. Soluble proteins from *Arabidopsis* cells (about 40 mg protein) were fractionated on a Q-Sepharose High Performance column (1.6 \times 5 cm) using a step-gradient of NaCl (0 to 1 M) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 1 mM dithiothreitol. Boxplots show the distribution of proteins for 4 independent analyses. (B) SDS-PAGE analysis of proteins from the 10 fractions. Each gel shows protein profiles of one of the four independent fractionation experiments. M, molecular mass markers in kDa.

and in only one out of three experiments, and possibly corresponding to very low abundant proteins, were not analysed further. Finally, we retained 3676 proteins (Table S1, ESI†). Protein distribution was analysed in the different fractions: 1217 proteins (33.1%) were present in only one fraction and referred to as 'specific proteins', 820 proteins (22.3%) were present in two fractions, 432 proteins (11.8%) were present in three fractions, and the rest were present in more than three fractions (Fig. 3A). A hive plot representation was also used as a rational visualization method for drawing the protein distribution (Fig. 3B).⁴¹ A careful analysis of the data showed that abundant proteins, *i.e.* those identified with high weighted spectral count (WSC) values, were distributed in several fractions. The higher the WSC, the more proteins present in a larger number of fractions (Fig. S1, ESI†).

Properties of native proteins fractionated by anion-exchange chromatography

The behaviour and properties of the 3676 Arabidopsis proteins eluted from the Q-Sepharose column were analysed. The elution profiles of all the identified proteins are displayed in Table S1 (ESI†) and some examples of proteins involved in the antioxidative stress response and metal homeostasis are shown in Fig. S2 (ESI†). As already mentioned, the fractionation procedure allowed for a significant enrichment of the proteins. The enrichment factor, calculated on the basis of total proteins in the cell-soluble extract and the different fractions, ranged from 7 in F200 to 14 in F100 for specific proteins (eluted in a single fraction). As an example, three ferritin isoforms that were only detected in F200 were enriched 7-fold (Fig. S2, ESI†). The fractionation procedure also permitted us to separate different

isoenzymes from the cell-soluble protein extract. As an example, the two isoforms of glutathione reductase were separated from each other (Fig. S2, ESI†), allowing their individual kinetic and biochemical characterization.

As protein elution during AEC is correlated with the charge of native proteins, we presented the elution profiles according to the protein theoretical isoelectric point (pI). Representations of the pI of specific proteins and of the whole set of proteins in each fraction are shown in Fig. S3 and theoretical pI values are reported in Table S1 (ESI†). As expected, proteins eluted first from the column have a higher pI than those eluted at higher salt concentrations. For example, the median values of specific proteins identified in F50 and F400 were 8.12 and 5.69, respectively (Fig. S3, ESI†). In each fraction, several proteins had a pI far from the expected average pI of the fraction. The behaviour of these proteins may be due to the theoretical pI values that are not representative of the distribution of charges at their surface. Another possibility is that some of these proteins are part of protein complexes. For example, several proteins with a high pI were present in F400 (average pI 5.69). Among them, we found the ELF7 protein component of the RNA polymerase II-associated factor 1 complex (PAF1-C, pI 9.20) and the chloroplast molecular chaperonin CPN60 α 2 (pI 8.15). Other proteins from these complexes were found in the F400 fraction, as well as components of the hexameric PAF1-C complex (VIP3, VIP4 and VIP6/ELF8)⁴² or the chloroplast chaperonin (CPN60 α 1, β 1, β 2 and β 3).

Survey of the Arabidopsis metalloproteome

To gain insight into the metalloproteome of Arabidopsis cells, we analysed the elution profile of metals retained by soluble

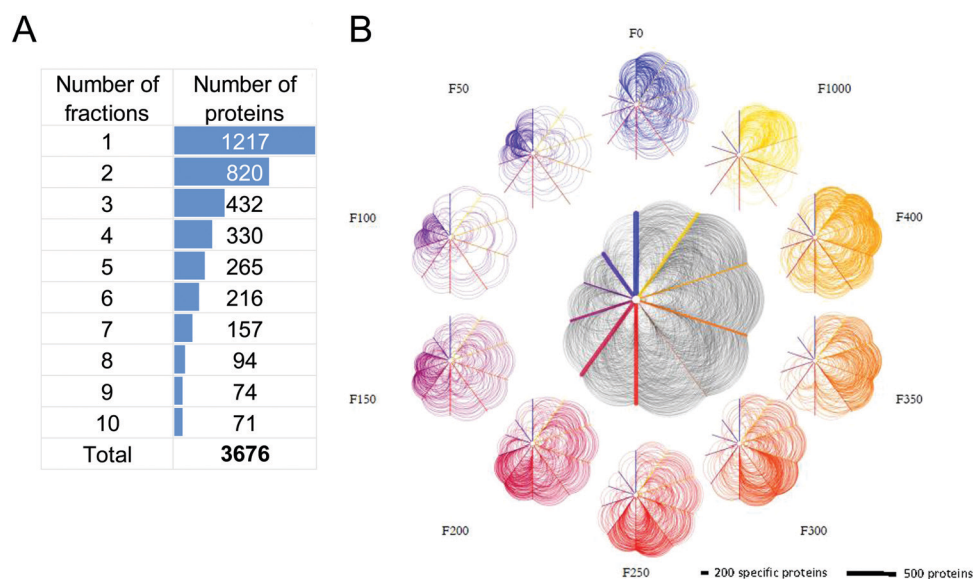


Fig. 3 Distribution of proteins identified by MS/MS in fractions from anion-exchange chromatography. (A) Resolution of the AEC column as estimated by the number of fractions in which the proteins identified by MS/MS are distributed. More than 55% of the identified proteins are present in one or two fractions eluted from the Q-Sepharose column. (B) Hive plot representation of protein distribution in fractions from the AEC column. The distribution of proteins in the different fractions is represented as a network and was created using the HiveR R package.⁶² Linear axes represent the fractions (F0 to F1000); their length is proportional to the number of identified proteins in the fraction and their thickness is proportional to the number of proteins specifically present in the fraction. The curved lines connecting two axes symbolize the presence of the same protein in both fractions.

proteins after AEC. The analysis was done using soluble proteins from control and U-treated cells. First, we found that Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn were present in the 10 fractions from Arabidopsis cells treated or not with U (Fig. 4). This result is consistent with the overall abundance of metal-binding proteins in proteomes.^{26,27} In contrast, Mo was found almost entirely in F200 (98–99% of the total Mo eluted from the column), with trace amounts in F0, F250, and F300 (Fig. 4). Second, we showed that some U that was present in the soluble fraction of Arabidopsis cells (Table 1) was associated with proteins. Indeed, U was detected in several fractions eluted from the Q-Sepharose column. Putative U-binding proteins were mainly present in five fractions (F0, F300, F350, F400 and F1000) and detected in trace amounts in F50 to F250 (Fig. 4). F50 to F1000 were concentrated by ultrafiltration using centrifugal filter devices equipped with a 3 kDa cut-off membrane to verify that U was bound to proteins. For all fractions except F1000, more than 90% U was recovered in the concentrated protein fractions, thus confirming the interaction of U with proteins. For F1000, up to 80% U was recovered in the filtrate, suggesting that some U found in the cell extract was not associated with proteins, or loosely bound to proteins, and eluted from the AEC column with a high salt concentration.

The elution profiles of some metals associated with soluble proteins were modified in cells challenged with U as compared with control cells (Fig. 4). This result suggested that in some cases, U might have competed *in vivo* with essential elements for binding to specific metalloproteins and, in other cases, that U stress triggered perturbations of metal homeostasis leading to an abnormal steady-state level of some metalloproteins.

The elution of Mo as a major peak in F200 (Fig. 4) was surprising since Arabidopsis proteins known to bind the molybdenum cofactor (MoCo)⁶³ were identified by MS/MS in different fractions eluted from the Q-Sepharose column, with the exception of F200 (Fig. S4, ESI†). This finding suggested that F200 could contain a previously uncharacterized plant Mo-binding protein. With the aim of identifying this protein by using other chromatographic steps, F200 was concentrated by ultrafiltration using a 3 kDa cut-off membrane. We found that most of the Mo was present in the filtrate and, after several cycles of dilution/concentration, F200 contained only residual amounts of Mo. This result suggested that Mo from F200 was not bound tightly to protein(s) but rather present as a free ion or bound to low-molecular weight compounds (*e.g.* MoCo). To test this hypothesis,

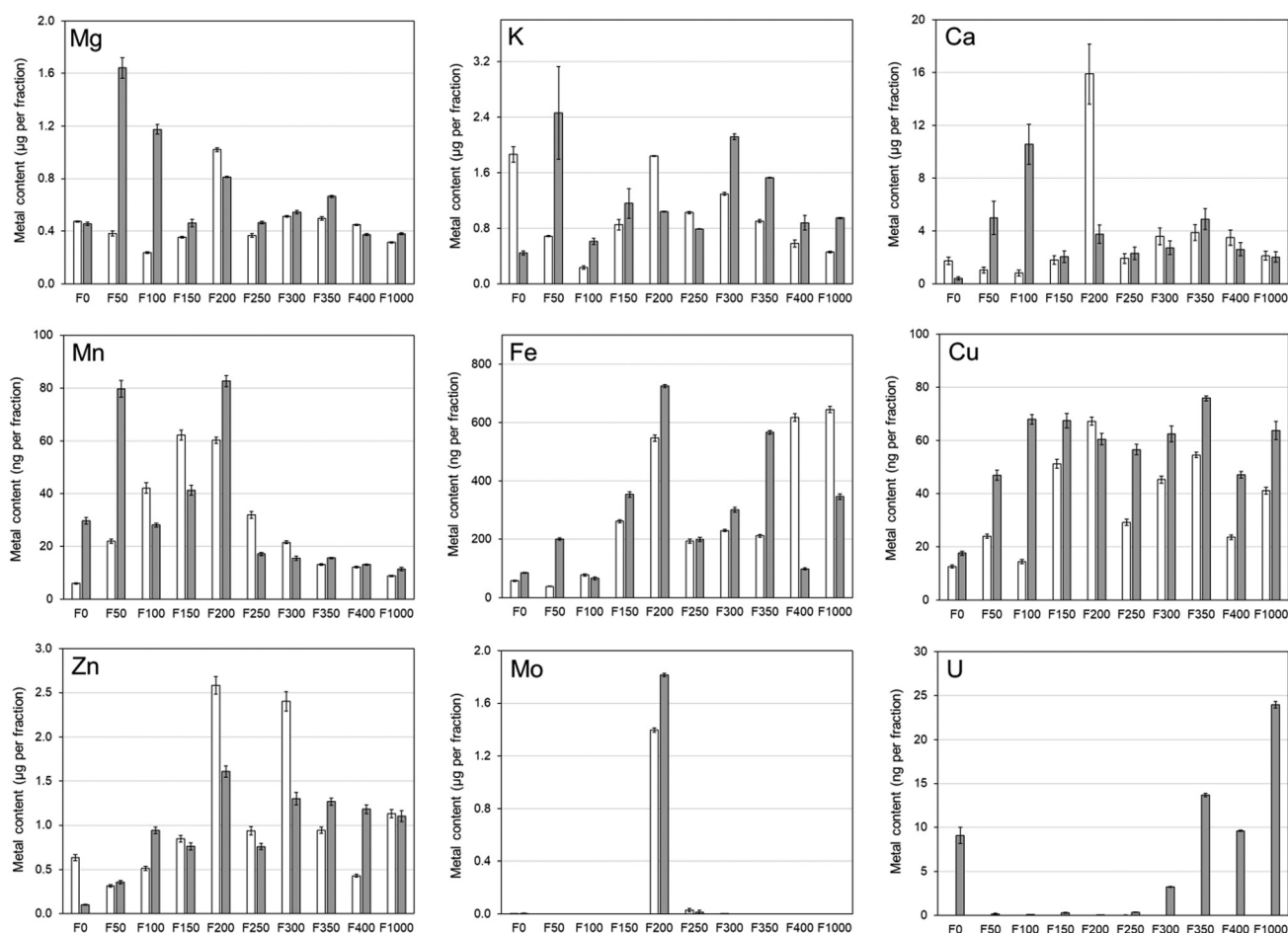


Fig. 4 Elemental profiling in fractions from anion-exchange chromatography. Soluble proteins (40 mg) from Arabidopsis cells grown for 24 h in the absence (U0) or presence of 50 μ M uranyl nitrate (U50) were resolved by AEC on a Q-Sepharose column. Metals were extracted from proteins in 10% (v/v) nitric acid and analysed by ICP-MS. The elution profiles of each element in control (\square) and U-challenged cells (\blacksquare) are shown. Mean \pm SD for $n = 3$ elemental analyses of representative AEC experiments.

we analysed the behaviour of free molybdate (MoO_4^{2-}) on the Q-Sepharose column. We found that free molybdate was eluted as a single Mo peak in F200 (not shown). It is therefore possible that Mo detected in F200 from the protein fractionation experiments (Fig. 4) could correspond to a free metal form.

Analysis of post-translational modifications in Arabidopsis sub-proteomes

AEC fractionation was used to analyse the pattern of post-translationally modified proteins in Arabidopsis cells exposed

to U stress. Toward this aim, Western-blots were performed using proteins from Arabidopsis cells challenged or not with uranyl nitrate and with antibodies recognizing trimethylated lysine (Lys) (Fig. 5B) or asymmetrically dimethylated arginine (Arg) (Fig. 5C). The post-translational methylation of Lys and Arg residues in proteins has essential regulatory functions in all cellular processes and is predicted to play a crucial role in enabling plants to cope with biotic and abiotic stresses.^{43–45}

In support of this assumption, we have recently shown that protein Lys methylation contributes to modulating the

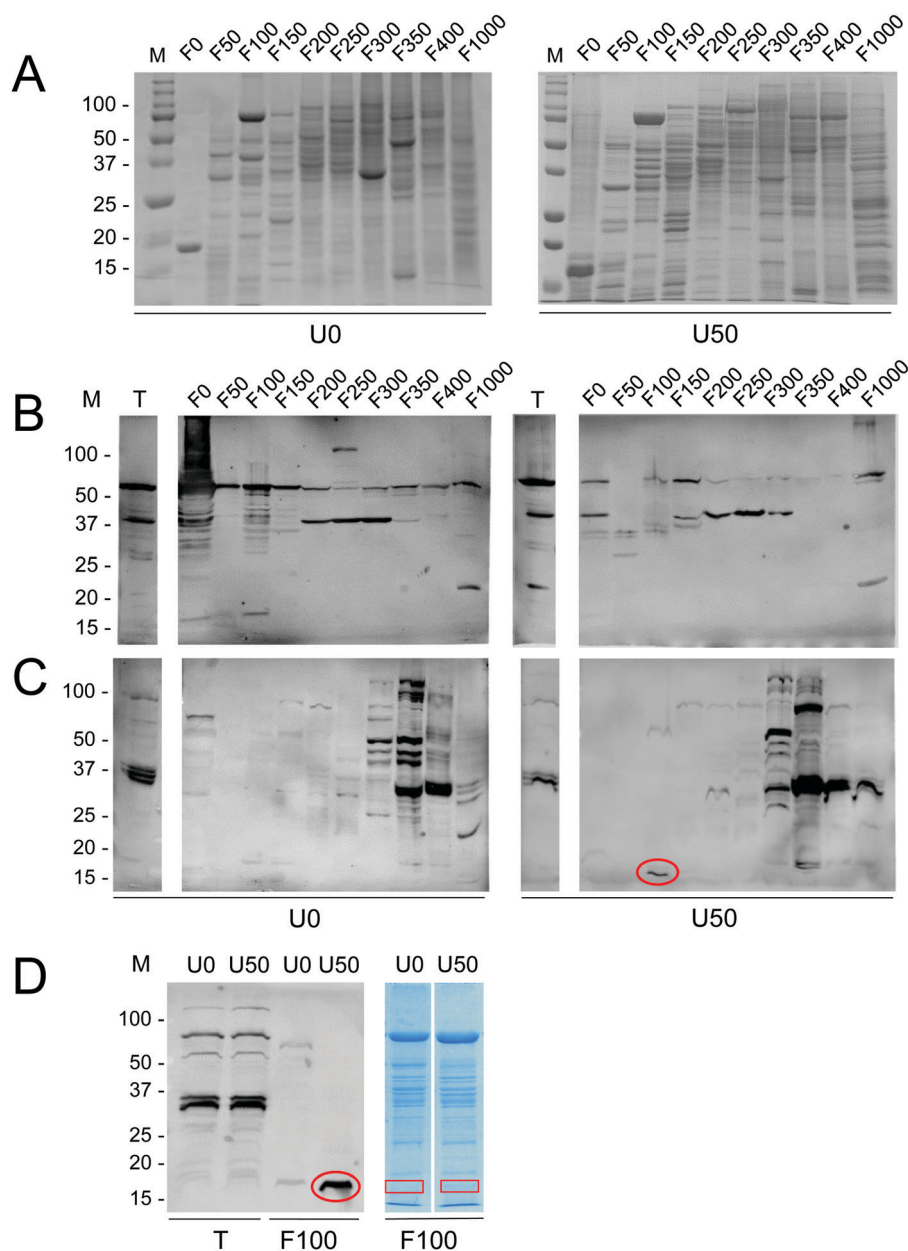


Fig. 5 Immunodetection of lysine and arginine methylated proteins in Arabidopsis cells challenged with U. (A) SDS-PAGE analysis of soluble proteins extracted from Arabidopsis cells grown for 24 h in the absence (U0) or presence of 50 μM uranyl nitrate (U50) and resolved by AEC on a Q-Sepharose column. Gel image for U0 is similar to the one in Fig. 2B, upper-right panel. (B) Immunodetection of trimethyl-Lys in AEC fractions. (C) Immunodetection of asymmetric dimethyl-Arg in AEC fractions. (D) Closer views of SDS-PAGE and immunoblot results for the fraction eluted at 100 mM NaCl. The band excised from the gel for MS/MS identification of Arg-methylated proteins is outlined in red. M, molecular mass markers, in kDa; T, total soluble extract; F0 to F1000, fractions eluted from the Q-Sepharose column from 0 (run-off) to 1000 mM NaCl.

response of Arabidopsis plants to a stress induced by cadmium.⁴⁶ Immunoblots with total soluble proteins revealed a few methylated polypeptides, whereas those realized with the fractions separated by AEC showed additional methylated proteins. We further analysed the dimethylated Arg signal that was detected in a 15–20 kDa polypeptide in F100 and that was more strongly immuno-labelled in U-stressed than in control cells (Fig. 5D). With the aim of identifying this polypeptide, F100 fractions from untreated and U-treated cells were resolved by SDS-PAGE; bands at 15–20 kDa were excised from the gel, and digested with trypsin, and peptides were analysed by LC-MS/MS using a Q-Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer. To identify methyl peptides, MS/MS spectra were searched for mass shifts corresponding to mono and dimethylation of Arg residues but also mono, di and trimethylation of Lys residues in order to minimize assignment errors for peptides bearing both amino acids (Table S2, ESI†).⁴⁷ The analysis identified ten dimethyl Arg and 30 monomethyl Arg peptides belonging to 33 distinct proteins, of which eight had the expected size (<20 kDa). A single protein was found dimethylated at the level of Arg residues in much higher proportions in F100 in the U-treated cells (F100_U50) compared with F100 from the untreated control cells (F100_U0), which matches well with the western blot profile (Fig. 5D and Table S2, ESI†). Indeed, the 40S ribosomal protein S10-3 (RPS10C) was dimethylated at the level of Arg159 and Arg163 residues in F100_U50. These residues were also detected in their unmethylated forms, and in equivalent proportions, in this fraction. In contrast, Arg159 and Arg163 were detected exclusively in their unmethylated state in F100_U0. A second protein, the actin-depolymerizing factor 1 (ADF1), was found monomethylated at the level of Arg66 in F100_U50 in higher proportions than in F100_U0. However, since the asymmetric dimethyl Arg monoclonal antibody used in our experiments is highly specific and in particular does not cross-react with monomethyl Arg residues,^{48–50} the hypothesis according to which ADF1 could be the labelled band detected by the western blot in F100_U50 could be ruled out. Taken together, these data indicated that the steady-state level and/or the methylation stoichiometry of Arg159 and Arg163 in RPS10C are increased in Arabidopsis cells challenged with U.

Conclusion

In the present work, we have developed an ionic, metalloproteomic, and biochemical toolbox to analyse the consequences of uranyl ion stress on the proteome of Arabidopsis cells. First, the ionic analysis of Arabidopsis cells challenged with U showed that the homeostasis of K, Mg, Fe, Mn and Zn was significantly affected, with a reduction in pool size measured in whole cells, and/or protoplasts, and/or cell-soluble fractions (Table 1). These results are consistent with the perturbations of mineral nutrition observed in the roots of uranyl-treated Arabidopsis plants¹⁴ and they provide further indications about which cellular pools of essential elements are affected by U stress. Ionic data also showed that the cell wall plays a major role in the binding of U and it is probably an important defence mechanism for plants to

limit the accumulation of the radionuclide in the protoplast and cytoplasm, as evidenced for other toxic elements.^{51,52} The accumulation of up to 65% U in the cell wall of Arabidopsis-cultured cells (Fig. 1) is consistent with previous data showing that U-treated plants display important U precipitates in the cell wall of root cells.^{9,10,53} Cell walls are primarily composed of polysaccharides (cellulose, pectins, and hemicelluloses) and (glyco)proteins that provide negatively charged groups on which the uranyl ion may bind. For example, carboxyl groups from low methyl-esterified pectins,⁵¹ together with phosphate groups,¹⁰ confer to the cell wall a high cation exchange capacity. Our ionic data also confirmed previous studies indicating that the plant cell wall acts either as a reservoir of some essential elements, which can possibly be (re)mobilized in response to a nutritional deficiency (*e.g.* Fe),⁵⁴ or as a pool of metabolically-active bound-metals, such as Cu that is bound to proteins involved in cell wall loosening/strengthening mechanisms.⁵⁵

Second, high-resolution fractionation of Arabidopsis cell-soluble proteins into 10 subproteomes by AEC has proven to be a very efficient method for top-down proteomics, invaluable for reducing sample complexity and improving proteome coverage through enrichment of low-abundant proteins. The protein enrichment factors obtained with this procedure (up to 14-fold) are similar to those obtained by purification of plant mitochondria and higher than those for purified chloroplasts.^{56,57} Our data provide the plant biologist community with a useful resource concerning the behaviour and the pre-purification of 3676 protein isoforms (and up to 6603 entries if all proteins are included) with the advantage of being directly recovered in solution for further purification and/or biochemical analysis.

Third, despite the low amount of U that reached the cell-soluble fraction (less than 2% under our experimental conditions), we showed that several pools of Arabidopsis proteins are able to bind the radionuclide tightly. Uranium has been found in several fractions from the AEC but the complexity of these protein samples is still too high to identify Arabidopsis uranyl ion-binding proteins. However, U has been shown to bind to Ca-binding proteins (*e.g.* calmodulin) or Fe-binding proteins (*e.g.* ferritin) in eukaryotes or bacterial cells.^{30,58} Fractions containing homologs of these proteins in Arabidopsis contain varying amounts of U (Fig. 4), suggesting that calmodulin isoforms (CAM1 and CAM7 eluted in F300 to F1000) or ferritin (eluted in F200) could also be plant uranyl ion-binding proteins. However, at this stage of the purification process, the U/Ca or U/Fe ratio is too low to conclude anything about the nature of U–protein complexes. Further purification steps should be used following AEC fractionation to identify authentic plant proteins able to bind uranyl ions *in vivo*.

Last, the fractionation procedure allowed us to analyse the Lys and Arg methylation status of proteins from Arabidopsis cells challenged with U. We showed that U induced a modification of the methylation pattern of some proteins, as previously observed in Arabidopsis plants treated with cadmium.⁴⁶ Also, MS/MS analysis identified that the 40S ribosomal protein RPS10C was dimethylated at Arg159 and Arg163 following U stress. This is the first evidence of methylation of this protein in

plants despite the comprehensive analysis of post-translational modifications of the 80S cytosolic ribosome.⁵⁹ Interestingly, methylation of the human ortholog RPS10 at equivalent Arg positions (Arg158 and Arg160) plays a role in the proper assembly of ribosomes, protein synthesis, and optimal cell proliferation.⁶⁰ The human protein Arg methyltransferase 5 (PRMT5) is responsible for the methylation of RPS10. The homolog of PRMT5 in Arabidopsis, AtPRMT5, plays a role in the methylation of histone H4R3 and is involved in the control of flowering time.⁶¹ RPS10C could be an alternative substrate of AtPRMT5 in Arabidopsis and it is possible that this protein Arg methyltransferase plays a role in the regulation of the plant response to U stress. This finding, together with recent evidence that protein Lys methylation modulates the response of Arabidopsis to cadmium,⁴⁶ suggests that post-translational modifications are essential mechanisms for plants to cope with metals. The present toolbox is a starting platform to further characterize the role of these modifications in the metal stress response in Arabidopsis.

Financial source

This work was funded by grants from the CEA Toxicology Programme and from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE34-0007, GreenU project; ANR-10-LABX-49-01, Labex GRAL; ANR-17-EURE-0003, CBH-EUR-GS).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

References

- H. Vandenhove, European sites contaminated by residues from the ore-extracting and-processing industries, *Int. Congr. Ser.*, 2002, **1225**, 307–315.
- M. Anke, O. Seeber, R. Mueller, U. Schaefer and J. Zerull, Uranium transfer in the food chain from soil to plants, animals and man, *Chem. Erde*, 2009, **69**, 75–90.
- E. Schnug and B. G. Lottermoser, Fertilizer-Derived Uranium and its Threat to Human Health, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 2433–2434.
- N. Gao, Z. Huang, H. Liu, J. Hou and X. Liu, Advances on the toxicity of uranium to different organisms, *Chemosphere*, 2019, **237**, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124548.
- R. G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533–3539.
- A. Garai and P. Delangle, Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, **203**, 110936.
- S. D. Ebbs, D. J. Brady and L. V. Kochian, Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants, *J. Exp. Bot.*, 1998, **49**, 1183–1190.
- N. Vanhoudt, H. Vandenhove, K. Smeets, T. Remans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld and A. Cuypers, Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol. Biochem.*, 2008, **46**, 987–996.
- J. Misson, P. Henner, M. Morello, M. Floriani, T. D. Wu, J. L. Guerquin-Kern and L. Fevrier, Use of phosphate to avoid uranium toxicity in Arabidopsis thaliana leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability, *Environ. Exp. Bot.*, 2009, **67**, 353–362.
- J. Laurette, C. Larue, I. Llorens, D. Jaillard, P. H. Jouneau, J. Bourguignon and M. Carrière, Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: A XAS and TEM study, *Environ. Exp. Bot.*, 2012, **77**, 87–95.
- J. Laurette, C. Larue, C. Mariet, F. Brisset, H. Khodjad, J. Bourguignon and M. Carrière, Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: Oilseed rape, sunflower and wheat, *Environ. Exp. Bot.*, 2012, **77**, 96–107.
- N. Vanhoudt, A. Cuypers, N. Horemans, T. Remans, K. Opendakker, K. Smeets, D. M. Bello, M. Havaux, J. Wannijn, M. Van Hees, J. Vangronsveld and H. Vandenhove, Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in Arabidopsis thaliana seedlings. Part II: responses in the leaves and general conclusions, *J. Environ. Radioact.*, 2011, **102**, 638–645.
- N. Vanhoudt, N. Horemans, G. Biermans, E. Saenen, J. Wannijn, R. Nauts, M. Van Hees and H. Vandenhove, Uranium affects photosynthetic parameters in Arabidopsis thaliana, *Environ. Exp. Bot.*, 2014, **97**, 22–29.
- N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, D. M. Bello, M. Van Hees, J. Wannijn, R. Carleer, J. Vangronsveld and A. Cuypers, Uranium induced effects on development and mineral nutrition of Arabidopsis thaliana, *J. Plant Nutr.*, 2011, **34**, 1940–1956.
- N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, T. Remans, K. Opendakker, K. Smeets, D. M. Bello, J. Wannijn, M. Van Hees, J. Vangronsveld and A. Cuypers, Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in Arabidopsis thaliana seedlings. Part I: responses in the roots, *J. Environ. Radioact.*, 2011, **102**, 630–637.
- I. Aranjuelo, F. Doustaly, J. Cela, R. Porcel, M. Mueller, R. Aroca, S. Munne-Bosch and J. Bourguignon, Glutathione and transpiration as key factors conditioning oxidative stress in Arabidopsis thaliana exposed to uranium, *Planta*, 2014, **239**, 817–830.
- E. Saenen, N. Horemans, N. Vanhoudt, H. Vandenhove, G. Biermans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld and A. Cuypers, The pH strongly influences the uranium-induced effects on the photosynthetic apparatus of Arabidopsis thaliana plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 2014, **82**, 254–261.
- E. Saenen, N. Horemans, N. Vanhoudt, H. Vandenhove, G. Biermans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld and A. Cuypers, Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in Arabidopsis thaliana after Uranium Exposure at pH 7.5, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 12405–12423.
- N. B. C. Serre, C. Alban, J. Bourguignon and S. Ravel, Uncovering the physiological and cellular effects of uranium

- on the root system of *Arabidopsis thaliana*, *Environ. Exp. Bot.*, 2019, **157**, 121–130.
- 20 R. Tewari, N. Horemans, R. Nauts, J. Wannijn, M. Van Hees and H. Vandenhove, Uranium exposure induces nitric oxide and hydrogen peroxide generation in *Arabidopsis thaliana*, *Environ. Exp. Bot.*, 2015, **120**, 55–64.
 - 21 F. Doustaly, C. Combes, J. Fiévet, S. Berthet, V. Hugouvieux, O. Bastien, I. Aranjuelo, N. Leonhardt, C. Rivasseau, M. Carrière, A. Vavasseur, J. P. Renou, Y. Vandenbrouck and J. Bourguignon, Uranium perturbs signaling and iron uptake response in *Arabidopsis thaliana* roots, *Metallomics*, 2014, **6**, 809–821.
 - 22 S. Berthet, F. Villiers, C. Alban, N. B. C. Serre, J. Martin-Laffon, S. Figuet, A. M. Boisson, R. Bligny, M. Kuntz, G. Finazzi, S. Ravanel and J. Bourguignon, *Arabidopsis thaliana* plants challenged with uranium reveal new insights into iron and phosphate homeostasis, *New Phytol.*, 2018, **217**, 657–670.
 - 23 J.-L. Lai, Z.-W. Liu and X.-G. Luo, A metabolomic, transcriptomic profiling, and mineral nutrient metabolism study of the phytotoxicity mechanism of uranium, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **386**, 121437.
 - 24 J. P. Barnett, D. J. Scanlan and C. A. Blindauer, Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 3311–3322.
 - 25 A. Hagege, T. N. S. Huynh and M. Hébrant, Separative techniques for metalloproteomics require balance between-separation and perturbation, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2015, **64**, 64–74.
 - 26 W. Shi and M. R. Chance, Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 144–148.
 - 27 S. M. Yannone, S. Hartung, A. L. Menon, M. W. W. Adams and J. A. Tainer, Metals in biology: defining metalloproteomes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, **23**, 89–95.
 - 28 C. C. S. Kung, W. N. Huang, Y. C. Huang and K. C. Yeh, Proteomic survey of copper-binding proteins in *Arabidopsis* roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry, *Proteomics*, 2006, **6**, 2746–2758.
 - 29 Y.-F. Tan, N. O'Toole, N. L. Taylor and A. H. Millar, Divalent Metal Ions in Plant Mitochondria and Their Role in Interactions with Proteins and Oxidative Stress-Induced Damage to Respiratory Function, *Plant Physiol.*, 2010, **152**, 747–761.
 - 30 A. Cvetkovic, A. L. Menon, M. P. Thorgersen, J. W. Scott, F. L. Poole, F. E. Jenney, W. A. Lancaster, J. L. Praissman, S. Shanmukh, B. J. Vaccaro, S. A. Trauger, E. Kalisiak, J. V. Apon, G. Siuzdak, S. M. Yannone, J. A. Tainer and M. W. W. Adams, Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized, *Nature*, 2010, **466**, 779–782.
 - 31 J. P. Barnett, D. J. Scanlan and C. A. Blindauer, Identification of major zinc-binding proteins from a marine cyanobacterium: insight into metal uptake in oligotrophic environments, *Metallomics*, 2014, **6**, 1254–1268.
 - 32 D. J. Hare, A. Grubman, T. M. Ryan, A. Lothian, J. R. Liddell, R. Grimm, T. Matsuda, P. A. Doble, R. A. Cherny, A. I. Bush, A. R. White, C. L. Masters and B. R. Roberts, Profiling the iron, copper and zinc content in primary neuron and astrocyte cultures by rapid online quantitative size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Metallomics*, 2013, **5**, 1656–1662.
 - 33 M. Xu, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski and S. Mounicou, Development of a non-denaturing 2D gel electrophoresis protocol for screening in vivo uranium-protein targets in *Procambarus clarkii* with laser ablation ICP MS followed by protein identification by HPLC-Orbitrap MS, *Talanta*, 2014, **128**, 187–195.
 - 34 Y. Eb-Levadoux, S. Frelon, O. Simon, C. Arnaudguilhem, R. Lobinski and S. Mounicou, In vivo identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure, *Metallomics*, 2017, **9**, 525–534.
 - 35 C. Vidaud, M. Robert, E. Paredes, R. Ortega, E. Avazeri, L. Jing, J.-M. Guigonis, C. Bresson and V. Malard, Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells, *Arch. Toxicol.*, 2019, **93**, 2141–2154.
 - 36 M. M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
 - 37 V. Dupierris, C. Masselon, M. Court, S. Kieffer-Jaquinod and C. Bruley, A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa, *Bioinformatics*, 2009, **25**, 1980–1981.
 - 38 A.-M. Hesse, V. Dupierris, C. Adam, M. Court, D. Barthe, A. Emadali, C. Masselon, M. Ferro and C. Bruley, hEIDI: An Intuitive Application Tool To Organize and Treat Large-Scale Proteomics Data, *J. Proteome Res.*, 2016, **15**, 3896–3903.
 - 39 S. Tyanova, T. Temu and J. Cox, The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**, 2301–2319.
 - 40 H. Canut, C. Albenne and E. Jamet, Isolation of the Cell Wall, *Methods Mol. Biol.*, 2017, **1511**, 171–185.
 - 41 M. Krzywinski, I. Birol, S. J. M. Jones and M. A. Marra, Hive plots-rational approach to visualizing networks, *Briefings Bioinf.*, 2012, **13**, 627–644.
 - 42 W. Antosz, A. Pfab, H. F. Ehrnsberger, P. Holzinger, K. Koellen, S. A. Mortensen, A. Bruckmann, T. Schubert, G. Laengst, J. Griesenbeck, V. Schubert, M. Grasser and K. D. Grasser, The Composition of the *Arabidopsis* RNA Polymerase II Transcript Elongation Complex Reveals the Interplay between Elongation and mRNA Processing Factors, *Plant Cell*, 2017, **29**, 854–870.
 - 43 N. B. C. Serre, C. Alban, J. Bourguignon and S. Ravanel, An outlook on lysine methylation of non-histone proteins in plants, *J. Exp. Bot.*, 2018, **69**, 4569–4581.
 - 44 J. Dahan, E. Koen, A. Dutartre, O. Lamotte and S. Bourque, *Abiotic Stress Response in Plants: Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, 2011.
 - 45 K. Kosova, P. Vitamvas, I. T. Prasil and J. Renaut, Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response, *J. Proteomics*, 2011, **74**, 1301–1322.

- 46 N. B. C. Serre, M. Sarthou, O. Gigarel, S. Figuet, M. Corso, J. Choulet, V. Rofidal, C. Alban, V. Santoni, J. Bourguignon, N. Verbruggen and S. Ravanel, Protein lysine methylation contributes to modulating the response of sensitive and tolerant Arabidopsis species to cadmium stress, *Plant, Cell Environ.*, 2020, **43**, 760–774, DOI: 10.1111/pce.13692.
- 47 C. Alban, M. Tardif, M. Mininno, S. Brugiére, A. Gilgen, S. Ma, M. Mazzoleni, O. Gigarel, J. Martin-Laffon, M. Ferro and S. Ravanel, Uncovering the Protein Lysine and Arginine Methylation Network in Arabidopsis Chloroplasts, *PLoS One*, 2014, **9**, 13.
- 48 S. Dhar, V. Vemulapalli, A. N. Patananan, G. L. Huang, A. Di Lorenzo, S. Richard, M. J. Comb, A. Guo, S. G. Clarke and M. T. Bedford, Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 1311.
- 49 M. Bremang, A. Cuomo, A. M. Agresta, M. Stugiewicz, V. Spadotto and T. Bonaldi, Mass spectrometry-based identification and characterisation of lysine and arginine methylation in the human proteome, *Mol. Biosyst.*, 2013, **9**, 2231–2247.
- 50 A. L. Guo, H. B. Gu, J. Zhou, D. Mulhern, Y. Wang, K. A. Lee, V. Yang, M. Aguiar, J. Kornhauser, X. Y. Jia, J. M. Ren, S. A. Beausoleil, J. C. Silva, V. Vemulapalli, M. T. Bedford and M. J. Comb, Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation, *Mol. Cell. Proteomics*, 2014, **13**, 372–387.
- 51 M. Krzeslowska, The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy, *Acta Physiol. Plant.*, 2011, **33**, 35–51.
- 52 H. Le Gall, F. Philippe, J.-M. Domon, F. Gillet, J. Pelloux and C. Rayon, Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress, *Plants*, 2015, **4**, 112–166.
- 53 E. El Hayek, A. J. Brearley, T. Howard, P. Hudson, C. Torres, M. N. Spilde, S. Cabaniss, A.-M. S. Ali and J. M. Cerrato, Calcium in Carbonate Water Facilitates the Transport of U(VI) in Brassica juncea Roots and Enables Root-to-Shoot Translocation, *ACS Earth Space Chem.*, 2019, **3**, 2190–2196.
- 54 C. Curie and S. Mari, New routes for plant iron mining, *New Phytol.*, 2017, **214**, 521–525.
- 55 B. Printz, S. Lutts, J.-F. Hausman and K. Sergeants, Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
- 56 J. Puyaubert, L. Denis and C. Alban, Dual targeting of Arabidopsis holocarboxylase synthetase1: A small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting, *Plant Physiol.*, 2008, **146**, 478–491.
- 57 S. Jabrin, S. Ravanel, B. Gambonnet, R. Douce and F. Rebeille, One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development, *Plant Physiol.*, 2003, **131**, 1431–1439.
- 58 L. Le Clainche and C. Vita, Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide, *Environ. Chem. Lett.*, 2006, **4**, 45–49.
- 59 A. J. Carroll, J. L. Heazlewood, J. Ito and A. H. Millar, Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification, *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, **7**, 347–369.
- 60 J. Q. Ren, Y. Q. Wang, Y. H. Liang, Y. Q. Zhang, S. L. Bao and Z. H. Xu, Methylation of Ribosomal Protein S10 by Protein-arginine Methyltransferase 5 Regulates Ribosome Biogenesis, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 12695–12705.
- 61 X. Wang, Y. Zhang, Q. B. Ma, Z. L. Zhang, Y. B. Xue, S. L. Bao and K. Chong, SKB1-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in Arabidopsis, *EMBO J.*, 2007, **26**, 1934–1941.
- 62 B. A. Hanson, HiveR: 2D and 3D Hive Plots for R, 2011, R package version 0.1-3.
- 63 F. Bittner, Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron, *Front. Plant Sci.*, 2014, **5**, DOI: 10.3389/fpls.2014.00028.

Résumé

L'uranium est un radionucléide naturellement présent dans la croûte terrestre. Il est principalement redistribué dans l'environnement par les activités anthropiques comme l'extraction de l'uranium ou de phosphate, l'industrie nucléaire, les activités militaires ou encore la fertilisation des sols. L'uranium peut localement s'accumuler à des concentrations pouvant entraîner des risques potentiels pour les écosystèmes, agrosystèmes, et la santé humaine. En effet, ce radionucléide présente des risques chimiotoxiques et radiotoxiques pour tous les êtres vivants. Même si l'uranium n'est pas essentiel pour les plantes, il est prélevé dans le sol par celles-ci, incorporé dans la biomasse et, à terme, entre dans la chaîne alimentaire représentant un risque sanitaire pour les êtres vivants. Le but de mon projet de thèse est d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires gouvernant le devenir de l'uranium dans la plante. Ce projet se décompose en deux volets : un premier ayant pour objectif l'identification de transporteurs d'uranium et un second l'identification des cibles cellulaires protéiques de l'uranium dans la plante.

Dans le premier volet, j'ai utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme eucaryote modèle permettant de nous affranchir des contraintes intrinsèques à l'étude de la plante. La grande conservation du patrimoine génétique entre ces deux organismes rend cet organisme modèle particulièrement pertinent pour l'identification de transporteurs métalliques. J'ai identifié, pour la première fois, un transporteur responsable de l'entrée d'uranium dans une cellule vivante. Ainsi, après avoir mis en évidence et caractérisé un transport d'uranium dépendant du métabolisme chez la levure, des expériences de compétition métallique avec des métaux essentiels m'ont permis d'identifier les voies d'absorption de calcium, fer et cuivre comme points d'entrée possibles de l'uranium. Une étude de mutants affectés dans ces voies de transport a révélé que les mutants *Amid1*, *Δcch1* et *Δftr1*, respectivement affectés dans le transport de calcium (canal MID1/CCH1) et de Fe^{3+} (FTR1), présentaient également une absorption d'uranium fortement réduite. L'expression ectopique du gène sauvage *MID1* dans le mutant *Amid1* a permis de rétablir les niveaux d'absorption d'uranium de la souche sauvage démontrant l'implication du canal calcique MID1/CCH1 dans l'entrée d'uranium dans la levure.

Dans le second volet, 53 protéines candidates pour la fixation de l'uranium *in vivo* ont été identifiées en utilisant des approches métallogénomiques combinant fractionnements chromatographiques, identification des protéines par spectrométrie de masse et des métaux par spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma. Ces cibles cellulaires pourraient être responsables de la toxicité de l'uranium dans la plante ou jouer un rôle dans sa détoxification. Une de ces protéines candidates, GRP7, a été surproduite et caractérisée plus en détail. Après avoir démontré sa capacité à lier l'uranium *in vitro*, son analyse structurale a été initiée par résonance magnétique nucléaire structurale dans le but d'identifier les sites de fixation de l'uranium.

Ensemble, ces nouvelles connaissances fondamentales pourraient conduire au développement de plusieurs approches biotechnologiques pour, à terme, mieux contrôler la dissémination de l'uranium dans l'environnement.

Abstract

Uranium is a naturally-occurring radionuclide in the Earth's crust. It is mainly redistributed in the environment by anthropogenic activities such as uranium and phosphate mining, nuclear industry, military activities and soil fertilization. Uranium may locally accumulate to concentrations that can lead to potential risks for ecosystems, agrosystems, and ultimately human health. Indeed, this radionuclide is chemotoxic and potentially radiotoxic (natural uranium has low specific activity) for all living organisms. Even if uranium is not essential for plants, it is taken up from the soil, incorporated into the biomass, and eventually, can enter the food chain. Thus, contamination of soils by uranium and its absorption by plants represent a significant health risk for humans. The aim of my PhD project is to improve the knowledge of the molecular mechanisms governing the fate of uranium in plant. This project is divided into two parts: the first aims to identify uranium transporters, the second to identify proteins that could be cellular targets for uranium.

In the first part, we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a unicellular eucaryote model that allows us to overpass constraints related to study complex multicellular organisms as higher plants. This organism is particularly relevant to identify metal transporters in plants because of the great conservation of genetic heritage between these two organisms. Thus, we have identified, for the first time, a transporter capable of transporting uranium in a living organism. First, a metabolism-dependent uranium transport was highlighted and characterized. Then, competitive experiments with essential metals allowed us to identify calcium, iron and copper absorption pathways as potential routes for uranium uptake. A study of various mutants revealed that *Amid1*, *Acch1* and *Aftr1* mutants, affected in calcium (MID1/CCH1 channel) and Fe^{3+} (FTR1) transport respectively, also exhibited highly reduced uranium uptake. Ectopic expression of the *MID1* gene into the *Amid1* mutant restored uranium uptake levels of the wild type strain demonstrating that the MID1/CCH1 calcium channel is involved in uranium absorption process in yeast.

In the second part, by using metalloproteomic approaches combining column chromatographic fractionation analyses, protein identification by mass spectrometry (LC-MS/MS) and metal quantification by induced coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), we identified 53 candidate proteins for uranium binding *in vivo*. One of these proteins, GRP7, was overproduced and further biochemically characterized in more detail. After demonstrating its ability to bind uranium *in vitro*, we initiated its structural analysis by structural nuclear magnetic resonance (NMR) to identify uranium binding sites.

Taken together, this new fundamental knowledge could lead to the development of several biotechnological approaches to control uranium pollution in the environment.