NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 06 février 2025 par

Nicolas Jans-Robinson

Développement d'un biosenseur fluorescent d'uranyle pour la surveillance environnementale

Discipline
Biologie-Santé

Spécialité
Biotechnologie

École doctorale
ED 62 – Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM)
Equipe Interactions Protéine-Métal (IPM)

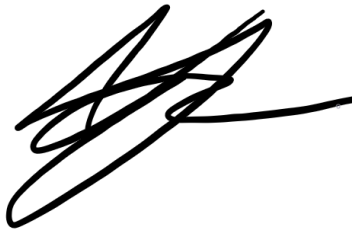
Composition du jury

Claude ALBAN Directeur de recherche - INRAE	Rapporteur
Jean AUPIAIS Directeur de recherche – CEA/DAM	Rapporteur
Maria-Rosa BECCIA Maitre de conférences – Institut de Chimie de Nice	Examinatrice
Hélène JAVOT Directrice de recherche - BIAM	Présidente du jury
Catherine BERTHOMIEU Directrice de recherche - BIAM	Directrice de thèse
Sandrine SAUGE-MERLE Chargée de recherche – BIAM	Co-directrice de thèse
Béatrice GAGNAIRE Chargée de recherche – IRSN - Invitée	Examinatrice
Marguerite MONFORT Chargée de recherche – CEA/DAM - Invitée	Co-encadrante de thèse

Affidavit

Je soussigné, Nicolas Jans-Robinson, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Catherine Berthomieu, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.
Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Manosque, le 4 décembre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste des publications et participations à des congrès

Liste des publications réalisées au cours de la période de thèse :

- Nicolas Jans, Nicolas Brémond, Rym Chérif, Tiffanie Barré, Catherine Berthomieu, Sandrine Sauge-Merle. *Improving the affinity of a fluorescent biosensor for uranyl*. En cours de rédaction

Participation à des congrès et à des écoles au cours de la période de thèse :

- Congrès Imabio "Biosensor Group Meeting", 17 au 18 Novembre 2022, Rennes – Présentation orale

- Ecole d'été Frenchbic Summer School MetBio, 2 au 6 octobre 2022, Carry-le-Rouet – Poster

- Séminaire FOCUSDEM Marcoule, 10 mai 2022, CEA Marcoule - Poster

- Séminaire FOCUSDEM Saclay, 6 au 7 avril 2023, CEA Saclay – Poster

- Séminaire FOCUSDEM Cadarache, 14 au 15 Novembre 2023, CEA Cadarache – Présentation orale

Résumé

L'uranium est un radionucléide naturellement retrouvé dans l'environnement, mais également à la suite d'activités humaines (cycle du nucléaire, exploitation minière, utilisation d'engrais et d'armement). La forme la plus stable de l'uranium en solution aqueuse est le cation uranyle UO_2^{2+}. Il peut être chélaté par divers ions et protéines et peut affecter la santé de nombreux organismes, dont l'homme. La concentration maximale d'uranium établie par l'OMS dans l'eau potable est de 30 µg/L. Par conséquent, la surveillance environnementale est un domaine de recherche essentiel, tant du point de vue environnemental que sanitaire. Les techniques utilisées aujourd'hui pour la détection de l'uranium en solution aqueuse mesurent la concentration totale en uranium, qui diffère de sa fraction biodisponible, définie comme la quantité capable de pénétrer dans un organisme vivant. Il n'existe actuellement aucun système capable de détecter la fraction biodisponible de l'uranium, qui est estimée par des approches théoriques. Les biosenseurs, définis comme des « instruments analytiques combinant une composante biologique et une composante physico-chimique », constituent une alternative aux méthodes de détection habituelles. Parmi les différents types de biosenseurs, les biosenseurs « cellule entière » ou « whole-cell » peuvent détecter la fraction biodisponible d'un composé. Un biosenseur d'uranyle (SF1) inspiré d'un biosenseur de calcium a été développé au sein de l'équipe IPM. Il est constitué d'une calmoduline (CaM) modifiée pour fixer l'uranyle fusionnée à deux protéines fluorescentes (FP) et peut détecter des concentrations micromolaires d'uranyle de façon ratiométrique par une approche de transfert de fluorescence (FRET) entre les deux FP.

Au cours de ce projet, nous avons cherché à exprimer ce biosenseur chez le poisson zèbre *Danio rerio*, dans l'optique de développer un outil capable de détecter l'uranium biodisponible dans l'eau par une approche d'édition du génome en ciblant trois gènes, sans succès. Par ailleurs, nous avons cherché à améliorer l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle. Pour ce faire, nous avons travaillé d'une part à l'expression du biosenseur SF1 au niveau de la membrane externe d'*E. coli* dans l'optique de développer une méthode de criblage à haut débit. La protéine a bien été exprimée au niveau de la membrane mais il persiste une variabilité en réponse à l'uranyle à optimiser pour développer un crible fiable associé. D'autre part, nous avons amélioré l'affinité du site II de la CaM pour l'uranyle par la modification des résidus en position 2 et 3 suivie du criblage des mutants produits. Ces travaux ont permis d'identifier des variants de la CaM présentant une affinité pour l'uranyle améliorée par rapport à la protéine de départ. Ces résultats ont permis à l'équipe de générer les biosenseurs correspondants et leur caractérisation a mis en évidence une réponse améliorée en termes d'amplitude de signal et de sensibilité.

Mots clés : Biosenseur, uranium, biodisponibilité, criblage, FRET

Abstract

Uranium is a radionuclide found naturally in the environment, but also as a result of human activities (nuclear cycle, mining operations, use of fertilizers and weapons). The most stable form of uranium in aqueous solution is the uranyl cation UO_2^{2+}. It can be chelated by various ions and proteins, and can affect the health of many organisms, including humans. The maximum concentration of uranium in drinking water established by the WHO is 30 µg/L. Environmental monitoring is therefore an essential area of research, both from an environmental and a health standpoint. The current techniques used to detect uranium in aqueous solution measure the total concentration of uranium, which differs from its bioavailable fraction, defined as the quantity capable of entering a living organism. There are currently no systems capable of detecting the bioavailable fraction of uranium, which is estimated by theoretical approaches. Biosensors, defined as "analytical devices combining a biological and a physico-chemical component", offer an alternative to conventional detection methods. Among the different types of biosensors, "whole-cell" biosensors can detect the bioavailable fraction of a compound. A uranyl biosensor (SF1) inspired by a calcium biosensor has been developed by the IPM group. It consists of a calmodulin (CaM) modified to bind uranyl fused to two fluorescent proteins (FPs) and can detect micromolar concentrations of uranyl ratiometrically by fluorescence transfer (FRET) between the two FPs.

During this project, we sought to express this biosensor in the zebrafish *Danio rerio*, with the goal of developing a tool capable of detecting bioavailable uranium in water using a genome editing approach. Three genes were targeted, without success. We also sought to improve the affinity of the biosensor SF1 for uranyl. We worked on the expression of the biosensor in the outer membrane of *E. coli*, with the aim of developing a high-throughput screening method. We were able to express the protein in the outer membrane, but a variability in the uranyl response remains. This aspect needs to be optimized to develop a reliable screening tool. We also improved the affinity of CaM site II for uranyl by modifying residues in positions 2 and 3, followed by screening of the mutants produced. This work enabled us to identify CaM variants with improved affinity for uranyl compared with the starting protein. These results enabled the team to generate the corresponding biosensors, and their characterization revealed an improved response in terms of signal amplitude and sensitivity.

Key words: Biosensor, uranium, bioavailability, screening, FRET

Remerciements

« Echouer, ou réussir, mais au moins tenter sa chance. Moi je dis que plus le combat est grand, plus la victoire est immense » Kery James – Post Scriptum

Je remercie dans un premier temps le CEA/DAM pour avoir financé ces travaux de thèse.

Je tiens ensuite à exprimer ma sincère reconnaissance envers l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Dr. Jean Aupiais et Dr. Claude Alban, pour leur implication dans le jury de ma thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury, Dr. Béatrice Gagnaire, Dr. Maria-Rosa Beccia, pour avoir accepté de participer en tant qu'examinatrices. Je remercie également Dr. Hélène Javot d'avoir accepté d'être présidente du jury de cette thèse.

J'adresse ensuite mes remerciements à Sandrine Sauge-Merle, Catherine Berthomieu et Marguerite Monfort, pour m'avoir accordé leur confiance pour la conduite de ce projet, pour m'avoir accompagné et guidé tout au long de ces quatre années. Grâce à vous, j'ai pu découvrir à la fois des techniques, des personnes, et des connaissances formidables. Malgré les difficultés que nous avons pu rencontrer, cette thèse a été une expérience unique et mémorable autant sur le plan scientifique qu'humain, et j'en ressors grandi. J'espère avoir pu vous apporter autant que vous m'avez apporté.

Je remercie ensuite les membres de l'IPM qui ont fait partie de mon aventure de thèse au quotidien, qui ont contribué à son bon déroulement et qui ont été la source de discussions riches, de bons moments, et sans qui l'ambiance au labo n'aurait pas été la même. Je remercie tout particulièrement Laurie Piette pour sa bienveillance sans faille. Merci à Virginie Chapon pour avoir pris les rênes de l'IPM, et pour le soutien qu'elle a apporté à mon projet autant sur le plan scientifique que moral. Merci pour la richesse de tes discussions, pour la sagesse de tes propos et pour tes incroyables macarons. Merci à David Lemaire pour m'avoir accompagné autant sur le plan scientifique que logistique. Tu as permis par ton travail en coulisses le bon déroulement de ma thèse et de beaucoup d'autres, et je te suis particulièrement reconnaissant. Merci pour tous les soirs où tu nous as gardé Loïc et moi, et pour avoir rattrapé nos innombrables bêtises. Merci également à Tiffanie Barré pour l'analyse de mes nombreux échantillons, et à Nicolas Brémond pour l'assistance au labo.

Merci également à tous les membres de BIAM que j'ai pu côtoyer au quotidien ou plus rarement. En particulier merci à Sylvain, Brigitte, Sandy, Sandra, Gilles, Wafa, Pascal, Laurence. Merci aussi aux « jeunes » du BIAM, Romain, Anaïs, Elsa, Léo, Mohand, Jeanne, Maxime, Fanny, Magalie, et à tous ceux que j'oublie.

Je remercie les membres de la plateforme TEFOR, Pierre, Elodie, Anna, Axel, Jean-Stéphane, Jean-Paul, pour leur intérêt envers ce projet, pour m'avoir accueilli dans votre labo et pour m'avoir fait découvrir les manips poisson.

Merci à Manon, qui en plus d'être une amie de choix et une excellente plant-sitter a sauvé mon manuscrit de thèse. Ta personnalité fédératrice autant à Manosque qu'au BIAM a donné naissance à un cercle social qui a fait beaucoup de bien aux doctorants. Merci pour les soirées, les randos, et pour le partage de nos expériences de thèse. Encore merci à toi et à Thomas pour être venu me chercher au rond-point.

Merci à Edern (Nernou), pour les tonnes de bons moments qu'on a passés, et qu'on va continuer à passer ensemble. Tu es une des plus belles rencontres de ma thèse et de ma vie tout entière. Merci pour la musique, les pauses clopes, les soirées, et pour m'avoir fait rencontrer plein de supers personnes. Hâte de venir voir un concert de Sparks Day aux 3C un de ces jours.

Merci à Loïc pour ta gentillesse, pour ta détermination et tes efforts quotidiens au labo, tu as été un acolyte de choix depuis le début de cette aventure. Merci pour les tiramisus, les conseils de mécano et pour m'avoir fait découvrir la pêche. Bon courage pour la rédaction, si j'y suis arrivé toi tu t'en sortiras aussi !

Merci à Géraud pour avoir apporté de la légèreté et de la sagesse au rythme chaotique de mes derniers mois de manips et de rédaction, nos marches du soir m'ont fait un bien fou. Encore merci pour les habits béninois, tu peux être sûr que je leur ferai honneur autant que possible. Bon courage pour la suite de ton aventure.

Merci à Abbas pour m'avoir accueilli à l'IPM, pour m'avoir guidé dans le monde complexe de la vie de doctorant et pour tout ce que tu m'as appris. L'ambiance dans le bureau n'aurait pas été la même sans ta bonne humeur. Je te souhaite le meilleur pour ta future vie de chercheur.

Merci à Laura pour ta légèreté, ta maturité, et pour avoir apporté une énergie toute particulière au labo. Ta passion pour la science et ta rigueur ont toujours été une source d'inspiration. Merci pour m'avoir permis de rencontrer les tiens, pour les randos, le SUTOM et pour m'avoir appris à jouer à Magic (encore désolé pour ma chance de cocu).

Merci à Sophie pour ta sagesse, ta bienveillance, et pour nos discussions interminables à refaire le monde. Comme Atlas porte le monde tu portes la coloc et ton projet. Hâte de te venir voir ta soutenance. Merci aussi au reste de la coloc, Anne, Marion, Sephora.

Merci à mes proches pour leurs encouragements tout au long de ma thèse, et pour leur intérêt pour mes travaux malgré la complexité de ces derniers. Mes parents, Gabi, Arlette, Mamel, vous avez été et continuez d'être une source d'inspiration et de motivation au quotidien.

Merci à mes amis de longue date, qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse par leur présence, leur humour, leurs conseils. Je pense tout particulièrement à Zak, Marjan, Manoune, Cycy, Lana, Julia. Nico, je te souhaite le plus grand des succès dans ton aventure de thèse, hâte de venir te voir soutenir.

Pour finir, j'adresse mes plus profonds remerciements, et je dédie ce manuscrit à mon grand-père William Frank Robinson. Opa, you nourished my passion for science and made me curious for so many things. Your interest in my various journeys and projects carried me through some of the toughest times, and I wouldn't be writing those words if it wasn't for you. Thank you for being such an amazing person and role model.

Table des matières

Affidavit 2
Liste des publications et participations à des congrès 3
Résumé 4
Abstract 5
Remerciements 6
Table des matières 8
Liste des figures 12
Liste des tableaux 16
Liste des abréviations 18
Introduction 20
1. Uranium 21
1.1. Propriétés physico-chimiques de l'uranium 21
1.1.1. Propriétés radiologiques 21
1.1.2. Propriétés chimiques de l'uranium 22
1.2. L'uranium dans l'environnement 24
1.3. Toxicité de l'uranium 24
1.3.1. Radiotoxicité 24
1.3.2. Toxicité chimique 25
1.3.3. Cibles protéiques de l'uranium 28
1.4. Biodisponibilité 29
1.5. Méthodes de détection de l'uranium en solution 30
1.6. Détection de l'uranium dans un contexte de surveillance environnementale 32
2. Biosenseurs 33
2.1. Classification des biorécepteurs 35
2.2. Classification des transducteurs 36
2.3. Critères de performance des biosenseurs 36
2.4. Biosenseurs de métaux 37
2.4.1. Biosenseurs de métaux *in vitro* 37
2.4.2. Biosenseurs whole-cell 39
2.4.3. Biosenseurs whole-cell d'uranyle 40

3. La Calmoduline (CaM) 42
3.1. Structure de la CaM 42
3.2. Les motifs EF-Hand 43
3.3. Dynamique de fixation du calcium par la CaM et coopérativité des sites 44
3.4. Interaction de la CaM avec l'uranyle 46
3.5. Phosphorylation du site I de la CaM 47
3.6. Optimisation des sites I et II pour l'uranyle 48
3.7. Utilisation de la CaM comme senseur 48
3.7.1. Développement d'un biosenseur de calcium basé sur la CaM 48
3.7.2. Le FRET 49
3.7.3. Développement d'un biosenseur d'uranyle basé sur la CaM 50
Objectif de la thèse 55
Matériels & Méthodes 56
1. Matériels 57
1.1. Milieux de culture 57
1.2. Souches bactériennes 57
2. Méthodes 58
2.1. Biologie moléculaire 58
2.1.1. Préparation d'ADN plasmidique 58
2.1.2. Digestion d'ADN 59
2.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose 60
2.1.4. Amplification d'ADN par PCR 60
2.1.4.1. Conditions standards 60
2.1.4.2. Amplification d'ADN par PCR « 2-step » 62
2.1.4.3. Mutagenèse dirigée 62
2.1.4.4. Mutagenèse semi-dirigée 62
2.1.5. Clonage 63
2.1.5.1 Clonage par ligation 63
2.1.5.2. Clonage par PCR 64
2.1.5.3. Clonage par In-Fusion 64
2.1.6. Transformations de cellules d'*E. coli* 64
2.1.6.1. Préparation de cellules électrocompétentes 64
2.1.6.2. Préparation de cellules chimiocompétentes 65
2.1.6.3. Transformation de cellules électrocompétentes 65
2.1.6.4. Transformation de cellules chimiocompétentes 65
2.2. Biochimie 65
2.2.1. Liste des protéines 65

2.2.2. Production de protéines recombinantes 67
2.2.3. Purification de protéines sur colonne 67
2.2.4. Production de protéines en batch 68
2.2.5. Purification de protéines en batch 69
2.2.5.1. Préparation de la résine nickel 69
2.2.5.2. Purification 69
2.2.5.3. Régénération de la résine 69
2.2.6. Electrophorèse de protéines sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes 70
2.2.7. Quantification de protéines 70
2.2.7.1. Quantification par spectrophotométrie 70
2.2.7.2. Dosage BCA 71
2.2.8. Culture de bactéries en présence d'uranyle 72
2.2.9. Extraction de protéines par BugBuster 72
2.3. Analyse biophysique de protéines 72
2.3.1. Spectrométrie de masse 72
2.3.2. Spectroscopie de fluorescence 73
2.3.2.1. Traitement des protéines pour analyse par fluorescence 73
2.3.2.2. Traitement des cellules pour analyse par fluorescence 73
2.3.2.3. Fluorescence en cuve 73
2.3.2.4. Fluorescence en plaque 74
2.3.2.4.1. Analyses de protéines 74
Analyse du biosenseur SF1 74
Criblage de mutants de la CaM 74
2.3.2.4.2. Analyse de bactéries 74
Résultats 75
Chapitre I : Expression d'un biosenseur d'uranyle chez le poisson zèbre 76
1. Introduction 76
2. Principe de l'édition 78
3. Détermination d'une position d'insertion 80
4. Édition du gène *atp1b1b* 81
4.1. Validation des sites d'insertion et test des ARNgs 81
4.2. Insertion du gène codant la mCherry 82
4.3. Insertion du gène codant le biosenseur SF1 83
4.4. Modification du donneur et seconde série d'édition du génome 85
5. Édition du gène *foxi3b* 87
6. Édition du gène *krt8* 88
Conclusions / Discussion 90

Chapitre II : Expression du biosenseur d'uranyle dans la membrane externe d'*E. coli* 92
1. Contexte 92
2. Exposition de cellules exprimant le biosenseur SF1 à l'uranyle dans le cytoplasme 93
3. Choix d'un système d'expression alternatif 95
4. Développement de souches bactériennes exprimant le système SpyCatcher/SpyTag 98
5. Test d'expression et optimisation de la production des protéines seules et des complexes carrier-SF1 101
5.1. Carrier-SC et SF1-ST 101
5.2. Carrier-SF1 102
6. Localisation cellulaire des complexes carrier-SF1 104
7. Réponse des cellules exprimant carrier-SF1 à l'uranyle 106
Conclusion / Discussion 115
Chapitre III : Amélioration de l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle 117
1. Contexte 117
2. Stratégies d'amélioration du site II 118
3. Conception d'une banque de mutants 122
4. Méthodologie de criblage de la banque de mutants 124
5. Création et caractérisation de la banque de mutants 129
6. Résultat du criblage de la banque de mutants 131
7. Mesure de constantes d'affinité des mutants 133
Conclusions / Discussion 138
Conclusions générales et perspectives 140
Perspectives 142
Références bibliographiques 143
Annexes 1622

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme de spéciation de l'U(VI) 16

Figure 2 : Représentation tridimensionnelle des complexes $UO_2(SO_4)_2(H_2O)$ et $UO_2(CO_3)_3^{4-}$. 23

Figure 3 : Evolution des articles publiés de 2000 à 2019 avec pour thème l'origine de l'exposition humaine à l'uranium, les organes affectés par la toxicité de l'uranium, et les phénomènes biologiques induits par l'uranium 25

Figure 4 : Exemples de mécanismes toxicologiques de l'uranium dans le corps humain. **a.** Stress oxydatif. **b.** Dégâts sur l'ADN. **c.** Interaction avec des protéines et perturbation des fonctions associées 26

Figure 5 : A gauche : Principales voies d'exposition et risques sanitaires liés à l'exposition humaine à l'uranium ; A droite : Transport et accumulation de l'uranium dans le corps humain 26

Figure 6 : Concentration en uranium dans les tissus de différents organes chez le rat mesurées **a.** 1 mois **b.** 12 mois après injection intramusculaire d'uranium appauvri 27

Figure 7 : Utilisation de différentes techniques pour la détection de l'uranium 30

Figure 8 : Principe de fonctionnement d'un biosenseur 33

Figure 9 : Principe de fonctionnement des biosenseurs de 1ère, 2e et 3e génération 34

Figure 10 : Principe de fonctionnement des biosenseurs basés sur des DNA-zymes. 39

Figure 11 : Principe de fonctionnement d'un biosenseur whole-cell utilisant le système de gène rapporteur 40

Figure 12 : Principe de fonctionnement du biosenseur d'uranyle whole-cell chez *C. crescentus* 41

Figure 13 : Structure de la calmoduline **a.** Relaxée en l'absence de ligand **b.** Ouverte lors de la fixation de 4 ions Ca^{2+} **c.** Repliée autour d'un peptide 43

Figure 14 : a. A gauche : Illustration schématique du motif EF-Hand et de la fixation d'un ion Ca^{2+}. A droite : Représentation tridimensionnelle d'un motif EF-Hand. **b.** Conservation des acides aminés appartenant au motif EF-Hand. **c.** Structure tridimensionnelle du site I de la calmoduline et des acides aminés ligands du métal pour chaque site 44

Figure 15 : a. Diagramme schématique de la fixation d'ions Ca^{2+} dans le domaine N-terminal de CaM. **b.** Représentation macroscopique des réactions. **c.** Équations décrivant la relation entre les constantes de liaison macroscopiques, K_1 et K_2, et les constantes de liaison microscopiques k_I ; k_{II} ; $k_{I,II}$; $k_{II,I}$ 46

Figure 16 : Principe de fonctionnement du biosenseur fluorescent de calcium développé par R.Y. Tsien. **a.** Profil de fluorescence de la protéine avec et sans Ca^{2+} **b.** Structure de la protéine sans calcium. **c.** Structure de la protéine liée à 4 ions Ca^{2+}. 49

Figure 17 : a. Observation des flux de calcium neuronaux chez une larve de *D. rerio* exprimant le biosenseur caméléon **b.** Observation de flux de calcium chez la souris. 50

Figure 18 : Profil de fluorescence des variants Δ1, Δ13, Δ123 et Δ1234 du biosensor 1 en absence et en présence de 80 µM de Ca^{2+} 52

Figure 19 : a. Profils de fluorescence des variants Δ1, Δ123 et Δ1234 du biosensor 1 en absence et en présence de 25 µM d'uranyle. **b.** Ratios de fluorescence à 525 nm / 476 nm de biosensor 1, Δ1, Δ123 et Δ1234 52

F**igure 20 :** Observation par microscopie de racines d'*A. thaliana* exprimant le biosenseur SF1 **a.** En absence d'uranyle **b.** En présence de 10 µM d'uranyle. **c.** Ratio de fluorescence Citrine/eCFP des racines en absence et présence d'uranyle. 54

Figure 21 : a. Individus de *D. rerio*. **b.** Élevage de *D. rerio* en animalerie de laboratoire. 76

Figure 22 : Étapes du développement de *D. rerio* 77

Figure 23 : Principe de l'édition génétique par la technique CRISPR-Cas9. Pour l'ARN guide, la portion crRNA est indiquée en bleu et la portion tracrRNA est indiquée en rouge 78

Figure 24 : Principe de la création et du développement de lignées transgéniques homozygotes de *D. rerio* 79

Figure 25 : Expression du gène *atp1b1b* chez une larve de *D. rerio* à 20-24 hpf 81

Figure 26 : Atlas d'expression du gène *atp1b1b* chez *D. rerio* 81

Figure 27 : Larve de *D. rerio* à 96 h exprimant la protéine fluorescente mCherry dans le gène *atp1b1b.* 82

Figure 28 : Représentation schématique de la séquence du gène utilisé pour l'édition de *atp1b1b*. 83

Figure 29 : Principe de l'insertion d'un gène d'intérêt par CRISPR-Cas9 84

Figure 30 : Représentation schématique de la modification du donneur *atp1b1b-SF1* 86

Figure 31 : Modification de la séquence du donneur *atp1b1-SF1* 86

Figure 32 : Expression du gène *foxi3b* chez une larve de *D. rerio* à 20-24 hpf 88

Figure 33 : Atlas d'expression du gène *foxi3b* chez *D. rerio* 88

Figure 34 : Expression du gène *krt8* chez une larve de *D. rerio* à 20-24 hpf 89

Figure 35 : Atlas d'expression du gène *krt8* chez *D. rerio*. 89

Figure 36 : Profils de fluorescence des cellules d'*E. coli* exprimant le biosenseur SF1 93

Figure 37 : Courbes de croissance de cellules d'*E. coli* exprimant le biosenseur SF1 dans différents milieux. 94

Figure 38 : Principe de l'assemblage des sous unités du domaine CnaB2 de la protéine FbaB de *S. pyogenes* 96

Figure 39 : Principe d'expression de protéines dans la membrane externe d'*E. coli* au moyen du système SpyCatcher/SpyTag 97

Figure 40 : Utilisation des protéines Lpp-OmpA, AIDA-I et PgsA pour l'expression membranaire d'une protéine d'intérêt 98

Figure 41 : Représentation schématique des constructions génétiques des protéines carrier utilisées pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli* 99

Figure 42 : Principe de l'assemblage de fragments d'ADN double brin par PCR. 100

Figure 43 : Tests d'expression des constructions carrier-SF1 dans *E. coli* BL21 (DE3) 102

Figure 44 : Profils de fluorescence du biosenseur SF1 *in vitro* et des cellules exprimant les complexes AIDA-I-SF1, Lpp-OmpA-SF1 et PgsA-SF1. 103

Figure 45 : Tests d'expression des constructions AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1 104

Figure 46 : Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1 non traitées et traitées à l'EDTA 107

Figure 47 : Profils de fluorescence de cellules d'*E. coli* exprimant AIDA-I-SF1 en absence et en présence d'uranyle 108

Figure 48 : Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 17°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose 108

Figure 49 : Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose 109

Figure 50 : Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose. 109

Figure 51 : Formule de $\Delta R/R$ 110

Figure 52 : Profils de fluorescence de cellules d'*E. coli* exprimant le complexe AIDA-I-SF1 en présence de différentes concentrations en uranyle 111

Figure 53 : Ratio de fluorescence 525 nm / 476 nm de cellules exprimant AIDA-I-SF1 en fonction de la concentration en uranyle. 112

Figure 54 : Profils de fluorescence de cellules d'*E. coli* exprimant le complexe AIDA-I-SF1 en présence de différentes concentrations en uranyle 113

Figure 55 : Ratio de fluorescence 525 nm / 476 nm de cellules exprimant AIDA-I-SF1 en fonction de la concentration en uranyle. 113

Figure 56 : Avantages et inconvénients du criblage sur cultures de bactéries et sur protéines purifiées. 117

Figure 57 : Prédiction structurale de la CaMΔ_{I-II} en utilisant le modèle alphafold 119

Figure 58 : Comparaison des séquences de motifs EF-Hand de CaMs de la littérature 120

Figure 59 : Conservation des séquences de motifs EF-Hand de CaMs de la littérature 121

Figure 60 : Conception des amorces dégénérées. **a.** Tableau de correspondance des amorces dégénérées. **b.** Tableau des codons 122

Figure 61 : Principe de production, purification et criblage de mutants de la CaM 124

Figure 62 : Extraits protéiques contenant la CaMΔ_{I-II} et le biosenseur SF1 selon différentes conditions de purification 127

Figure 63 : Extraits protéiques contenant le biosenseur SF1 ou la CaMΔ_{I-II} 128

Figure 64 : Profils de fluorescence d'échantillons du biosenseur SF1 après traitement par la TEV 128

Figure 65 : Principe de création d'une banque de mutants par mutagenèse semi-dirigée 129

Figure 66 : Intensités de fluorescence de la CaMΔ_{I-II} et de certains de ses mutants en fonction de la concentration en uranyle 131

Figure 67 : Protocole de production et purification des mutants 134

Figure 68 : Profils de fluorescence de la CaM obtenus en présence de concentrations croissantes en uranyle. 135

Figure 69 : Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm de la CaMΔ_{I-II} en fonction de la concentration en uranyle 135

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fractions isotopiques de l'uranium naturel 21

Tableau 2 : Techniques utilisées pour la détection d'uranium en solution. 32

Tableau 3 : Exemples de biosenseurs de métaux 39

Tableau 4 : Séquences peptidiques des sites I et II des variants du domaine N-terminal de la CaM d'*A. thaliana* conçus et utilisés par l'IPM 44

Tableau 5 : Constantes d'affinité pour l'uranyle et le calcium pour les variants de CaM WT I-II à pH 6 47

Tableau 6 : Séquences peptidiques des sites I, II, III et IV des protéines biosensor 1 et de ses variants Δ1, Δ13, Δ123 et Δ1234. 51

Tableau 7 : Composition minérale de l'eau du Mont Roucous 54

Tableau 8 : Composition du milieu MJS 56

Tableau 9 : Génotype de souches d'*E. coli* utilisées durant cette thèse 58

Tableau 10 : Liste des plasmides utilisés durant cette thèse 59

Tableau 11 : Programme de PCR standard 61

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées durant cette thèse 62

Tableau 13 : Programme de PCR « 2-step » 62

Tableau 14 : Tableau de correspondance universelle des codons dégénérés défini par l'International Union of Biochemistry 63

Tableau 15 : Liste des protéines et peptides utilisés durant cette thèse 65

Tableau 16 : Coefficients d'extinction molaire des protéines utilisées durant cette thèse 69

Tableau 17 : Dosage de la quantité de protéines par la méthode BCA 71

Tableau 18 : Gamme de réponse des cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 17°C, 25°C et 30 °C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose en absence et présence de 30 µM d'uranyle. 110

Tableau 19 : Gamme dynamique (ΔR/R) des cellules exprimant le complexe AIDA-I-SF1, cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG. 112

Tableau 20 : Gamme dynamique (ΔR/R) des cellules exprimant le complexe AIDA-I-SF1, cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG. 114

Tableau 21 : Séquences des sites I et II de fixation de métal de la CaM Y I-II et de différents variants 118

Tableau 22 : Conception des amorces dégénérées. 123

Tableau 23 : Concentrations en protéines mesurées à différentes étapes de purification de la CaM en fonction de la quantité de résine. 125

Tableau 24 : Concentrations en protéines mesurées à différentes étapes de purification du biosenseur SF1 en fonction de la quantité de résine. 126

Tableau 25 : Récapitulatif des mutants constituant la banque. 130

Tableau 26 : Pourcentage de diminution de fluorescence de la CaMΔ_{I-II} et de certains mutants à différentes concentrations d'uranyle. 132

Tableau 27 : Récapitulatif des mutants constituant la banque. 133

Tableau 28 : Liste des mutants analysés par fluorescence en cuve. 136

Tableau 29 : Valeurs de Kd_1 et Kd_2 obtenus lors de la seconde série d'analyse de la CaMΔ_{I-II} et de 11 mutants. 136

Tableau 30 : Amélioration des Kds chez certains mutants analysés par fluorescence en cuve 137

Tableau 31 : Gamme de réponse et concentration d'uranyle à saturation du biosenseur SF1 et des variants SF3, SF4 et SF5. 137

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

AIDA-I : Adhesin Involved in Diffuse Adherence

ADN/DNA : Acide DésoxyriboNucléique

Ara : L-Arabinose

ARN/RNA : Acide RiboNucléique

ARNg/gRNA : ARN guide

BCA : BiCinchonic acid Assay

bp : Paires de bases

BSA : Bovine Serum Albumin

BET : Bromure d'éthydium

Bq : Becquerel

CaM : Calmoduline

Cas : CRISPR Associated Protein

CAT : Catalase

CnaB2 : Immunoglobulin-like Collagen Adhesin Domain B2

crRNA : CRISPR RNA

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Da : Dalton

DO : Densité Optique

DU : Uranium appauvri

eCFP : enhanced Cyan Fluorescent Protein

EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

ESI : ElectroSpray Ionization

eV : Electronvolt

eYFP : enhanced Yellow Fluorescent Protein

EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure

FbaB : Fibronectin-Binding Protein F2

FP : Protéine fluorescente

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

FRET : Transfert d'énergie par résonance de type Förster

FTIR : Fourier Transformation Infrared Spectroscopy

g : Gramme

GFP : Green Fluorescent Protein

GPx : Glutathione Peroxydase

GR : Glutathione reductase

GSH : Glutathione

HDR : Homology Directed Repair

His-Tag : Étiquette 6-Histidine

hpf : Heures Post Fécondation

HSAB : Hard soft acid base

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IDA : Iminodiacetic Acid

IM : Membrane Interne

IMAC : immobilized metal-ion chromatography

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

J : Joule

Kd : Constante de dissociation

L : Litre

LB : Lysogeny Broth

LED : Diode électroluminescente

LOD : Limite de détection

Lpp : Lipoprotéine

LPO : Peroxydation des lipides

M : Molarité (moles/L)

MES : Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique

NHEJ : Non Homologous End-Joining

OM : Membrane externe

OmpA : Outer Membrane Protein A

OMS/WHO : Organisation mondiale de la santé

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAM : Protospacer Adjacent Motif

PCR : Polymerase Chain Reaction

PgsA : Phosphatidyglycerol phosphate synthase

pH : potentiel hydrogène

ROS : Reactive Oxygen Species

rpm : Rotation par minute

SC : SpyCatcher

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SOC : Super Optimal Medium with Catabolite repressor

SOD : Superoxide Dismutase

SPR : Surface Plasmon Resonance

ST : SpyTag

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TEV : Tobacco Etch Virus

TOF : Time Of Flight

TPM : Transcrits Par Minute

tracrRNA : Trans-Activating CRISPR RNA

TRFLS : Spectrométrie de fluorescence en temps résolu

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

U : Uranium

U.A : Unité arbitraire

UO_2^{2+} : Uranyle

UV : Ultraviolet

V : Volt

WT : Wild-Type

Introduction

1. Uranium

L'uranium est le 92e élément du tableau périodique. Il fait partie de la famille des actinides. Il est l'un des éléments naturels les plus denses (19,1 g/cm^{3}) du tableau périodique. Il est le 49e élément le plus abondant sur terre, avec une concentration dans la croûte terrestre similaire à celle de l'arsenic ou du brome, et largement supérieure à celle du platine, de l'argent ou de l'or.

Naturellement présent dans l'environnement, l'uranium est également retrouvé dans diverses régions du monde à la suite d'activités anthropiques, telles que la combustion de charbon minéral, l'utilisation d'armement ou d'engrais phosphatés, ou encore la production d'énergie nucléaire et le cycle du combustible associé, puisque l'uranium est aujourd'hui le principal combustible utilisé.

1.1. Propriétés physico-chimiques de l'uranium

1.1.1. Propriétés radiologiques

L'uranium possède trois isotopes naturels : ^{234}U, ^{235}U et ^{238}U, et 23 isotopes artificiels de nombre de masse compris entre 217 et 242. Tous les isotopes de l'uranium sont radioactifs. Ils sont principalement émetteurs de rayonnements alpha, accompagnés pour certains isotopes d'une faible proportion de rayonnements bêta et gamma. ^{238}U représente plus de 99 % de l'uranium naturel. Il est l'isotope naturel le plus stable, avec une demi-vie supérieure à 4,4 x10^{9} ans et donc l'activité spécifique la plus faible des isotopes naturels de l'uranium (**Tableau 1**). La demi-vie des isotopes artificiels de l'uranium est très courte, souvent inférieure à 1 seconde.

^{235}U est le seul isotope naturel « fissile », c'est-à-dire capable de se fragmenter sous l'effet d'un neutron. L'énergie libérée par cette fission (203 MeV/atome ; 83,2 TJ/kg), est particulièrement élevée, et plus d'un million de fois supérieure à celle de combustibles fossiles comme le bois (19,8 MJ/kg) ou le gaz naturel (53,1 MJ/kg). L'uranium utilisé pour la production d'énergie nucléaire est enrichi à 3-5 % en ^{235}U (Orano, s. d.). Lors de l'enrichissement de l'uranium naturel, une seconde fraction est produite : l'uranium appauvri. Cette fraction contient peu d'^{235}U (0,3 % en moyenne), et une radioactivité 40 % plus faible que celle de l'uranium naturel. Les propriétés chimiques des différents isotopes sont identiques.

Isotope	Masse en %	Activité spécifique en Bq pour 1 g d'U naturel	Activité en %	Période de décroissance (années)	Énergie d'émission (keV)
^{234}U	0,0053	12356	48,9	244500	4722
^{235}U	0,711	5680	2,2	703,8 x10^{6}	4398
^{238}U	99,28	12356	48,9	4,468x10^{9}	4198

Tableau 1 : *Fractions isotopiques de l'uranium naturel*

1.1.2. Propriétés chimiques de l'uranium

L'uranium présente la configuration électronique suivante : [Rn] $5f^3$ $6d^1$ $7s^2$. Les six électrons des couches 5f, 6d et 7s lui confèrent 4 états de valence : +3, +4, +5, +6. Les états +3 et +5 sont peu stables en solution aqueuse, et seuls les états +4 et +6 sont retrouvés dans l'environnement, notés U(IV) et U(VI) respectivement. L'uranium tétravalent U(IV) est une forme réduite présente majoritairement en milieu fortement réducteur et anoxique sous la forme de complexes peu solubles en solution aqueuse, et ce dans une large gamme de pH (Cha et al., 2020). Il est peu mobile dans l'eau et dans l'environnement, et présente donc un risque sanitaire minime. En milieu oxydant, l'uranium existe majoritairement sous la forme U(VI), plus soluble en solution aqueuse et donc plus toxique que l'U(IV).

L'uranium (VI) présente une spéciation, c'est-à-dire une répartition sous différentes formes chimiques, particulière et complexe en solution aqueuse (Bernhard et al., 1998 ; S. J. Markich, 2002). La présence ainsi que la proportion relative de ces différentes formes dépendent de différents paramètres physico-chimiques de la solution tels que la température, le pH, l'état redox, la concentration en métal, la nature et la concentration en sels (**Figure 1**).

Le cation uranyle UO_2^{2+} est la forme la plus stable d'U(VI) en solution aqueuse et au sein des organismes vivants. Sa forme libre est majoritaire à pH < 5 (Tian et al., 2022). L'uranyle est un acide dur selon la théorie HSAB (Hard Soft Acid Base ; Pearson, 1963). Cette dernière distingue parmi les ions ceux ayant une forte densité de charge et une faible polarisabilité (acides/bases durs) et ceux ayant une faible densité de charge et une forte polarisabilité (acides/bases mous). Selon la théorie HSAB, les acides durs forment des liaisons électrostatiques préférentiellement avec des bases dures, tandis que les acides mous forment des liaisons covalentes avec des bases molles. Ainsi, l'uranyle interagit avec des bases dures telles que les anions hydroxyles (OH^-), carbonates (CO_3^{2-}), phosphates (PO_4^{3-}) ou encore sulfates (SO_4^{2-}) (Alcorn et al., 2019 ; Homma-Takeda et al., 2019; Meinrath & Kimura, 1993). La complexation de l'uranyle par ces anions conduit aux principales espèces d'uranyle en solution telles que UO_2OH^+, UO_2SO_4, $UO_2(CO_3)_2^{2-}$. Ces dernières peuvent également réagir à pH basique avec des cations métalliques pour former des espèces telles que $Ca_2UO_2(CO_3)_3$ ou $Na[UO_2(O_2)(OH)]_4^{3-}$ (Zanonato et al., 2015). Certaines de ces formes complexées et notamment celles contenant un ou plusieurs ions Ca^{2+} sont peu solubles en solution aqueuse, et par conséquent peu mobiles et peu toxiques. Dans l'environnement, l'uranyle peut également être complexé par différents composés organiques souvent rassemblés sous le terme de « matières organiques dissoutes », tels que les acides humiques et fulviques (Novotnik et al., 2018). Ils peuvent favoriser la mobilité de l'uranium dans l'environnement, notamment dans des cas où l'uranium est principalement retrouvé sous forme peu soluble.

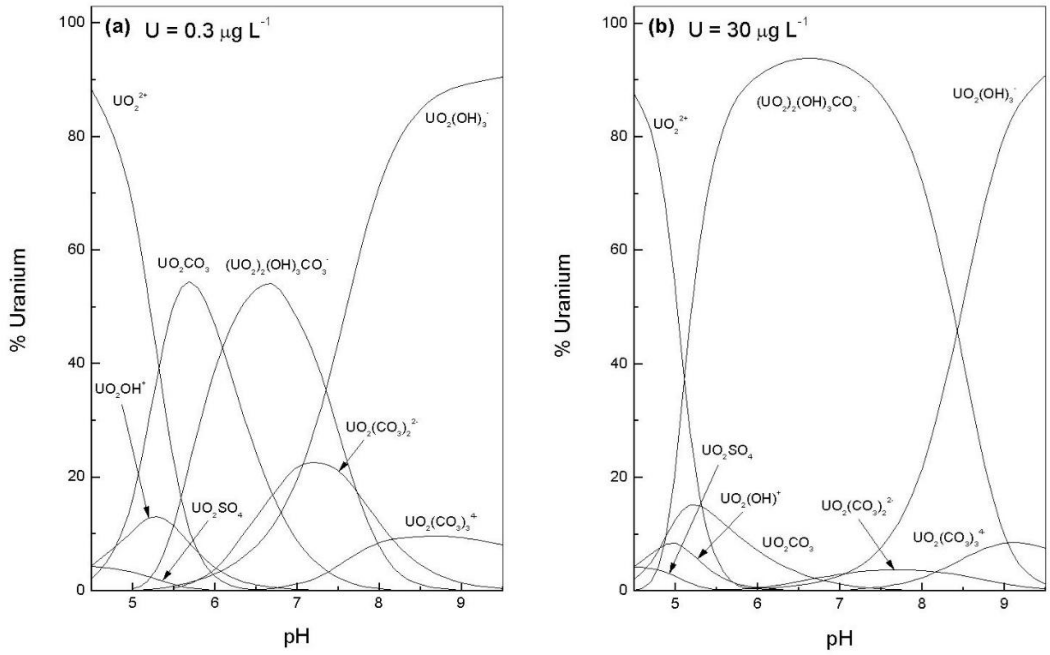


Figure 1 : *Diagramme de spéciation de l'U(VI) à :* ***a.*** *0,3 µg/L et* ***b.*** *30 µg/L dans une eau naturelle de composition ionique : CO_3^{2-} = 40 mg/L; SO_4^{2-} = 9,4 mg/L; Cl^- = 5,1 mg/L et de force ionique = 0,002 M. Les données ont été calculées selon le modèle HARPHRQ. Figure tirée de (S. J. Markich, 2002)*

L'analyse par spectroscopie étendue d'absorption de rayons X (EXAFS ; Extended X-Ray Absorption Fine Structure) des différents complexes d'uranyle a permis de montrer que l'ion uranyle possède une géométrie de coordination de l'uranyle à 5 ou 6 ligands (Kalintsev et al., 2023), agencés en bipyramide à base respectivement pentagonale ou hexagonale (soit 7 à 8 ligands au total pour l'U(VI)). Dans cette géométrie, l'atome d'uranium est central et les deux atomes oxygène de l'ion uranyle forment les sommets des pyramides. Les autres ligands de l'ion uranyle sont sur un plan équatorial perpendiculaire à l'axe O-U-O (**Figure 2**).

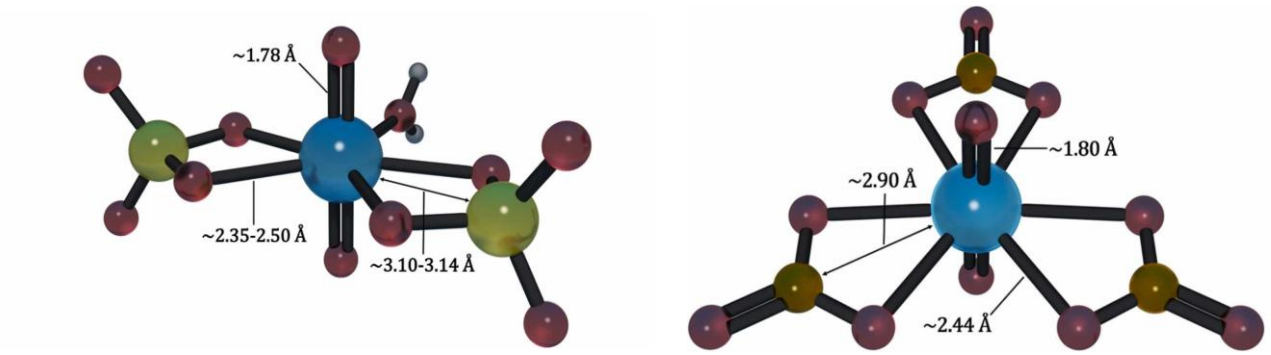


Figure 2 : *Représentation tridimensionnelle des complexes $UO_2(SO_4)_2(H_2O)$ et $UO_2(CO_3)_3^{4-}$. L'uranium est indiqué en bleu, l'oxygène en rouge, le soufre en vert et le carbone en orange. Figure tirée de (Kalintsev et al., 2023)*

1.2. L'uranium dans l'environnement

L'uranyle UO_2^{2+} est considéré comme la forme la plus mobile de l'uranium dans l'environnement. Cette mobilité est influencée par la présence de ligands minéraux et organiques, qui forment des complexes d'uranyle plus ou moins solubles et donc plus ou moins mobiles (Smedley & Kinniburgh, 2023). La présence de microorganismes peut également moduler la mobilité de l'uranium dans l'environnement. Ces microorganismes et leurs sécrétions sont capables de solubiliser différents métaux normalement présents sous forme de minerais. Ces métaux dissous peuvent ensuite être internalisés par les microorganismes puis déplacés au sein de cours d'eaux, et éventuellement minéralisés (Li et al., 2019 ; Martínez-Rodríguez et al., 2023).

La concentration d'uranium (environ 2,8 mg/kg en moyenne dans la croûte terrestre) dans les sols et les roches varie selon les régions du monde (Duhan et al., 2023). Elle est fortement influencée par la présence de dépôts naturels d'uranium et la composition chimique des milieux (Cinelli et al., 2017 ; Santos-Francés et al., 2018 ; Vodyanitskii, 2011). Cette concentration est 1000 fois supérieure à celle retrouvée dans les eaux avec une moyenne de 3,3 µg/L dans l'eau de mer, 5 µg/L dans les eaux souterraines et 4 µg/L dans les eaux de rivière (Smedley & Kinniburgh, 2023). La concentration de l'uranium dans les eaux est fortement influencée par les caractéristiques environnementales et géologiques des régions considérées. Une concentration nettement supérieure aux moyennes est présente dans les eaux de régions montagneuses ou proches de gisements et de sites industriels (Balaram et al., 2022 ; Kurttio et al., 2002 ; Ma et al., 2020; Nriagu et al., 2012).

L'uranium est présent dans l'air à des concentrations moyennes inférieures à 0,25 ng/m³ (Bleise et al., 2003 ; Hirose & Sugimara, 1981 ; NCRP, 1999) et conduit à l'inhalation quotidienne par un adulte d'environ 1 ng d'uranium (WHO, 2004). Cette présence est principalement due à la combustion de charbons minéraux contenant des traces d'uranium, mais également à des particules aéroportées produites lors du raffinage de l'uranium. Des concentrations nettement plus élevées peuvent ainsi être relevées à proximité de sites industriels de traitement d'uranium, jusqu'à 200 ng/m³ (Tracy & Meyerhof, 1987).

1.3. Toxicité de l'uranium

L'uranium présente une toxicité à la fois radiologique et chimique pour les organismes. La radiotoxicité est principalement liée au degré d'enrichissement en ^{235}U. La chimiotoxicité de l'uranium quant à elle reste constante quelques soient les isotopes (S. Keith et al., 2013).

1.3.1. Radiotoxicité

L'uranium est principalement émetteur de rayonnements alpha. Ces derniers sont considérés comme non pénétrants, à savoir qu'une exposition externe est stoppée par la peau et n'affecte pas l'organisme. La toxicité radiologique du métal est majoritairement due à une contamination interne à la suite de l'ingestion de métal. La radiotoxicité de l'uranyle chez les êtres vivants est principalement associée à la formation de ROS (reactive oxygen species) (Hu et al., 2022). Ces dernières peuvent endommager l'ADN, augmentant les risques aberrations chromosomiques et de cancer chez les individus affectés. L'^{235}U représente cependant une faible proportion de l'uranium retrouvé dans

l'environnement. Le risque radiologique concerne donc principalement des contaminations en uranium enrichi, et reste minoritaire dans le cas d'uranium naturel ou appauvri.

1.3.2. Toxicité chimique

La toxicité chimique est prépondérante en cas de contaminations (chroniques) en uranium naturel (S. Keith et al., 2013 ; Rump et al., 2019). De nombreuses études s'intéressent aux effets macroscopiques (organes cibles, pathologies ; **Figure 3**) de l'uranium, tandis que les mécanismes moléculaires associés à sa pénétration dans l'organisme et à sa toxicité sont peu connus.

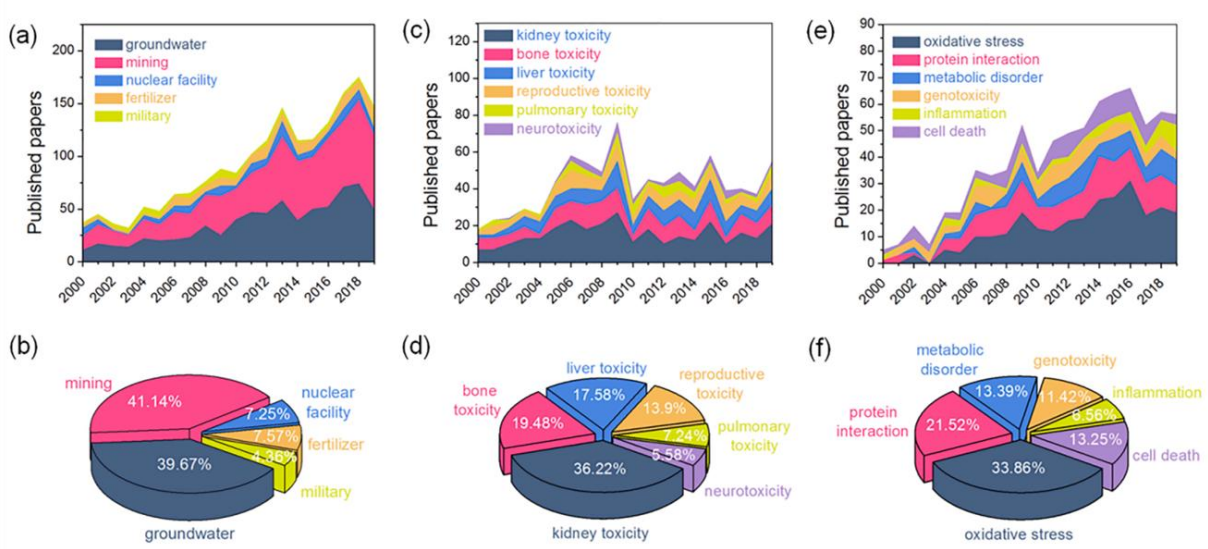


Figure 3 : *Evolution des articles publiés de 2000 à 2019 avec pour thème* ***(a)*** *et* ***(b)*** *Origine de l'exposition humaine à l'uranium* ***(c)*** *et* ***(d)*** *Organes affectés par la toxicité de l'uranium, et* ***(e)*** *et* ***(f)*** *Phénomènes biologiques induits par l'uranium. Figure tirée de (Ma et al., 2020)*

De par sa nature d'acide dur et sa chimie de coordination, l'uranium peut rentrer en compétition avec différents cations durs impliqués dans des phénomènes biologiques, tels que le calcium ou le Fer(III) (Rodrigues et al., 2013). L'uranium a une très forte affinité pour des bases dures comme les phosphates et les carboxylates. De ce fait, au sein des organismes, l'uranyle peut interagir avec l'ADN, les phospholipides, ainsi qu'une large variété de protéines (**Figure 4** ; Carugo, 2018 ; Lin, 2020). Ces interactions impactent divers organes et sont à l'origine de nombreuses pathologies, telles que les œdèmes et les fibroses pulmonaires, le dysfonctionnement voire la nécrose du foie, le développement de maladies auto-immunes, le dérèglement hormonal ou encore l'apparition de cancer dans divers organes (**Figure 5**).

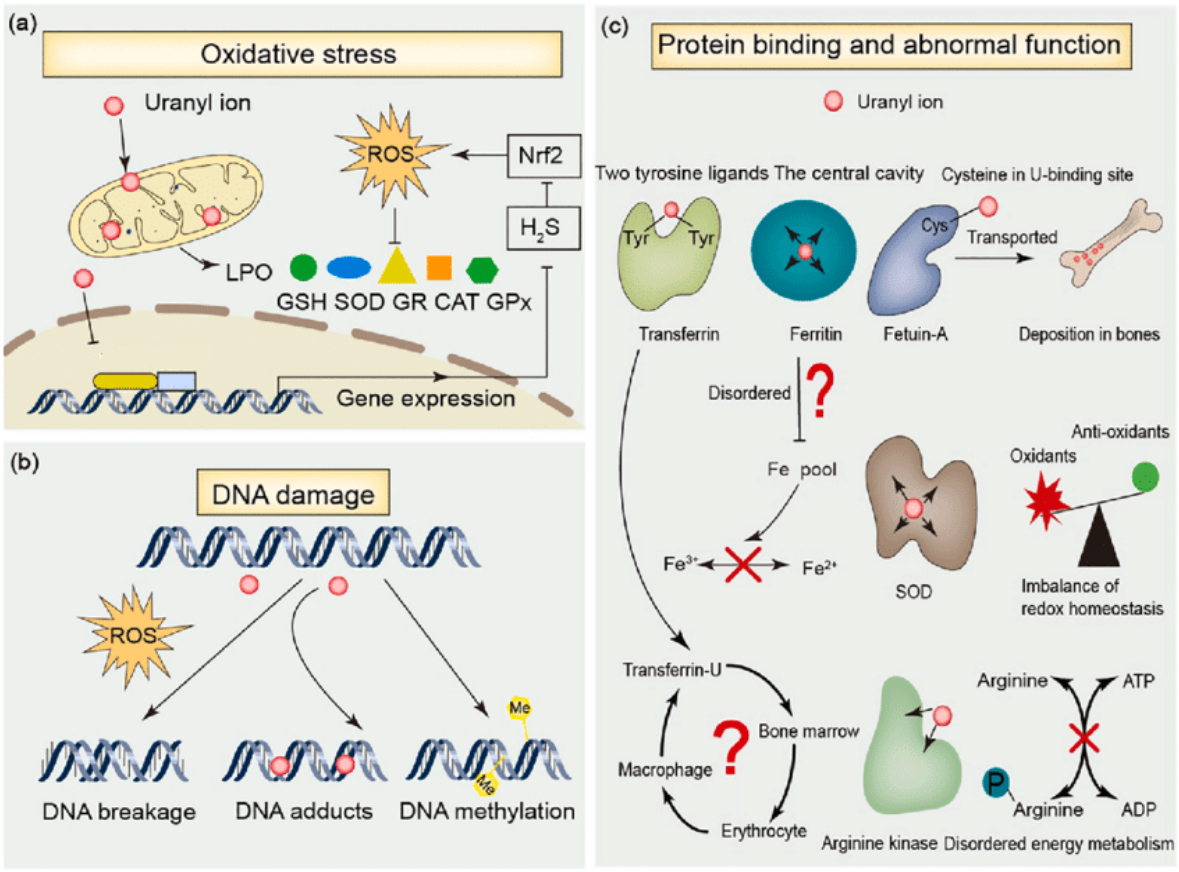


Figure 4 : *Exemples de mécanismes toxicologiques de l'uranium dans le corps humain.* ***a.*** *Stress oxydatif.* ***b.*** *Dégâts sur l'ADN.* ***c.*** *Interaction avec des protéines et perturbation des fonctions associées. ROS : Reactive Oxygen Species ; LPO : Peroxydation des lipides ; GSH : Glutathione réduite ; GR : Glutathione réductase ; CAT : Catalase ; GPx : Glutathione Peroxydase ; SOD : Superoxide Dismutase. Figure tirée de (Ma et al., 2020)*

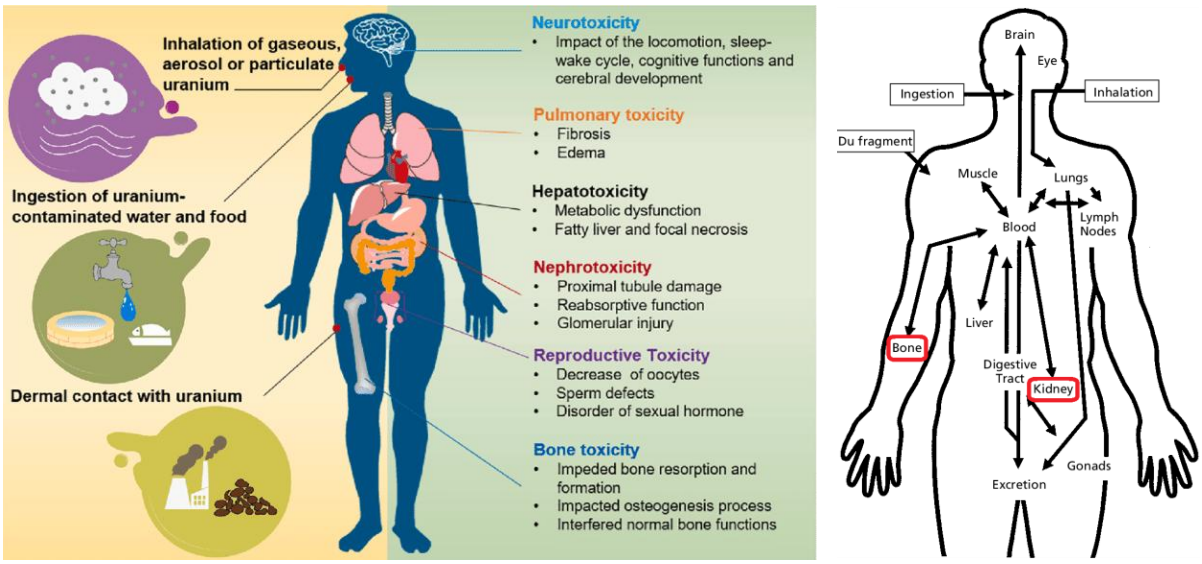


Figure 5 : *A gauche : Principales voies d'exposition et risques sanitaires liés à l'exposition humaine à l'uranium, figure tirée de (Ma et al., 2020). A droite : Transport et accumulation de l'uranium dans le corps humain, figure tirée de (Craft et al., 2004)*

L'uranium peut pénétrer dans l'organisme par l'inhalation de poussières ou par l'ingestion d'aliments et d'eaux contaminés. Une fois dans l'organisme, les formes solubles d'uranium sont transportées dans le sang. Elles forment des complexes à hauteur de 50 % avec des anions carbonates et citrates, 30 % avec des protéines, et 20 % avec les hématies (Sutton & Burastero, 2004). En moyenne, seuls 5 % de l'uranium ingéré sont absorbés et retenus dans le sang. Parmi l'uranium retenu, plus de 67 % sont filtrés par les reins et éliminés par les urines en 24 h après ingestion, 12 à 25 % y restent fixés et 10 à 15 % sont absorbés par les os (L. S. Keith et al., 2015 ; Yu et al., 2021). L'absorption intestinale de l'uranium dépend fortement de la nature des espèces présentes. En effet, les formes insolubles d'uranium sont généralement considérées comme peu absorbables et donc peu toxiques. La capacité d'absorption intestinale augmente avec la solubilité en milieu aqueux des substances étudiées (S. Keith et al., 2013 ; Konietzka, 2015).

Les principaux organes concernés par la toxicité de l'uranium chez l'homme après ingestion orale sont les reins et les os (**Figure 5**). Les reins, en raison de leur rôle de filtration du sang, sont l'organe le plus fortement exposé à l'uranyle. Ce dernier s'accumule dans les tissus rénaux et initie une multitude d'événements moléculaires : dommages à l'ADN par interaction directe avec ce dernier, par la formation de ROS et par interaction avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. La formation de ROS au sein des tissus rénaux provoque également différents phénomènes conduisant à l'apoptose ou à la nécrose des tissus. Dans des cas extrêmes, ces phénomènes peuvent conduire au développement de cancers du rein, voire à une insuffisance rénale, qui peuvent tous deux causer la mort (Guéguen & Frerejacques, 2022 ; Y. Yang et al., 2024). Les os quant à eux sont sujets à une forte accumulation à long terme de l'uranium, en raison de la similarité entre uranium et calcium, qui représente plus de 25 % de la masse osseuse totale. Cette accumulation est particulièrement importante dans le cas d'une exposition chronique, et l'uranium accumulé présente une demi-vie d'élimination particulièrement longue, pouvant aller jusqu'à 200 jours (Vidaud et al., 2012). La présence d'uranium dans les os est associée chez l'humain à une inhibition de la croissance osseuse, et est suspectée d'être à l'origine du développement de cancers des os. L'accumulation de l'uranium dans les os étant un phénomène durable dans le temps, le caractère radiologique de la toxicité de l'uranium est également à prendre en compte au niveau des os (Wade-Gueye et al., 2012 ; Yue et al., 2018). Une accumulation au sein du foie, de la rate et du cerveau est également observable à la suite de l'ingestion de fortes concentrations de métal (**Figure 6**) (Houpert et al., 2007 ; Pellmar, 1999 ; Song et al., 2014).

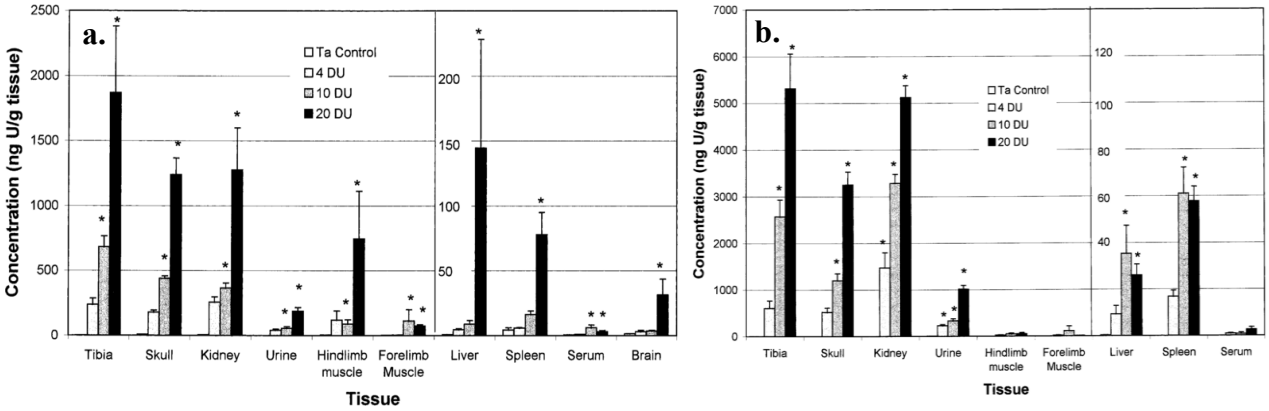


Figure 6 : *Concentrations en uranium dans les tissus de différents organes chez le rat mesurées* ***a.*** *1 mois* ***b.*** *12 mois après injection intramusculaire d'uranium appauvri (DU) que l'on peut estimer à hauteur de : ≈ 100 mg (en blanc), ≈ 250 mg (en gris) et ≈ 500 mg (en noir), en se reportant aux dimensions des billes d'uranium mentionnées dans la publication d'origine (Pellmar, 1999). Figure tirée de (Pellmar, 1999), données interprétées.*

Il est à noter que les organes cibles dépendent de la voie d'exposition. Dans le cas d'une contamination par inhalation, les poumons deviennent la première cible biologique de l'uranium. Ce dernier peut ici causer des fibroses et des cancers du poumon par accumulation des formes peu solubles d'uranium sur le long terme. Les études portant sur la toxicité pulmonaire de l'uranium restent cependant peu nombreuses (Bjørklund et al., 2017 ; S. Keith et al., 2013 ; Tannenbaum et al., 1948).

A ce jour, la plupart des études portent sur la toxicité aiguë de l'uranium, liée principalement à une exposition ponctuelle par contact avec des matières (sols, poussières, liquides) retrouvées dans des zones à forte concentration en uranium telles que des mines ou des usines de raffinage. Les effets associés à sa toxicité chronique sont moins connus. Ils sont dus à une exposition régulière à de faibles doses d'uranium naturel. Les phénomènes biologiques associés à une exposition chronique à l'uranium étant peu connus, il est nécessaire que sa présence et sa concentration dans l'environnement et plus particulièrement dans l'eau soient contrôlées. Depuis la fin du XXe siècle, plusieurs études toxicologiques ont permis de déterminer une concentration seuil à ne pas dépasser dans les eaux de boisson. Cette concentration, définie par l'OMS a d'abord été fixée à 2 µg/L en 1998, pour être progressivement rehaussée jusqu'à 30 µg/L (0,126 µmol/L ; ou 0,6 µg/kg de masse corporelle pour un adulte de 75 kg consommant 1,5 L d'eau par jour) en 2011 (*WHO Guidelines for drinking-water quality, 4th edition*, 2017).

La compréhension des mécanismes de toxicité chimique de l'uranium sur les organismes est cependant complexe. En effet, l'étude des phénomènes de toxicité du métal à différentes concentrations indique que la réponse biologique n'est pas toujours proportionnelle à la concentration totale de métal. Certaines formes insolubles d'uranium semblent présenter un caractère toxique minime, notamment les complexes calciques (Smedley & Kinniburgh, 2023). La spéciation de l'uranium est par conséquent un élément central à la compréhension des phénomènes de toxicité chimique du métal.

1.3.3. Cibles protéiques de l'uranium

Les interactions uranium-protéines sont à la fois impliquées dans la pénétration et la mobilité du métal dans l'organisme, mais également dans les phénomènes de toxicité de ce dernier. Diverses protéines sont décrites dans la littérature pour leur interaction avec l'uranyle. Les études associées permettent de mieux comprendre le comportement de l'uranyle en milieu biologique et de proposer des mécanismes de transport et de toxicité (**Figure 4**). Parmi les protéines impliquées dans les mécanismes toxicologiques associés à l'uranium, on compte notamment :

- La transferrine, une glycoprotéine impliquée dans le transport du fer dans le sang et de l'intestin vers les réserves hépatiques et les réticulocytes. Elle comporte deux sites de fixation qui chélatent le métal au moyen de six ligands (2 Tyr, Asp, His et CO_3^{2-} bidente). Les résidus Tyr peuvent fixer l'uranyle, offrant à la transferrine une forte affinité pour l'uranyle, avec une constante de dissociation Kd = 10^{-16} M (Scapolan et al., 1998 ; **Figure 4**). Les fonctions biologiques de la transferrine lui suggèrent un rôle dans l'internalisation de l'uranium dans les cellules (Thiebault et al., 2007).

- L'albumine, une protéine présente chez de nombreux mammifères. Chez l'être humain, elle est la principale protéine du plasma sanguin, avec une concentration d'environ 35 g/L. Elle est impliquée dans la régulation de la pression osmotique du sang et au transport de nombreux composés. Elle possède deux sites de fixation de cations qui peuvent interagir avec divers éléments, tels que les

métaux alcalins ou le calcium. Les sites de fixation de cations de l'albumine présentent une constante de fixation pour l'uranium respectivement Kd_1 = 63 nM et Kd_2 = 3,9 nM (Duff & Kumar, 2006).

- La fétuine, une protéine du sérum sanguin. Comme l'albumine, elle participe au transport de nombreux composés, et est également impliquée dans la minéralisation des os. Si sa concentration dans le sérum est faible, une étude a pu montrer qu'elle est à l'origine du transport d'environ 80 % de l'uranium présent dans le sang. Elle possède 3 sites de fixation d'U(VI), aux constantes de fixation allant de 30 nM à 10 µM (Basset et al., 2013). Elle est également suspectée de participer à la fixation du métal dans les os (Ma et al., 2020).

1.4. Biodisponibilité

La biodisponibilité d'un composé chimique est définie comme sa capacité à pénétrer dans un organisme vivant. A l'échelle moléculaire, elle se traduit par la capacité du composé à se fixer et à traverser la membrane des cellules. Il n'existe aujourd'hui aucune évidence d'un rôle biologique de l'uranium chez les êtres vivants. L'uranyle, forme majoritaire de l'uranium en solution aqueuse et dans les milieux biologiques présente cependant plusieurs similarités avec le calcium et le fer(III), deux métaux possédant un rôle biologique. Tous sont des acides durs selon la théorie HSAB, sont chargés positivement et possèdent une géométrie de coordination similaire. Plusieurs études ont pu montrer que cette similarité peut rendre l'uranium adsorbable et absorbable par les cellules (Huynh et al., 2016).

Pour qu'un composé puisse être absorbé par un organisme, il doit être soluble dans le milieu biologique concerné. L'U(VI) considéré comme plus soluble présente un risque sanitaire plus important en comparaison avec l'U(IV). Certaines des formes complexées d'U(VI) sont cependant peu solubles et donc peu biodisponibles, leur conférant une toxicité largement moindre.

Le lien entre la spéciation de l'uranium et sa biodisponibilité a par le passé été étudiée dans un contexte d'eaux de laboratoire contrôlées (S. J. Markich, 2002). Cependant, peu d'études ont analysé ce phénomène dans des eaux naturelles ou dans des sédiments. Plusieurs études ont caractérisé la biodisponibilité de l'uranium en milieu aquatique, en utilisant des organismes marins comme modèle. Par exemple, une étude réalisée sur la moule V*elesunio angasi* a permis de montrer que la réponse biologique de l'organisme est associée majoritairement à l'activité relative des formes UO_2^{2+} et UO_2OH^+ plutôt qu'à la concentration totale d'uranium, avec une contribution environ 2 fois plus élevée d'UO_2^{2+} par rapport à UO_2OH^+. Cette même étude a pu montrer qu'à concentration d'uranium totale égale, une toxicité 10 fois plus forte était observée à pH 5 par rapport à pH 6, une gamme de pH où la forme majoritaire est UO_2^{2+} (S. Markich, 2000).

Chez différentes espèces d'algues vertes (*Chlorella spaerckii*, *C. regularis* et *C. vulgaris*, *Coelastrella sp.*), la toxicité maximale de l'uranium a pu être observée entre pH 5 et 6, avec une diminution exponentielle de cette dernière avec l'augmentation du pH jusqu'à pH 9 (Beaulier et al., 2024 ; Greene et al., 1986 ; Hogan et al., 2005; Nakajima et al., 1979). Cette variation de la toxicité en fonction du pH et donc de la spéciation de l'uranium a été observée chez d'autres organismes. Chez le pois *Pisum sativum* cultivé en hydroponie, l'absorption maximale d'uranium par les racines a pu être observée à pH 5, avec une diminution de moitié à pH 6. L'ensemble de ces résultats indique que la biodisponibilité de l'uranium est directement influencée par la concentration en UO_2^{2+} en solution (Ebbs et al., 1998). En plus du pH, une forte contribution des caractéristiques des milieux et en particulier la présence et la concentration de certains sels comme les carbonates et les phosphates ont pu être démontrées (Charles et al., 2002 ; Greene et al., 1986). Il a également été démontré que la

présence de calcium dans les sols conduit à une diminution de l'absorption d'uranium par les racines chez *Brassica juncea* (El Hayek et al., 2018) et chez *Arabidopsis thaliana* (Sarthou et al., 2022)

L'importance de la spéciation de l'uranyle et de la présence d'ions compétiteurs dans le milieu a également pu être observée pour des études chez l'homme. Des échantillons d'eau provenant de puits situés dans des régions uranifères de Finlande possèdent une concentration particulièrement élevée d'uranium. Les populations consommant cette eau de manière quotidienne ne présentent cependant pas de symptômes cliniques associés à la toxicité chronique ou aiguë de l'uranium. Ces observations ont été attribuées à la forte concentration en calcium dans ces eaux, qui conduit à la prédominance de complexes d'uranyle tricarbonatés calciques, principalement $Ca_2UO_2(CO_3)_3$ et $CaUO_2(CO_3)_3^{2-}$, tous deux peu biodisponibles en solution aqueuse (Prat et al., 2009).

La forte variation de la toxicité de l'uranium en fonction des milieux où il se trouve rend la détermination des valeurs seuils complexe. Ainsi, la capacité à corréler la toxicité et la fraction biodisponible de l'uranium est un élément clé dans la surveillance de l'impact environnemental et sanitaire du métal.

1.5. Méthodes de détection de l'uranium en solution

Il existe un grand nombre de méthodes de détection de l'uranium, souvent complémentaires, avec différents avantages et inconvénients. Puisque l'ingestion d'uranyle chez l'homme est due en majorité à la consommation d'eau, à hauteur de 70 % (Smedley & Kinniburgh, 2023), nous nous intéresserons ici uniquement aux techniques de détection d'uranium en solution. Ces dernières sont très sensibles, avec une limite de détection (LOD) de l'ordre du ng/L, soit bien en dessous des limites fixées par l'OMS. On peut distinguer deux types de méthodes d'analyse. Les techniques dites nucléaires sont basées sur la mesure de rayonnements alpha et/ou gamma, qui permettent de remonter à la concentration en uranium de l'échantillon. Elles sont sensibles et permettent de connaître le fractionnement isotopique du métal, mais présentent l'inconvénient d'un temps d'analyse particulièrement long, pouvant durer jusqu'à plusieurs jours. Les techniques dites élémentaires quant à elles mesurent la concentration en uranium de la solution par la détection de signaux spécifiques de cet élément tels que la fluorescence (par fluorimétrie laser), l'absorption de rayons X ou encore mesurent directement la présence des composés (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Les techniques élémentaires les plus couramment utilisées sont l'ICP-MS et la fluorimétrie laser (**Figure 7**). Des exemples de techniques utilisées actuellement pour la détection d'uranium en solution sont présentées en **Tableau 2**.

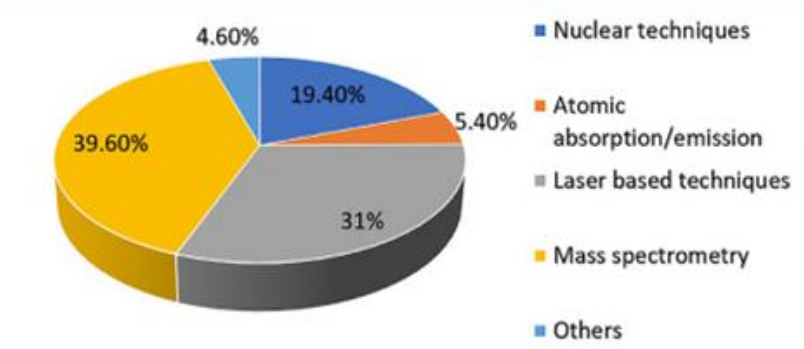


Figure 7 : *Utilisation de différentes techniques pour la détection de l'uranium. Figure tirée de (Balaram et al., 2022)*

L'ICP-MS est la technique offrant la meilleure combinaison de sensibilité, rapidité et coût (Himri et al., 2000 ; Rani et al., 2013). Elle permet également la détection simultanée de plusieurs éléments, et couvre la quasi-totalité du tableau périodique. De par sa nature (minéralisation des échantillons), elle est limitée à l'analyse de la concentration totale en élément et ne tient pas compte de la spéciation de l'uranium dans ses conditions environnementales. Cette technique est également limitée par le coût et la faible portabilité des équipements.

La fluorimétrie laser est une autre approche offrant une bonne sensibilité, associée à des analyses rapides et robustes (deNeufville et al., 1981). Elle est cependant limitée par une faible portabilité. Cette limitation est surmontée par la fluorimétrie LED, une variante à la fluorimétrie laser, qui permet également l'application de la technique à des analyses de terrain (Rathore et al., 2023). Ces techniques permettent de quantifier l'uranium en solution mais ne donnent que peu d'informations concernant sa spéciation.

Le peu d'informations concernant la spéciation des échantillons est un élément récurrent aux techniques d'analyse physico-chimiques. Si certaines méthodes permettent de distinguer ses différents isotopes, rares sont celles qui permettent de doser les différentes formes chimiques. Il est possible de mesurer différentes caractéristiques du milieu indépendamment du dosage de l'uranium, et d'utiliser des modèles thermodynamiques et mathématiques pour calculer la spéciation du métal dans son milieu naturel (Mühr-Ebert et al., 2019 ; X. Wang et al., 2019). Cette approche reste cependant moins précise que le dosage direct des différentes espèces chimiques, et implique des étapes supplémentaires de traitement des données. La perte d'informations concernant la spéciation du métal limite la compréhension des phénomènes toxicologiques liés à cette dernière.

Technique	Limite de détection	Avantages	Information	Référence
ICP-MS	0,031 ng/L	Ionisation des composés par plasma à couplage inductif et séparation en fonction du rapport masse/charge	Concentration, isotopes	(Satyanarayanan et al., 2018)
Fluorimétrie laser	0,04 µg/L	Irradiation UV de l'échantillon et dosage de la fluorescence émise	Concentration	(Sahoo et al., 2010)
Fluorimétrie LED	0,2 µg/L			(Balaram et al., 2022)
Spectrométrie alpha	0,22 mBq/L (^{234}U, ^{238}U) 0,022 mBq/L ^{235}U	Détection des particules α en fonction de leur énergie	Concentration, isotopes	(Jia et al., 2002)
Spectrométrie gamma	1,5 mBq/L (^{238}U)			(Korun & Kovačič, 2011)
Spectroscopie Raman	0,2 ng/L	Irradiation de l'échantillon puis observation de la diffusion de photons	Concentration, spéciation	(Ruan et al., 2007)
Analyse cinétique phosphorimétrique	1 ng/L	Irradiation UV-visible de l'échantillon puis observation de phosphorescence	Concentration	(Brina & Miller, 1992)

Tableau 2 : *Techniques utilisées pour la détection d'uranium en solution.*

Parmi les méthodes capables de déterminer les différentes formes d'U(VI) en solution, on compte principalement :
- La chromatographie échangeuse d'anion (Dong & Brooks, 2008), une technique de séparation de composés selon leur taille et leur charge. Couplée à une technique d'analyse, elle permet d'identifier indépendamment les espèces présentes dans un échantillon.
- La spectroscopie UV-visible (Meinrath, 1997) et la spectroscopie par fluorescence laser en temps résolu (Richter et al., 2016), qui permettent de distinguer des composés présentant un spectre ou une cinétique de déclin de fluorescence caractéristique.
- L'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure ; Krot et al., 2022), qui offre de nombreuses informations concernant l'environnement chimique d'un élément par analyse de son spectre d'absorption des rayons X.
- La spectroscopie Raman (Lu et al., 2018), et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, Müller et al., 2008), qui permettent d'identifier les fonctions chimiques des molécules en enregistrant les spectres vibrationnels des différentes espèces présentes dans un échantillon.

1.6. Détection de l'uranium dans un contexte de surveillance environnementale

Si ces techniques sont pour la plupart sensibles, elles sont souvent limitées à des solutions de laboratoire de composition simple et contrôlée et ne permettent pas l'analyse d'échantillons naturels complexes. La surveillance environnementale a deux objectifs principaux : la surveillance en continu des sites, et la capacité à alerter en cas d'échantillons pollués. Elle requiert de pouvoir réaliser des analyses fréquentes. Les analyses doivent également être peu chères, rapides et faciles à mettre en œuvre. L'objectif d'alerte quant à lui vise à rendre compte rapidement voire en temps réel de l'état sanitaire de sites surveillés. Cela implique une analyse et une obtention de résultats rapides et sans équivoque, idéalement sur site.

Les techniques présentées ci-dessus montrent une limitation pour plusieurs de ces critères :
- Elles requièrent pour la plupart une collecte et un traitement parfois long des échantillons au préalable de l'analyse, générant un certain délai avant l'obtention d'informations.
- Le coût de l'analyse, souvent lié aux consommables utilisés mais également au fonctionnement des appareils, limite également l'analyse de grands nombres d'échantillons.
- Les équipements et appareils utilisés sont peu ou pas transportables et non adaptés à des analyses de terrain.

La capacité à fournir des mesures sensibles, rapides et réalisables sur le terrain est un aspect clé à la détection d'uranium dans l'environnement. La capacité à détecter des formes spécifiques d'uranium est un élément majeur dans la compréhension des mécanismes toxicologiques associés au métal. Dans ce contexte, parmi les approches alternatives aux techniques physico-chimiques présentées, le développement de senseurs et plus particulièrement de biosenseurs semble être un axe de recherche prometteur.

2. Biosenseurs

Un senseur est défini comme un outil capable de répondre à la détection d'un changement physico-chimique dans son environnement et de convertir ce changement en un signal détectable. Les biosenseurs sont une catégorie de senseurs utilisant une ou plusieurs composantes biologiques (anticorps, protéine, ADN, cellule) dans leur fonctionnement (Bhalla et al., 2016 ; Naresh & Lee, 2021).

Un biosenseur est composé de 4 éléments principaux (**Figure 8**) :
- Un récepteur ou biorécepteur, capable de percevoir le changement à analyser. La détection d'un analyte par un biorécepteur est appelé « bioreconnaissance ».
- Un transducteur, une composante transformant une source d'énergie en une autre. Dans le cadre d'un biosenseur, il a pour objectif de produire un signal proportionnel au changement observé par le biorécepteur. Le transducteur agit fréquemment comme outil d'ancrage du biorécepteur (polymère, électrode, membrane cellulaire). Certains biosenseurs combinent les éléments de bioreconnaissance et de transduction.
- Une partie électronique permettant de traiter le signal du transducteur pour l'amplifier, le convertir en un signal digital et l'adapter à l'affichage.
- Un affichage ayant pour but d'apporter une interprétation visuelle et aisément compréhensible par l'utilisateur du changement observé par le biorécepteur.

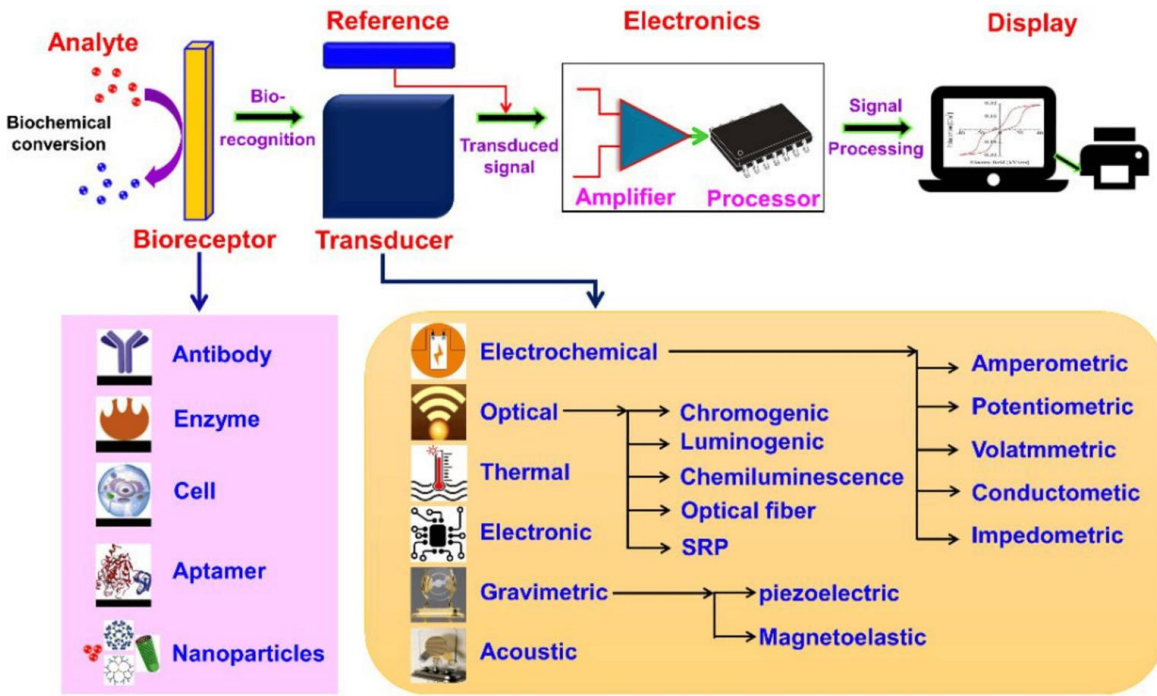


Figure 8 : *Principe de fonctionnement d'un biosenseur et exemples de biorécepteurs et de transducteurs. Figure tirée de (Naresh & Lee, 2021)*

Le premier biosenseur a été décrit en 1962 par Leland Clark Jr. et consiste en une électrode capable de détecter le taux d'oxygène dans le sang (Clark & Lyons, 1962). Ces travaux ont été modifiés en 1967 par Hicks et Updike pour conduire au premier biosenseur de glucose, constitué d'une enzyme, la glucose oxydase, associée à une électrode (Updike & Hicks, 1967). Cette enzyme

oxyde le glucose en acide gluconique, avec comme sous-produit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, qui est l'espèce détectée. La concentration en peroxyde d'hydrogène est directement corrélée à l'activité enzymatique et donc à la concentration de glucose en solution. Ce biosenseur de première génération est caractérisé par la séparation du détecteur et du transducteur et par l'utilisation d'un cofacteur libre sous la forme d'oxygène. Une seconde génération de biosenseurs a introduit un composé permettant le transfert d'électron, appelé médiateur. Ce dernier consiste en un métal ou une petite molécule chimique éventuellement ancrée à une électrode (Scheller et al., 1991). La troisième génération de biosenseurs est caractérisée par l'interaction directe du biorécepteur avec son transducteur en l'absence de médiateur de signal (Das et al., 2016). L'absence de médiateur facilite largement le développement d'outils, et ce à moindre coût. Les performances analytiques des biosenseurs associés sont également améliorées (rapidité, robustesse, caractéristiques de milieux). Cette nouvelle génération recouvre une large majorité des biosenseurs développés aujourd'hui (**Figure 9**).

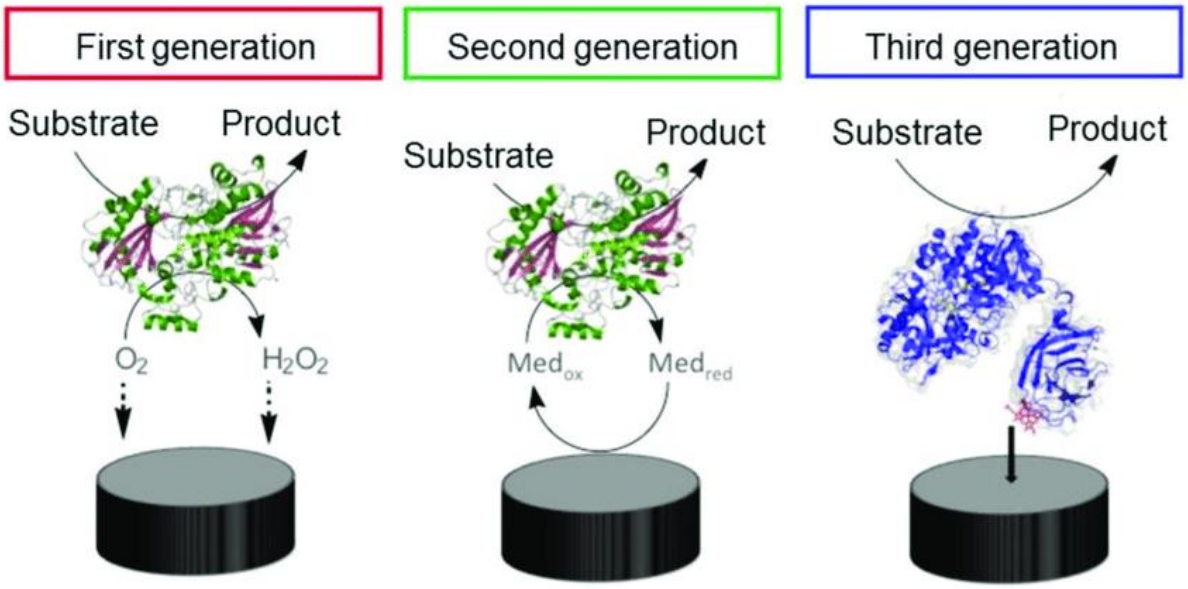


Figure 9 : *Principe de fonctionnement des biosenseurs de 1ère, 2e et 3e génération. La protéine indiquée en vert agit comme biorécepteur, et l'électrode est indiquée en gris. Figure tirée de (Fernández et al., 2017)*

Les biosenseurs permettent de détecter de nombreux analytes, de manière aisée et sensible. Ils sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines, tels que les analyses biomédicales, l'agroalimentaire, la pharmacologie ou encore la surveillance environnementale (Mehrotra, 2016). Des exemples notables d'utilisation commerciale de biosenseurs sont les détecteurs de glucose portatifs (Pullano et al., 2022), les tests de grossesse (Yuksel et al., 2023) ou encore l'identification de pathogènes tels que le COVID (John et al., 2023), le VIH (Farzin et al., 2020) ou encore la malaria (Krampa et al., 2020).

2.1. Classification des biorécepteurs

On peut distinguer différents types de biosenseurs selon la nature de leur biorécepteur (**Figure 8**) :

- Enzymes : L'activité catalytique d'une enzyme est l'outil de mesure. L'analyte peut agir comme substrat de l'enzyme ou comme inhibiteur/promoteur de l'activité catalytique. En biodétection, les enzymes sont limitées par leurs propriétés intrinsèques, principalement une structure fragile et peu modifiable, et la sensibilité de leur activité catalytique. Les enzymes sont souvent associées à des signaux optiques ou électrochimiques (Fan et al., 2023). Les biosenseurs enzymatiques sont couramment utilisés pour la détection de composés biologiques tels que les sucres ou les alcools, mais également des toxiques (pesticides, additifs alimentaires) (Economou et al., 2017).

- Aptamères : Les aptamères sont des oligonucléotides simple-brin synthétiques d'ADN ou d'ARN. L'utilisation d'aptamères offre de nombreux avantages : ils sont stables dans une large gamme de conditions, faciles à synthétiser et à modifier chimiquement. Les biosenseurs utilisant des aptamères sont de manière générale ceux présentant la limite de détection d'un analyte la plus basse. Ils utilisent pour la plupart des signaux de transduction optiques, électrochimiques ou thermiques (Kumar et al., 2019 ; Tombelli et al., 2005). Les aptamères sont utilisés dans de nombreux domaines tels que la détection de composés chimiques (Sachan et al., 2016) ou de pathogènes (Duan et al., 2014 ; Feng et al., 2011 ; Ning et al., 2014).

- Anticorps : Les anticorps sont des biorécepteurs présentant une forte interaction avec l'analyte correspondant. Les biosenseurs à base d'anticorps sont appelés immunosenseurs (Blake et al., 2001 ; Byrne et al., 2009). Ils sont généralement sensibles, sélectifs et peu coûteux. Ils présentent de nombreuses applications commerciales dans la détection de pathogènes et de biomarqueurs, le plus couramment sous la forme de tests de grossesse ou d'alcoolémie (Ahmed et al., 2019).

- Nanomatériaux : Les biosenseurs basés sur des nanomatériaux ou nanoparticules sont différents des catégories précédentes. Les nanoparticules peuvent agir comme biorécepteur et/ou comme transducteur (nanoparticules, microbilles d'or, quantum dots). Ils sont utilisés dans une très large gamme d'applications (Holzinger et al., 2014 ; Malhotra & Ali, 2018).

- Protéines : Le terme de biosenseur protéique se distingue des biosenseurs basés sur des enzymes ou des anticorps, tous deux étant pourtant de nature protéique. Les biosenseurs protéiques utilisent des peptides et/ou des protéines comme biorécepteur, qui peuvent être associés à une ou plusieurs protéines fluorescentes faisant office de transducteur. Ces protéines fluorescentes peuvent dans certains cas remplir le rôle de récepteur et de transducteur, constituant un système autonome. Ces biosenseurs sont codés génétiquement, facilitant leur production par des bactéries, et offrant la possibilité d'une utilisation *in vivo* (Chai et al., 2023 ; Martinkova et al., 2017 ; Nam, 2023). Les biosenseurs protéiques sont sujets à une large gamme d'applications, comme la détection de toxines ou de pathogènes (Quijano-Rubio et al., 2021).

- Whole-cell : Les biosenseurs whole-cell ou cellules entières utilisent une cellule vivante comme biorécepteur, le plus souvent un micro-organisme (bactérie, champignon, algue). La cellule peut produire une variété d'éléments de bioreconnaissance tels que des anticorps ou des protéines d'intérêt, qui peuvent être fonctionnels sans besoin de purification. La production du biosenseur par culture est rapide et à moindre coût (Bousse, 1996 ; Gui et al., 2017). Les biosenseurs whole-cell sont couramment utilisés dans le domaine biomédical (Raut et al., 2012) ou encore l'agroalimentaire (Moraskie et al., 2021).

2.2. Classification des transducteurs

La littérature recense une large variété de signaux de transduction dans le développement de biosenseurs (**Figure 8**) :

- Électrochimiques : La transduction électrochimique est basée sur une interaction entre l'analyte et le biorécepteur captée par une électrode faisant souvent office d'ancrage du récepteur. Elle est la plus utilisée en raison de sa forte sensibilité (Grieshaber et al., 2008 ; Naresh & Lee, 2021).

- Optiques : Les biosenseurs optiques consistent en un biorécepteur intégré à un transducteur optique. Les signaux optiques les plus utilisés sont la fluorescence, la chimioluminescence ou encore la SPR (surface plasmon resonance) (Damborský et al., 2016 ; Naresh & Lee, 2021). L'utilisation de transducteurs optiques permet souvent une lecture de signal facilitée et compatible avec des observations *in vivo*.

- Gravimétriques : Les biosenseurs gravimétriques sont basés sur la détection d'un changement de masse du récepteur lors de la fixation de son analyte. Ils utilisent principalement des cristaux de quartz piézoélectriques vibrant à une fréquence connue et correspondant à la fixation de l'analyte (Cali et al., 2020).

- Thermiques : Les biosenseurs thermiques sont basés sur la mesure par un transducteur adapté du caractère endo/exothermique d'une réaction chimique. L'enthalpie de réaction permet d'identifier le nombre de molécules d'analyte mises en réaction. Les signaux de transduction thermiques sont limités par leur forte diffusion et la faible quantité d'informations qu'ils apportent (spécificité du signal, artefacts) (Ramanathan, 1999 ; Ramanathan & Danielsson, 2001).

- Électroniques : Les biosenseurs électroniques utilisent des transistors comme récepteur, greffés sur une membrane conductrice. Le système est soumis à un potentiel électrique, qui peut être modifié en présence d'analyte. La mesure des variations de potentiel du système permet de connaître la quantité d'analyte fixé (Chang et al., 2023 ; Presnova et al., 2017).

- Acoustiques : Les biosenseurs acoustiques fonctionnent par la mesure de la perturbation d'une onde mécanique par un récepteur en contact avec son analyte. Leurs composantes sont souvent similaires à celles des biosenseurs gravimétriques (Fogel et al., 2016 ; Nair et al., 2021).

2.3. Critères de performance des biosenseurs

Un biosenseur peut être évalué selon différents critères de performance, pour la plupart communs à de nombreuses méthodes d'analyse (Bhalla et al., 2016 ; Morales & Halpern, 2018) :

- Sensibilité/affinité : Elle est définie comme la relation entre la concentration en analyte et l'intensité du signal produit par le transducteur. La notion de sensibilité englobe à la fois la limite de détection du biosenseur, et la précision de mesure dans une gamme de concentrations donnée.

- Sélectivité : Souvent considérée comme le paramètre le plus important d'un biosenseur, la sélectivité caractérise la capacité d'un biorécepteur à produire un signal en présence de son analyte de choix en milieu complexe ou biologique.

- Linéarité de réponse : La linéarité de réponse d'un biosenseur est un paramètre parfois associé à sa sensibilité. Elle décrit la gamme de concentration en analyte pour laquelle la réponse du biosenseur est proportionnelle à la concentration en analyte (de type $y = ax + b$).

- Reproductibilité : La reproductibilité est définie comme la capacité d'un biosenseur à fournir une réponse identique en présence d'une concentration en analyte donnée et dans des conditions identiques.

- Robustesse : La robustesse d'un biosenseur est sa capacité à tolérer des perturbations du milieu de mise en œuvre (présence de compétiteurs, variations de paramètres physico-chimiques). La robustesse est souvent associée au maintien de l'affinité du biorécepteur sous différentes conditions et à la sensibilité du transducteur à différents paramètres comme la température. La robustesse est un élément clé à l'utilisation de biosenseurs dans un contexte d'analyses biologiques ou environnementales.

- Réutilisabilité : La réutilisabilité d'un biosenseur est sa capacité de réutilisation sans perte de performances. Elle dépend de la capacité de régénération du biorécepteur après son interaction avec l'analyte. Les biosenseurs basés sur l'affinité du biorécepteur avec son analyte doivent souvent subir un traitement pour revenir à leur état basal. Ce traitement doit être en mesure de régénérer 100 % du biorécepteur, de manière non destructive. La réutilisabilité influence fortement le coût des biosenseurs, notamment dans le contexte d'analyses à haut débit ou de l'utilisation de biorécepteurs coûteux.

2.4. Biosenseurs de métaux

2.4.1. Biosenseurs de métaux *in vitro*

Le développement de biosenseurs de métaux est motivé par le coût et la complexité des méthodes physico-chimiques existantes. La littérature comprend une multitude de publications portant sur le développement de biosenseurs de métaux. Les métaux détectés sont le plus souvent le plomb, le cuivre, le mercure et le cadmium, et les biosenseurs associés visent le plus souvent à effectuer une détection dans des eaux environnementales ou de boisson (**Tableau 3** ; Chauhan et al., 2022 ; Velusamy et al., 2022). Les biosenseurs utilisés pour la détection de métaux utilisent pour la plupart des signaux de transduction électrochimiques tels que la voltamétrie, l'ampérométrie ou la conductimétrie, qui représentent plus de 80 % des biosenseurs de métaux décrits dans la littérature. Ceci est expliqué en partie par le faible coût des instruments analytiques associés, principalement des électrodes. Par comparaison, les biosenseurs de métaux utilisant des signaux de transduction de type SPR ou infrarouge sont moins représentés en raison du coût d'acquisition et de maintenance des appareils. Les biosenseurs fluorescents, pour lesquels l'acquisition de signal est par comparaison aisée et sensible, représentent environ 5 % des biosenseurs de métaux décrits dans la littérature (Rocha et al., 2021). Des exemples de biosenseurs de métaux sont donnés dans le **Tableau 3**.

Analyte	Biorécepteur	Signal de transduction	LOD	Référence
Pb^{2+}	DNA-zyme	Optique (DLS)	35 pM	(Miao et al., 2011)
Zn^{2+}	Phosphatase alcaline	Calorimétrie	10 µM	(Satoh, 1991)
Zn^{2+}	Gluthatione S-transferase	Impédance	1 fM	(SaatÇİ et al., 2007)
Cd^{2+}	Whole-cell/ gène rapporteur	Fluorescence	3 nM	(M.-Y. He et al., 2021)
Cu^{2+}	Pyoverdine	Fluorescence	50 nM	(Yin et al., 2016)
Hg^{2+}	Aptamère	Impédance	100 pM	(Cao et al., 2009)
Ag^{+}	Aptamère	Voltamétrie	48 pM	(Zhou et al., 2015)
UO_2^{2+}	Fibre optique	Optique	19 µM	(Alberti et al., 2022)
UO_2^{2+}	DNA-zyme / fluorophore	Fluorescence	45 pM	(Liu et al., 2007)
UO_2^{2+}	DNA-zyme	Spectroscopie raman	3,7 fM	(X. He et al., 2019)
UO_2^{2+}	Protéine / électrode	Impédance	1 pM	(Conroy et al., 2010)
UO_2^{2+}	Whole-cell / gène rapporteur	Fluorescence	4,2 µM	(Hillson et al., 2007)

Tableau 3 : *Exemples de biosenseurs de métaux*

Durant les dernières années, de nombreux biosenseurs d'uranyle ont été développés. On retrouve parmi eux une grande diversité de biorécepteurs (principalement des protéines, anticorps et aptamères) et de signaux de réponses (principalement électrochimiques ou optiques). Ces senseurs offrent pour la plupart des performances analytiques similaires voire meilleures que les méthodes physico-chimiques présentées précédemment. Les biorécepteurs présentant les meilleures performances sont les DNA-zymes (**Figure 10**), avec des limites de détection de l'ordre du picomolaire, voire du femtomolaire (Bai et al., 2022 ; X. He et al., 2019 ; Liu et al., 2007; Yun et al., 2019). Ces derniers consistent en un aptamère contenant un fluorophore et un inhibiteur de ce dernier. La fixation du métal entraîne le clivage de l'aptamère et la libération du fluorophore. L'observation de la fluorescence émise rend compte de la présence du métal dans l'échantillon. L'aptamère peut être modifié et être rendu affin et sélectif pour différents analytes.

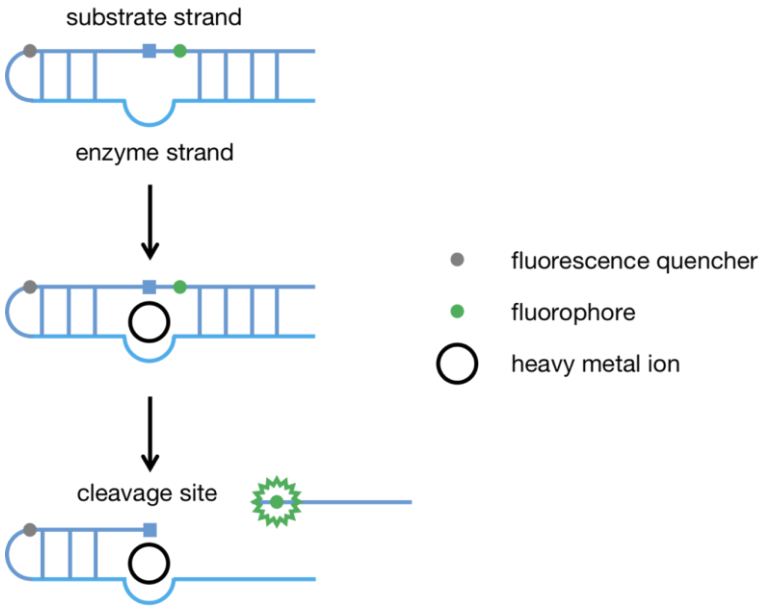


Figure 10 : *Principe de fonctionnement des biosenseurs basés sur des DNA-zymes.*

Parmi les biosenseurs présentant une forte affinité pour l'uranyle, on compte également plusieurs systèmes utilisant un anticorps comme biorécepteur. De nombreux anticorps aux performances variées sont décrits dans la littérature, dont plusieurs offrent une limite de détection pour l'uranyle subnanomolaire (Averseng et al., 2010 ; D. A. Blake et al., 2015 ; R. C. Blake et al., 2004).

2.4.2. Biosenseurs whole-cell

Les biosenseurs peuvent être classés en deux catégories : les biosenseurs *in vitro* et les biosenseurs *in vivo*, ou whole-cell ou cellule entière (Bousse, 1996 ; Gui et al., 2017). Les biosenseurs *in vitro* sont caractérisés par un biorécepteur immobilisé le plus souvent sur une membrane ou sur une électrode, qui fait office de transducteur. Un contexte *in vitro* permet de contrôler les paramètres physico-chimiques du milieu, et de travailler dans des conditions optimales, à la fois en termes de l'interaction du biorécepteur avec son analyte et de transduction du signal. Les biosenseurs *in vitro* offrent une limite de détection souvent très basse, associée à une forte sélectivité et un temps d'analyse réduit. Ils sont cependant contraints à d'autres limitations, notamment le coût de production et de purification des composantes biologiques, associées à une durée de vie souvent courte.

Par opposition, les biosenseurs whole-cell sont caractérisés par l'utilisation d'un biorécepteur localisé dans une cellule vivante. Les premiers biosenseurs whole-cell ont été développés dans les années 1990, et représentent aujourd'hui une partie non négligeable des outils de détection dans différents domaines tels que la surveillance environnementale et les diagnostics biomédicaux (Raut et al., 2012). On remarque par exemple l'utilisation de *Pseudomonas putida* pour la détection de phénanthrène et de mercure dans des sols (Wei et al., 2014), ou encore l'emploi de *Deinococcus desertii* pour le dosage d'arsenic dans l'eau (Brutesco et al., 2017). Ce type de biosenseurs offre une utilisation facilitée dans un contexte d'analyses à haut débit ou de micro-fabrication, à savoir la production à très petite échelle de systèmes ou d'outils (Bousse, 1996).

Seuls les biosenseurs whole-cell peuvent mesurer la fraction biodisponible d'un composé (Chen et al., 2023 ; Zhang et al., 2022). Ils sont de ce fait un outil de choix pour mieux appréhender les risques liés à la présence de polluants dans l'environnement et les mécanismes de réponse cellulaire associés. Les principales limitations des biosenseurs whole-cell sont liées à l'environnement cellulaire. Ils ont une sensibilité et une sélectivité réduites en raison du contexte cellulaire, ainsi qu'un temps analyse augmenté (Turdean, 2011). La conception du biosenseur est également plus complexe que celle des biosenseurs *in vitro*, principalement par la limitation du choix de récepteurs et de signaux utilisables.

La plupart de ces biosenseurs impliquent l'utilisation d'un gène rapporteur codant une protéine fluorescente (**Figure 11**). Le biorécepteur est une protéine régulatrice, qui lors de la fixation de l'analyte active l'expression d'un gène rapporteur, le plus souvent une protéine fluorescente de type GFP (Hakkila et al., 2002) ou luciférase (Bazhenov et al., 2023). Le système de gène rapporteur est aujourd'hui utilisé pour la détection de nombreux analytes, tels que des composés organiques (Heitzer et al., 1994), des métaux (Choi et al., 2008), des bactéries ou virus pathogènes (Ripp, 2009). Une alternative à cette approche est l'utilisation d'éléments rapporteurs capables de fournir de manière autonome un signal mesurable en présence d'analyte. Le récepteur et le transducteur sont entièrement codés génétiquement. Le signal de transduction le plus souvent utilisé par des biosenseurs whole-cell à rapporteurs autonomes est la fluorescence, et plus précisément le FRET.

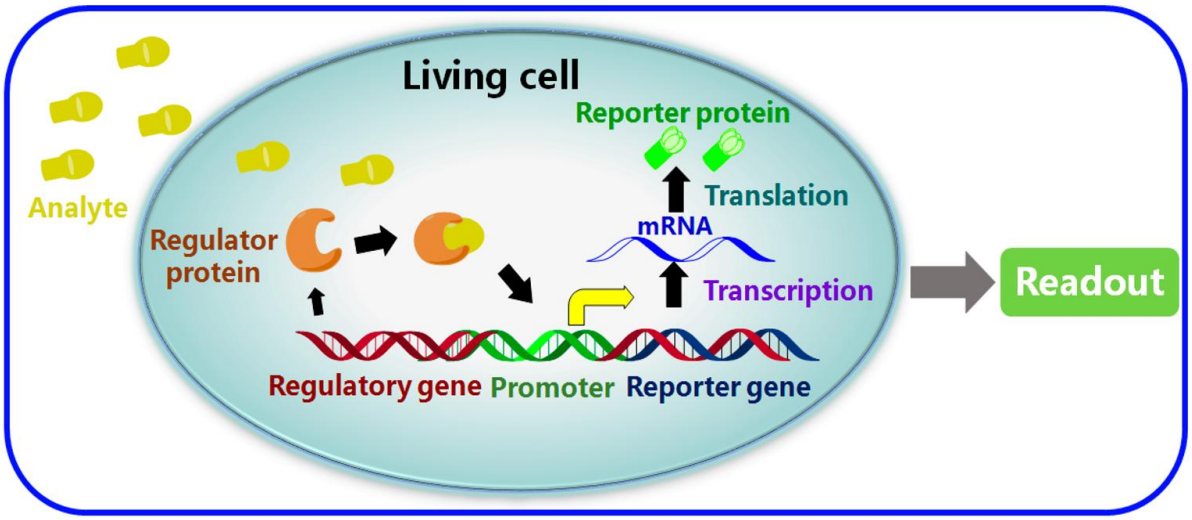


Figure 11 : *Principe de fonctionnement d'un biosenseur whole-cell utilisant le système de gène rapporteur. Figure tirée de (Gui et al., 2017)*

2.4.3. Biosenseurs whole-cell d'uranyle

S'il existe aujourd'hui une multitude biosenseurs d'uranyle *in vitro*, seul un biosenseur d'uranyle *in vivo* est décrit dans la littérature. Ce dernier repose sur l'utilisation d'une souche modifiée de la bactérie à gram négatif *Caulobacter crescentus* (**Figure 12**) (Hillson et al., 2007 ; D. M. Park & Taffet, 2019). L'analyse transcriptomique de *C. crescentus* a permis d'observer une régulation positive de certains gènes en présence d'uranium. Le promoteur de ces gènes a été utilisé pour réguler l'expression d'une protéine fluorescente de type GFP en réponse à l'uranium. Une souche de *C. crescentus* exprimant deux récepteurs membranaires d'uranyle, UzcRS et UrpRS a été

créée. La fixation de métal par ces protéines active les promoteurs de deux gènes, respectivement Pphyt et PurcB. La production simultanée des protéines codées par les gènes phyt et urcB permet l'expression d'une GFP. Les récepteurs UzcRS et UrpRS doivent être activés simultanément pour que la GFP soit produite, permettant d'augmenter fortement la sélectivité pour l'uranyle. La fluorescence est observée directement sur les cellules, et rend compte de l'activation des promoteurs, donc de la présence d'uranyle dans le milieu. La limite de détection de ce système est de 1 µM (D. M. Park & Taffet, 2019).

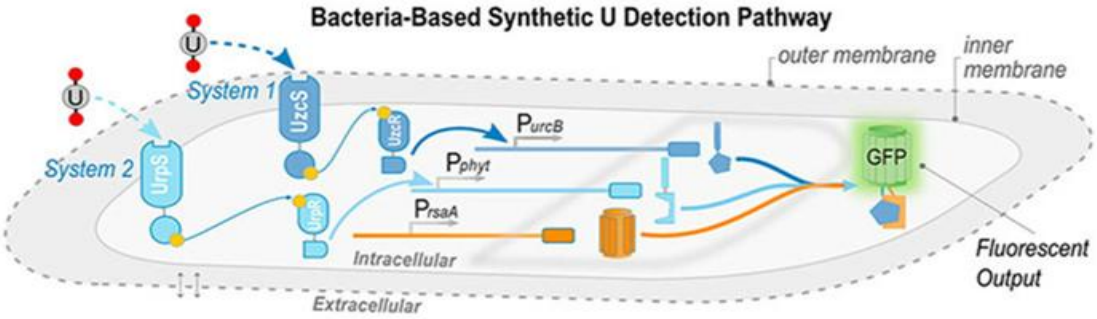


Figure 12 : *Principe de fonctionnement du biosenseur d'uranyle whole-cell chez C. crescentus. UrpS et UzcS agissent ici comme récepteurs d'ions uranyle, et activent en présence de métal le promoteur des gènes phyt et urcB respectivement. L'expression des protéines codées par les deux gènes phyt et urcB sont nécessaires à l'expression d'une GFP rapportrice. Figure tirée de (D. M. Park & Taffet, 2019)*

L'utilisation d'un modèle bactérien comme biosenseur whole-cell est une limitation à l'étude de la biodisponibilité du métal pour l'homme. En effet les bactéries et l'humain présentent une homologie génétique faible, de l'ordre de 2 %. Par conséquent, les voies de pénétration du métal dans l'organisme ainsi que les réponses biologiques associées sont différentes dans les deux organismes. L'utilisation de modèles biologiques plus proches de l'homme permettrait d'établir une corrélation plus fiable entre fraction d'uranium biodisponible et conséquences physiologiques. Ces modèles peuvent également être associés à des protéines présentes chez l'humain et connues pour leur interaction avec l'uranium, permettant ainsi de mieux rendre compte des mécanismes d'absorption et de toxicité du métal. Parmi les protéines remplissant ces conditions, la calmoduline (CaM) semble être un candidat de choix, à la fois pour ses propriétés physico-chimiques et pour son implication dans de nombreux processus biologiques.

3. La Calmoduline (CaM)

La forte similarité de propriétés chimiques entre le cation uranyle UO_2^{2+} et le Ca^{2+} permet à l'uranyle d'interagir avec des protéines au niveau de sites normalement dédiés à la fixation de calcium. On retrouve parmi ces protéines la calmoduline (CaM pour Calcium Modulated Protein), une protéine ubiquitaire chez les eucaryotes. Elle interagit avec quatre ions Ca^{2+} avec des affinités dans une gamme de concentrations allant de 10^{-6} M à 10^{-2} M, et joue un rôle de régulation de nombreux processus biologiques liés au calcium (Cheung, 1980 ; Means & Dedman, 1980). La calmoduline a été largement étudiée. Une de ses caractéristiques est un changement de conformation lors de la fixation d'ions Ca^{2+}. Sa petite taille et ses propriétés structurales en font un outil de choix pour de nombreux objets d'étude, tels que les interactions protéines-cation ou l'étude des flux calciques chez les organismes (Helassa et al., 2015 ; Miyawaki et al., 1997). De par son affinité relativement faible pour le calcium, la calmoduline peut interagir avec différents métaux (Habermann et al., 1983 ; Kursula & Majava, 2007), dont l'uranyle (Le Clainche & Vita, 2006 ; Pardoux et al., 2012 ; Brulfert, 2016). Elle est par conséquent un candidat d'intérêt pour l'étude des interactions uranyle/protéines, mais également pour le développement de biosenseurs d'uranyle.

3.1. Structure de la CaM

La CaM est constituée de 148 acides aminés, pour une masse de 16,8 kDa. Elle comporte 15 résidus Aspartate et 20 résidus Glutamate, ce qui représente environ 25 % de la séquence de la protéine, et une forte charge négative globale. La protéine est constituée de deux lobes distincts, communément appelés domaine N-terminal et domaine C-terminal, séparés par une portion de 28 résidus organisée en hélice alpha. Les domaines N-terminal et C-terminal sont relativement symétriques, constitués respectivement de 77 et 71 acides aminés, et présentent chacun deux sites de coordination de métal. Chaque domaine possède 2 motifs EF-Hand, respectivement EF-1 et EF-2 pour le domaine N-terminal, et EF-3 et EF-4 pour le domaine C-terminal. Ces motifs permettent la fixation d'ions Ca^{2+} par la CaM. Elle présente une structure relativement flexible, qui permet son changement de conformation et son interaction avec ses cibles biologiques (**Figure 13**) (Chou et al., 2001). La structure primaire de la protéine est fortement conservée chez de nombreuses espèces (Halling et al., 2016 ; Yang & Tsai, 2022).

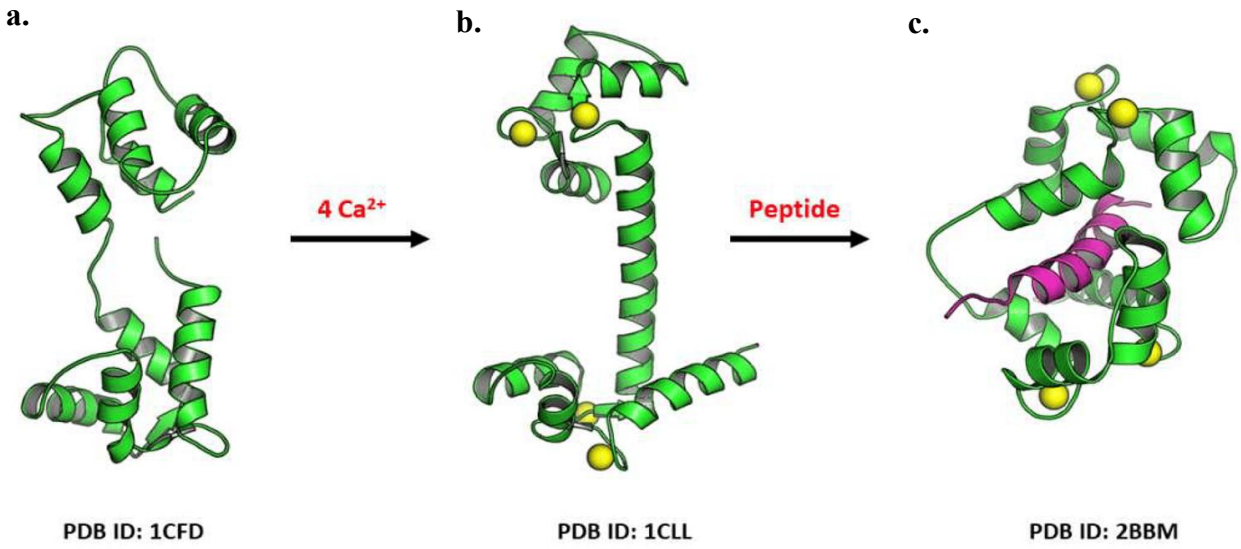


Figure 13 : *Structure de la calmoduline* ***a.*** *Relaxée en l'absence de ligand* ***b.*** *Ouverte lors de la fixation de 4 ions* Ca^{2+} *(en jaune)* ***c.*** *Repliée autour d'un peptide (en violet). Figure tirée de (Beghi et al., 2022)*

3.2. Les motifs EF-Hand

Le motif EF-Hand est le principal motif protéique impliqué dans la fixation du calcium chez les eucaryotes. En effet les protéines EF-Hand représentent la plus grande famille de protéines, avec plus de 551000 séquences répertoriées sur UniProtKB/Swiss-Prot. Un motif EF-Hand est généralement constitué de 29 acides aminés. Les positions 1-9 et 22-29 correspondent aux hélices E et F respectivement, et les positions 10-21 correspondent à la boucle de fixation. Cette boucle est constituée de 12 acides aminés, dont 6 sont impliqués dans la fixation du calcium (Kawasaki & Kretsinger, 2017 ; Lewit-Bentley & Réty, 2000).

Dans chaque domaine, les motifs EF-hand sont en interaction via un court feuillet bêta. Ils présentent une certaine similarité au sein de chaque domaine (EF-1 similaire à EF-3 et EF-2 similaire à EF-4). Les motifs EF-3 et EF-4 présentent une affinité pour le calcium supérieure à celle des motifs EF-1 et EF-2. Ce phénomène peut être expliqué par la flexibilité du domaine N-terminal supérieure à celle du domaine C-terminal (Linse et al., 1991 ; Tripathi & Portman, 2008).

Dans chaque site de la CaM, le métal est chélaté par deux Asp monodentés en position 1 et 3, un Asp ou une Asn en position 5 et par un Glu bidenté en position 12, le carbonyle de la chaîne principale en position 7, et une molécule d'eau stabilisée par un résidu Thr ou Ser. Parmi ces positions, les résidus 1, 3, 5 et 12 sont fortement conservés dans les différents sites, mais également chez différentes espèces, suggérant un rôle biologique important (**Figure 14**). Ces résidus sont également des ligands durs selon la théorie HSAB, et permettent par conséquent la fixation de métaux autres que le calcium (Ouyang & Vogel, 1998 ; C. A. Wang et al., 1982).

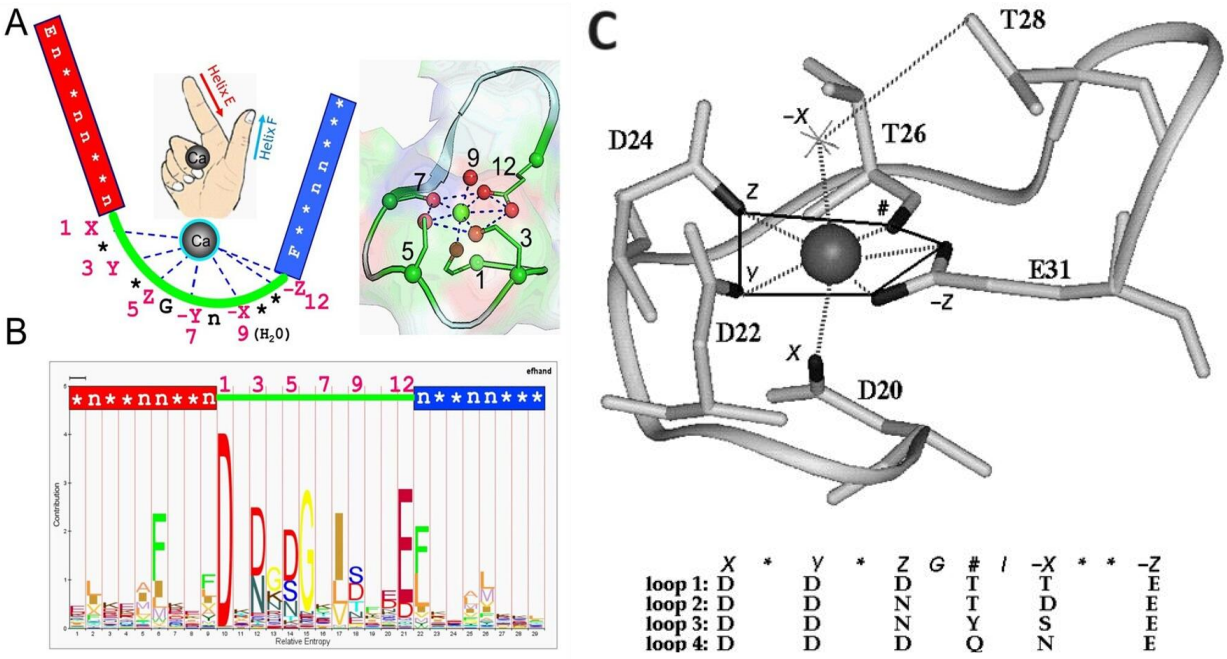


Figure 14 : *Motif EF-Hand de la calmoduline.* ***A.*** *A gauche : Illustration schématique du motif EF-Hand et de la fixation d'un ion Ca^{2+}. Les hélices E et F sont indiquées en rouge et bleu, la boucle de fixation du métal est indiquée en vert. A droite : Représentation tridimensionnelle d'un motif EF-Hand. Le métal est indiqué en vert et les atomes ligands sont indiqués en rouge.* ***B.*** *Conservation des acides aminés appartenant au motif EF-Hand. Sur la séquence, la taille des lettres est corrélée à la prévalence de l'acide aminé dans les séquences des motifs EF-Hand.* ***C.*** *Structure tridimensionnelle du site I de la calmoduline et des acides aminés ligands du métal pour chaque site. Figures tirées de Yubin Zhou et al., 2009 et Nelson & Chazin, 1998*

La fixation de métaux par les motifs EF-Hand de la CaM induit un effet allostérique, c'est-à-dire qu'elle influence la structure tertiaire et la fonctionnalité d'autres sous-unités de la protéine voire de la protéine entière (Kim et al., 2021). En effet, la structure de la protéine dite apo (sans métal) s'ouvre en présence de calcium suite au changement d'angle des hélices alpha constituant les motifs EF-Hand de la CaM (Ikura, 1996 ; Jurado et al., 1999 ; H. Y. Park et al., 2008). Ce changement de conformation est un élément clé dans l'interaction de la calmoduline avec ses cibles moléculaires. Dans le cas de protéines multisites, l'effet allostérique engendré par la fixation d'un ligand par un des sites peut avoir un effet positif ou négatif sur l'affinité des autres sites (Lai et al., 2015 ; Seo et al., 2014). Par ce phénomène, la protéine est en mesure de fournir une forte réponse à une faible variation de la concentration de son ligand. Chez la CaM, l'effet allostérique est positif puisque le changement de structure associé de la fixation d'un calcium dans un des sites EF-hand augmente l'affinité des autres sites pour le calcium.

3.3. Dynamique de fixation du calcium par la CaM et coopérativité des sites

Peu d'études portent sur l'affinité spécifique de chaque site ainsi que sur la coopérativité inter-sites au sein de l'un des deux domaines (Linse et al., 1991). Cela s'explique en partie par la difficulté de mesurer l'affinité spécifique de chaque site chez une protéine présentant 4 sites d'affinité différente, et coopératifs par paire (I/II et III/IV). Ainsi mon laboratoire, l'IPM (Interaction Protéines-Métal), a choisi d'étudier l'affinité spécifique pour le calcium des sites de fixation I et II du domaine N-terminal

de la CaM, appelé CaM WT I-II. L'étude d'un modèle minimaliste de la CaM simplifie les travaux envisagés, et le domaine N-terminal a été choisi pour sa plus faible affinité pour le calcium par comparaison au domaine C-terminal, facilitant le développement d'un peptide affin pour l'uranyle (Beccia et al., 2015). Afin de mesurer l'affinité pour le calcium de chacun des sites, des protéines dont un des sites ne fixe plus de métal (site inactivé) ont été mises au point. L'inactivation est obtenue en substituant deux Aspartate ligand du métal en position 1 et 3 en deux Ala. Les peptides aux sites II ou I inactivés sont nommés respectivement CaM Y I et CaM Y II (**Tableau 4**). Une tyrosine a été introduite en position 7 de la boucle pour suivre la fixation des cations métalliques par fluorescence. La fluorescence de la tyrosine, mesurée à 302 nm, diminue lors de la fixation de l'uranyle et augmente en réponse au Ca^{2+}. Elle peut être utilisée pour rendre compte de l'affinité des peptides pour les cations. Le titrage fluorimétrique et calorimétrique des peptides possédant un ou deux sites actifs a permis d'accéder aux constantes macroscopiques K de fixation d'un ou deux ions calcium, ainsi qu'aux constantes de dissociation (Kd) propres aux sites I et II (**Figure 15**).

Protéine	Site I	Site II
CaM WT I-II	DKDGDGCITTKE	DADGNGTIDFPE
CaM Y I-II	DKDGDGYITTKE	DADGNGTIDFPE
CaM Y I	DKDGDGYITTKE	AAAGNGTIDFPE
CaM Y II	AKAGDGYITTKE	DADGNGTIDFPE
CaM Y I Δ_{2-3}	DGDGYITTKE	AAAGNGTIDFPE
CaM1 I	DKDGDGYITAAE	AAAGNGTIDFPE
CaM1 II	AKAGDGYITAAE	DADGNGTIDFPE
CaM1 I-II	DKDGDGYITAAE	DADGNGTIDFPE
CaM1 I P	DKDGDGYITpAAE	AAAGNGTIDFPE
CaM1 Δ_{2-3}	DGDGYITAAE	AAAGNGTIDFPE
CaM1 Δ_{I}P	DGDGYITpAAE	AAAGNGTIDFPE
CaMΔ_{I-II}	DGDGYITTKE	DGNGTIDFPE

Tableau 4 : *Séquences peptidiques des sites I et II des variants du domaine N-terminal de la CaM d'A. thaliana conçus et utilisés par l'IPM*

Les constantes d'affinité des sites I et II ainsi obtenues pour le calcium sont respectivement Kd_1 = 38 µM et Kd_2 = 55 µM (**Tableau 5**). Les constantes macroscopiques de fixation du calcium par les peptides possédant 2 sites actifs montrent une forte augmentation de l'affinité de fixation du 2e ion calcium par rapport au premier, avec une constante de fixation du 2e ion calcium plus de 10 fois supérieure à celle de la fixation du 1er ion. Ces résultats indiquent une forte coopérativité positive pour la fixation du calcium entre les sites I et II (**Tableau 5**) du domaine N-terminal (Beccia et al., 2015).

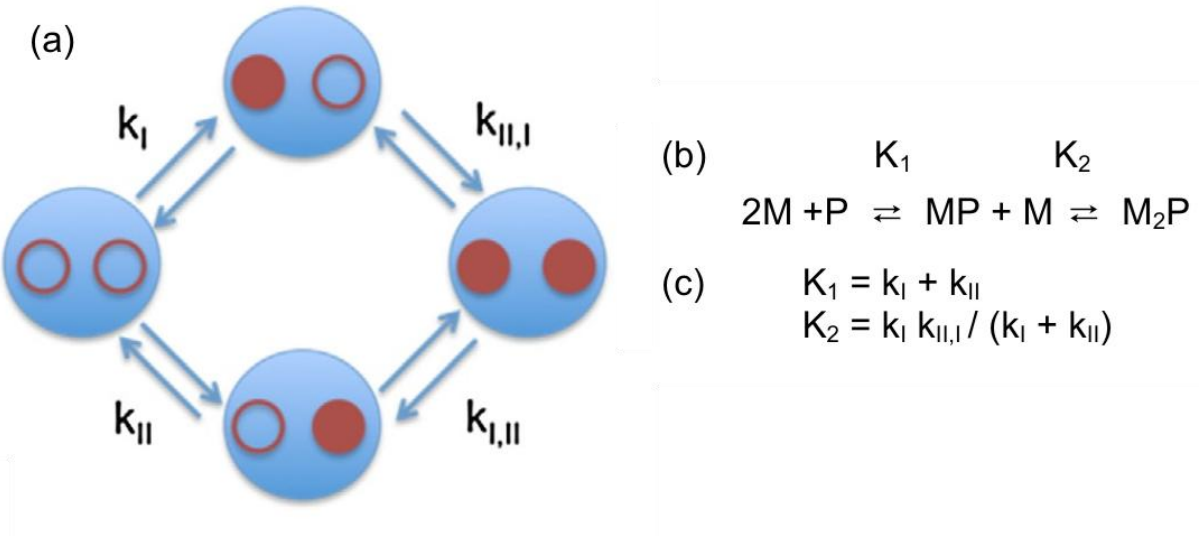


Figure 15 : a. *Diagramme schématique de la fixation d'ions Ca^{2+} dans le domaine N-terminal de CaM. Les cercles rouges pleins indiquent que le calcium est présent sur le site. Les constantes de liaison microscopiques sont indiquées pour chaque étape.* ***b.*** *Représentation macroscopique des réactions.* ***c.*** *Équations décrivant la relation entre les constantes de liaison macroscopiques, K_1 et K_2, et les constantes de liaison microscopiques k_I ; k_{II} ; $k_{I,II}$; $k_{II,I}$. (Figure tirée de Beccia et al. 2015)*

3.4. Interaction de la CaM avec l'uranyle

Chez la CaM, le calcium est coordiné dans le site de fixation I par 7 ligands : 6 apportés par la séquence de la protéine et une molécule d'eau stabilisée par une liaison hydrogène avec la chaine latérale du résidu thréonine en position 9. Cette structure semble favorable à l'interaction avec l'uranyle. En effet, Le Clainche et al. ont pu mesurer pour un peptide correspondant au site I de la CaM de *Paramecium tetraurealia* une affinité pour l'uranyle de l'ordre du micromolaire (Le Clainche & Vita, 2006).

Les constantes d'affinité du site I et du site II de la CaM Y I-II ont été également mesurées pour l'uranium (Beccia et al., 2022). Elles sont de 25 nM et 270 nM respectivement. Le site II est moins affin que le site I pour l'uranium. Ces constantes sont respectivement 1000 et 500 fois plus fortes que celles du calcium. Les constantes de fixation macroscopiques montrent que les sites I et II sont légèrement coopératifs pour la fixation de l'uranium (**Tableau 5**), à hauteur d'un facteur 2 contre un facteur 10 pour le calcium (Beccia et al., 2022).

	UO_2^{2+}		Ca^{2+}	
Protéine	**Kd_1 (nM)**	**Kd_2 (nM)**	**Kd_1 (µM)**	**Kd_2 (µM)**
CaM Y I	25 ± 1		38 ± 2	
CaM Y II	270 ± 42		55 ± 8	
CaM Y I-II	29 ± 6	135 ± 13	18 ±2	7,1 ± 1,8
CaM1 I	32 ± 1		23 ± 3	
CaM1 II	286 ± 47		45 ± 4	
CaM1 I P	48 ± 11		21 ± 1	
CaM1 I-II	33 ± 7	143 ± 24	16 ± 2	8,3 ± 1,7
CaM1 I-II P	2.8 ± 0.6	13 ± 2	14 ± 1	10 ± 4
CaM Y I Δ_{2-3}	0,67 ± 0,19			
CaM1 Δ_{2-3}	0,21 ± 0,1			
CaM1 Δ_IP	0,1 ± 0,03		16300 ± 6500	

Tableau 5 : *Constantes d'affinité pour l'uranyle et le calcium pour les variants issus de la CaM WT I-II à pH 6 (données tirées de Beccia et al., 2022 ; Pardoux et al., 2022)*

3.5. Phosphorylation du site I de la CaM

Les groupements phosphate sont en plus des groupements carboxylate des bases dures présentant une forte affinité pour l'uranyle. Plusieurs études ont montré une forte interaction entre l'uranyle et des composés phosphorylés (Alexandratos & Zhu, 2007 ; Koban & Bernhard, 2007 ; Laporte et al., 2019 ; Merroun et al., 2005 ; Qi et al., 2014). Ainsi, l'IPM a étudié l'influence de l'introduction d'un résidu phosphorylé dans la boucle de fixation sur l'affinité du site I pour l'uranyle. Cette modification a été réalisée en phosphorylant enzymatiquement la thréonine en position 9 de la boucle. La structure du site au niveau de la thréonine qui stabilise la molécule d'eau ligand du calcium suggère que la position du groupement phosphate est favorable à une interaction directe avec l'uranyle (Pardoux et al., 2012, 2014). La phosphorylation sélective du résidu Thr9 du site I a été réalisée par réaction enzymatique entre la CaM et l'enzyme CK2 (Casein Kinase II). Cette dernière est capable de phosphoryler le résidu thréonine ou sérine d'un site (S/T)xx(E/D), où x est un acide aminé quelconque. Ainsi, un site TAAE a été introduit par mutation des résidus T10 et K11 du site I. Le résidu Ala a été choisi pour sa petite taille et son absence de charge, qui réduisent l'impact de la mutation sur la fonctionnalité du site. Il permet également d'améliorer l'activité de l'enzyme CK2 et donc le taux de phosphorylation. Ce variant TAAE de la CaM nommé CaM1 I-II et son variant phosphorylé CaM1 I-II P (**Tableau 4**) ont été utilisés dans de nombreux travaux réalisés par l'IPM. La phosphorylation *in vitro* du résidu Thr30 a permis d'améliorer l'affinité pour l'uranyle d'un facteur 12 à pH 6 (Kd passant de 33 nM à 2,8 nM pour CaM1 I-II et CaM1 I-II P respectivement), et d'un

facteur 69 à pH 7 (Kd passant de 22 nM à 0,32 nM pour CaM1 I-II et CaM1 I-II P respectivement) (Beccia et al., 2022). Cette augmentation peut être expliquée par la déprotonation du groupement phosphate, partielle à pH 6 et totale à pH 7 (Sauge-Merle et al., 2017). L'affinité pour le calcium est aussi améliorée par la phosphorylation, mais dans des proportions bien moindres (**Tableau 5**). La phosphorylation du site I semble également avoir un effet sur la coopérativité inter-sites. Cet effet est particulièrement marqué dans le cas de la fixation d'uranyle, avec une constante macroscopique K_2 plus de 10 fois supérieure pour une protéine phosphorylée à pH 6, et plus de 100 fois plus grande à pH 7.

3.6. Optimisation des sites I et II pour l'uranyle

La structure linéaire de l'uranyle permet à ce dernier d'être chélaté par des ligands repartis uniquement dans le plan équatorial du cation. Cette chélation fait intervenir 4 à 6 ligands en addition des deux oxygènes, et la sphère de coordination à 5 ligands est plus stable en solution aqueuse (Vukovic et al., 2015).

La simulation en dynamique moléculaire de l'interaction de la CaM1 I et de son variant phosphorylé avec l'uranyle associée à des observations par FTIR et par TRLFS du complexe protéine-métal ont permis de montrer que parmi les 6 ligands protéiques du site I de la CaM1 I (Asp1, Asp3, Asp5, Glu12 bidenté, et Tyr9), seuls 5 sont impliqués dans la coordination de l'uranyle (Sauge-Merle et al., 2017). Chez la CaM1 I et la CaM1 I P respectivement, les résidus Asp1 et Asp3 ne sont pas impliqués dans l'interaction avec l'uranyle. Ces simulations ont également permis d'observer chez la CaM1 I P un éloignement entre le métal et les résidus Lys2 et Asp3.

Ces observations ont conduit à la création de variants issus des protéines CaM Y I-II, CaM1 I et CaM1 I P par délétion des résidus Lys2 et Asp3 du site I. Cette mutation résultante de la double délétion est appelée $\Delta_{2\text{-}3}$. Ces variants nommés respectivement CaM Y I$\Delta_{2\text{-}3}$, CaM1 $\Delta_{2\text{-}3}$ et CaM1 Δ_{I}P possèdent une boucle de fixation des cations de 10 acides aminés au lieu de 12. Les séquences peptidiques des sites I et II de ces variants sont indiquées en **Tableau 4**. L'analyse de ces peptides a permis d'observer l'implication dans la fixation du métal de 3 ligands : Asp1, Asp3 et Glu10 dont au moins 1 agissant comme ligand bidenté et pour un nombre de coordination total de 5 (Pardoux et al., 2022). Les peptides $\Delta_{2\text{-}3}$ présentent une constante de dissociation pour l'uranyle inférieure à 1 nM, nettement améliorée par comparaison avec leurs équivalents non délétés. Les mutants $\Delta_{2\text{-}3}$ présentent également une affinité particulièrement réduite pour le calcium, de l'ordre du millimolaire (**Tableau 5**).

3.7. Utilisation de la CaM comme senseur

3.7.1. Développement d'un biosenseur de calcium basé sur la CaM

La fixation de métal par la CaM entraîne un changement de conformation de la protéine, d'une structure ouverte vers une structure plus compacte. Ce changement de conformation augmente avec le nombre d'ions fixés, et est une propriété clé dans son interaction avec différentes protéines (H. Y. Park et al., 2008). Ce changement de conformation a motivé l'utilisation de la CaM pour le développement d'un biosenseur de calcium (Miyawaki et al., 1997). Ce biosenseur nommé caméléon

1 est codé génétiquement, ne requiert pas de cofacteur et peut être exprimé dans différentes localisations cellulaires. Ce biosenseur est constitué de la séquence de la CaM d'un *Xenopus* fusionnée à celle d'un peptide M13. Ce peptide correspond à la séquence d'interaction de la kinase de la chaîne légère du muscle squelettique avec la CaM, et sert à faciliter le repliement de la CaM (Bayley et al., 1996). Le complexe CaM/M13 est entouré de deux protéines fluorescentes de type GFP. La première protéine fluorescente eCFP (enhanced Cyan Fluorescent Protein) est située à l'extrémité N-terminale de CaM, et la seconde protéine fluorescente eYFP (enhanced Yellow Fluorescent Protein) à l'extrémité C-terminale du peptide M13. La protéine eCFP absorbe à 440 nm et émet à 476 nm, et eYFP absorbe à 476 nm et émet à 525 nm. La correspondance entre l'émission d'eCFP et l'absorption d'eYFP permet à ces protéines d'effectuer un transfert de fluorescence, appelé FRET.

3.7.2. Le FRET

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un transfert de fluorescence entre un donneur (ici eCFP) et un accepteur (ici eYFP). Le donneur est excité à sa longueur d'onde d'absorption A (ici 440 nm), et fluoresce à la longueur d'onde B (ici 476 nm) qui correspond à l'absorption du récepteur, qui capte la fluorescence du donneur pour réémettre la lumière à une longueur d'onde C (ici 525 nm) (**Figure 16** ; Shrestha et al., 2015). Cette interaction dépend de la distance entre les deux entités : à longue distance (> 10 nm), le FRET est minimal, et la fluorescence correspond majoritairement à la longueur d'onde B. A courte distance, le FRET est maximal et la fluorescence est majoritaire à la longueur d'onde C. La variation de FRET peut être mesurée par le calcul du ratio des émissions aux longueurs d'onde C/B (ici 525 nm/476 nm). L'interaction dépend également de l'orientation respective des deux molécules.

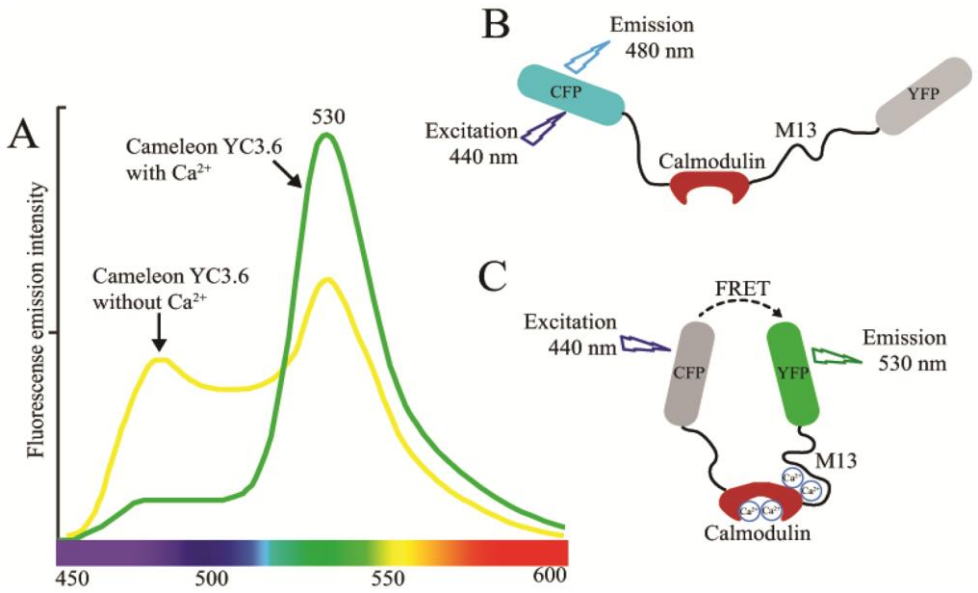


Figure 16 : *Principe de fonctionnement du biosenseur fluorescent de calcium développé par R.Y. Tsien.* ***A.*** *Profil de fluorescence de la protéine avec (en vert) et sans Ca^{2+} (en jaune). Le premier pic correspond à l'émission de fluorescence de eCFP, et le second à l'émission de eYFP. En présence de Ca^{2+}, l'intensité de fluorescence de eCFP diminue et celle de eYFP augmente.* ***B.*** *Structure de la protéine sans calcium.* ***C.*** *Structure de la protéine liée à 4 ions Ca^{2+}. Figure tirée de (Kanchiswamy et al., 2014)*

Le changement de conformation de la CaM en réponse à la fixation de Ca^{2+} est un élément clé du fonctionnement du biosenseur caméléon 1. En absence de calcium, le complexe CaM/M13 est relaxé et les deux protéines fluorescentes sont distantes. La fixation de calcium et le repliement du complexe entraînent un rapprochement des deux protéines fluorescentes et une augmentation du FRET. La variation de FRET est proportionnelle à la concentration en calcium dans l'environnement du biosenseur. Le biosenseur caméléon 1 a permis d'observer des flux de calcium chez des lignées de mutants de poisson zèbre *Danio rerio* (Higashijima et al., 2003) et de souris (Hasan et al., 2004) exprimant le biosenseur (**Figure 17**).

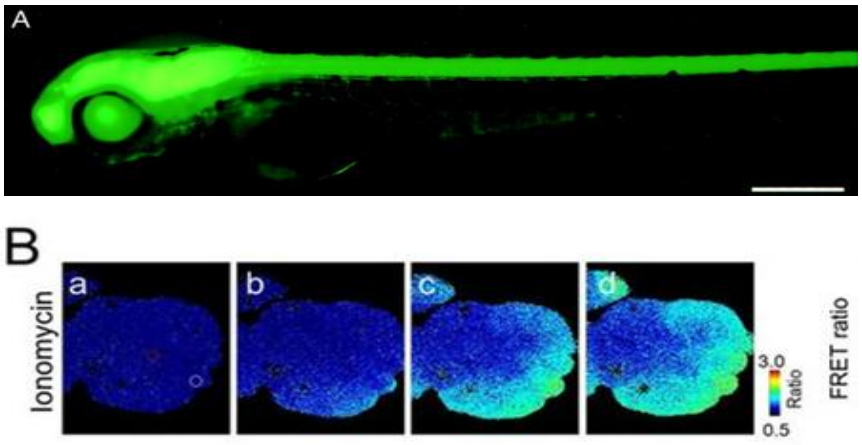


Figure 17 : ***A.*** *Observation des flux de calcium neuronaux chez une larve de D. rerio exprimant le biosenseur caméléon. Figure tirée de (Higashijima et al., 2003)* ***B.*** *Observation de flux de calcium dans des cellules pancréatiques par expression du biosenseur caméléon chez la souris. Figure tirée de (Jin et al., 2018)*

Le FRET est particulièrement intéressant en biologie car il permet l'observation d'évènements à l'échelle moléculaire, de manière non invasive, sensible, réversible et en temps réel (Imani et al., 2021 ; Verma et al., 2023). En milieu biologique, le FRET est souvent mis en place par l'interaction entre deux protéines fluorescentes (Hochreiter et al., 2015). On peut également noter l'utilisation d'étiquettes fluorescentes, cependant moins représentée en milieu biologique en raison des étapes de fonctionnalisation chimique qu'elle implique. L'utilisation de la fluorescence comme signal est également un avantage puisqu'elle permet l'observation de cellules et d'organismes vivants, de manière non destructive et peu coûteuse. La mesure est ratiométrique, c'est-à-dire que la concentration en analyte est déterminée par un ratio de fluorescence. Elle ne dépend pas de la concentration en biosenseur, contrairement aux systèmes de gène rapporteur où une intensité de fluorescence est mesurée, et qui dépendent donc de la quantité de la sonde qui fluoresce. Cette propriété est particulièrement intéressante pour l'utilisation du biosenseur en milieu biologique, où la quantité de protéine exprimée est difficile à contrôler et à mesurer.

3.7.3. Développement d'un biosenseur d'uranyle basé sur la CaM

Inspiré par les travaux de R.Y. Tsien, l'IPM a développé un biosenseur d'uranyle ayant pour élément structural central la CaM. Ce dernier, nommé biosensor 1, est constitué de la CaM entière d'*Arabidopsis thaliana* (4 sites) espacée par un linker de 5 acides aminés du peptide M13. Le complexe CaM/M13 est entouré par deux protéines fluorescentes eCFP et eYFP. Comme chez le biosenseur caméléon, eCFP et eYFP agissent respectivement comme donneur et accepteur de FRET.

Le Kd global du biosensor 1 est de 14,7 nM pour l'uranyle et de 2,4 µM pour le calcium (Sauge-Merle et al., 2023). Comme pour les peptides correspondant au domaine N-terminal de la CaM, le site II a été inactivé par la mutation de deux résidus Asp du motif EF-Hand en Ala. L'inactivation du site 2 du biosensor 1 a conduit à une variation de FRET quasi nulle en présence de calcium et d'uranyle, confirmant l'importance de la fonctionnalité de ce site dans le repliement de la CaM et donc dans la fonctionnalité du biosenseur. De la même manière que pour le peptide CaM1 $\Delta_{2\text{-}3}$,, le biosensor 1 a été modifié par la délétion des résidus 2 et 3 ($\Delta_{2\text{-}3}$) des 4 motifs EF-hand de la CaM, dans l'optique d'améliorer son affinité pour l'uranyle et diminuer celle pour le calcium. La délétion $\Delta_{2\text{-}3}$ a été introduite dans un nombre croissant de motifs EF-Hand, conduisant à l'obtention de variants Δ1, Δ13, Δ123, et Δ1234, délétés respectivement aux sites I ; I,III ; I,II,III ; I,II,III,IV (**Tableau 6**).

Protéine	Site I	Site II	Site III	Site IV
Biosensor 1	DKDGDGCITTKE	DADGNGTIDFPE	DKDQNGFISAAE	DVDGDGQINYEE
Δ1	DGDGCITTKE	DADGNGTIDFPE	DKDQNGFISAAE	DVDGDGQINYEE
Δ13	DGDGCITTKE	DADGNGTIDFPE	DQNGFISAAE	DVDGDGQINYEE
Δ123	DGDGCITTKE	DGNGTIDFPE	DQNGFISAAE	DVDGDGQINYEE
Δ1234	DGDGCITTKE	DGNGTIDFPE	DQNGFISAAE	DGDGQINYEE

Tableau 6 : *Séquences peptidiques des sites I, II, III et IV des protéines biosensor 1 et de ses variants Δ1, Δ13, Δ123 et Δ1234.*

L'analyse par fluorescence des variants $\Delta_{2\text{-}3}$ a permis d'observer une diminution progressive de gamme dynamique (rapport entre la plus basse et la plus haute concentration mesurable) du biosenseur en présence de calcium (**Figure 18**). Ces résultats montrent une contribution majeure des sites II, III et IV dans la variation de FRET, par opposition au site I qui semble moins important. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montre d'une part que le site II est crucial au changement de conformation de la CaM (Tripathi & Portman, 2008), et d'autre part que le domaine C-terminal (sites III et IV) est plus affin pour le calcium par comparaison au domaine N-terminal (sites I et II). Si la délétion $\Delta_{2\text{-}3}$ avait déjà été démontrée comme impactant négativement la fixation du calcium au niveau du site I (Pardoux et al., 2022), ces résultats montrent que la délétion crée le même effet chez les trois autres sites de la CaM. L'analyse de ces variants en présence d'uranyle a montré une diminution de la gamme dynamique pour chaque délétion supplémentaire, cependant moins drastique que pour le calcium (**Figure 19**). Si les délétions $\Delta_{2\text{-}3}$ empêchent la fixation du calcium, celle de l'uranyle reste tout de même possible. Ainsi les biosenseurs $\Delta_{2\text{-}3}$ présentent une affinité pour l'uranyle réduite par rapport au biosensor 1 mais sont nettement plus sélectifs pour l'uranyle par rapport au calcium (Sauge-Merle et al., 2023).

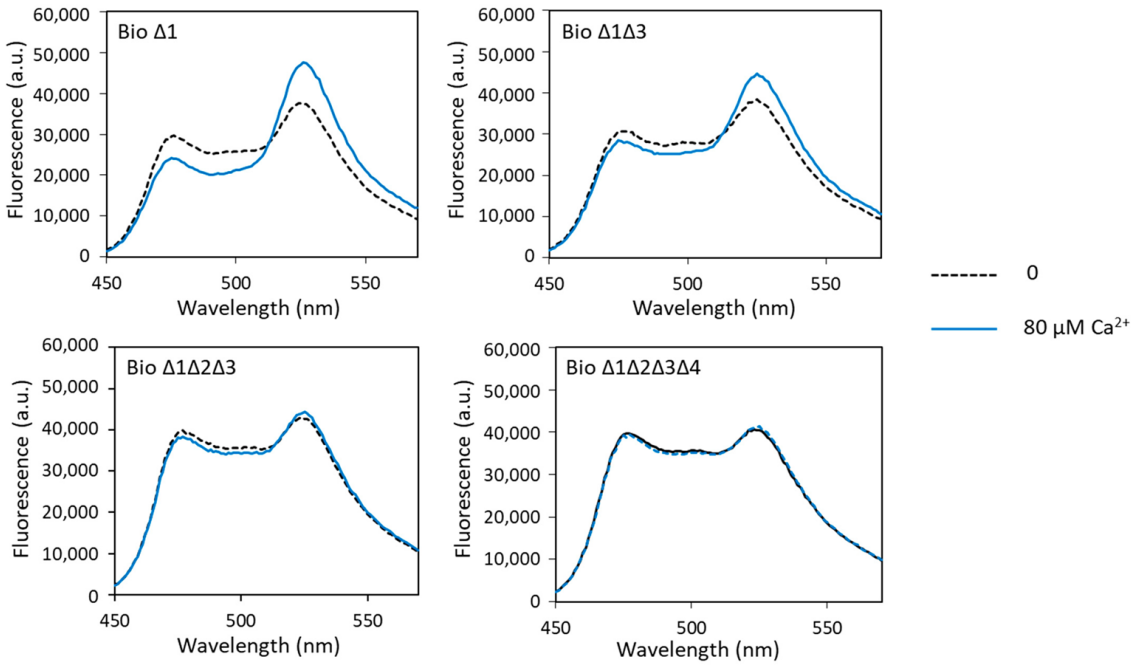


Figure 18 : *Profils de fluorescence des variants Δ1, Δ13, Δ123 et Δ1234 du biosensor 1 en absence et en présence de 80 µM de Ca^{2+}. Figure tirée de (Sauge-Merle et al., 2023)*

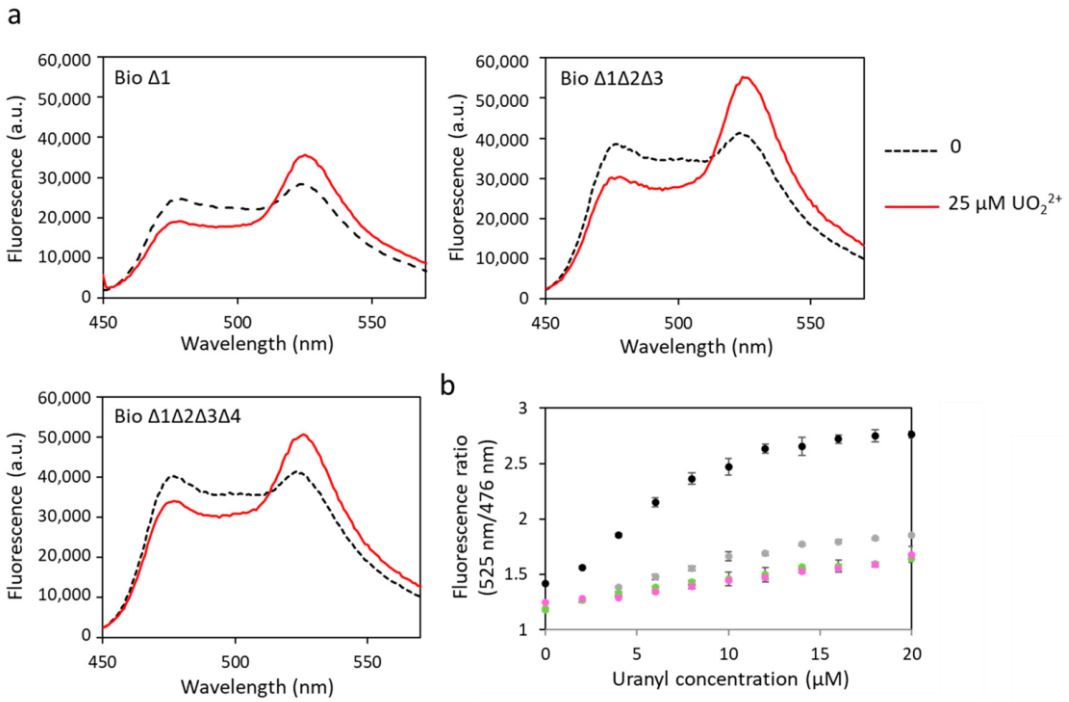


Figure 19 : a. *Profils de fluorescence des variants Δ1, Δ123 et Δ1234 du biosensor 1 en absence et en présence de 25 µM d'uranyle.* ***b.*** *Ratios de fluorescence à 525 nm / 476 nm de biosensor 1 (en noir), Δ1 (en gris), Δ123 (en vert) et Δ1234 (en rose). Figure tirée de (Sauge-Merle et al., 2023).*

En parallèle, la robustesse du biosenseur a été améliorée par substitution de la protéine fluorescente eYFP, sensible au pH et aux ions chlorures (Miyawaki et al., 1999 ; Wachter & James Remington, 1999) par un variant nommé citrine, qui diffère de la eYFP au niveau d'un acide aminé (mutation Q69M). Le biosenseur citrine ainsi obtenu présente un ratio de fluorescence similaire à son équivalent utilisant eYFP en présence d'uranyle. Il est insensible aux variations de pH et aux ions chlorures. Les délétions $\Delta_{2\text{-}3}$ présentées précédemment ont été introduites dans les 4 sites du biosenseur citrine, conduisant à une gamme dynamique presque 2 fois supérieure au biosenseur citrine. Ce biosenseur (Biosenseur citrine Δ1234) répond à de faibles concentrations d'uranyle, de l'ordre de 0,1 µM, soit une valeur inférieure aux limites fixées par l'OMS dans les eaux de boisson. De plus, ce biosenseur citrine Δ1234 possède une certaine sélectivité puisque qu'il répond à des concentrations d'uranyle de 4 à 25 µM en présence de 10 mM de compétiteurs ($MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl). Le biosenseur citrine Δ1234 a été testé dans l'eau du Mont Roucous (composition en **Tableau 7**), une eau naturelle présentant une composition minérale plus complexe et nettement plus riche que celle des milieux de laboratoire. La supplémentation de cette eau en uranyle a permis d'observer une variation de FRET similaire à celle obtenue en milieu de laboratoire, indiquant que la présence de nombreux ions compétiteurs tels que Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+} ou encore CO_3^{2-} à forte concentration ne perturbe pas le fonctionnement du biosenseur. Ces résultats présentent le biosenseur citrine Δ1234 comme un outil de choix pour la détection d'uranyle à des concentrations inférieures aux limites fixées par l'OMS et dans des milieux naturels ou complexes (Sauge-Merle et al., 2023). Bien que fonctionnels et sensibles, le biosensor 1 et son variant Δ1234 sont des protéines plus sensibles à des phénomènes de dégradation, et des améliorations du biosenseur se sont révélées nécessaires.

Éléments	Concentration (mM)
Calcium	0,06
Magnésium	0,02
Sodium	0,13
Bicarbonates	0,1
Sulfates	0,02
Nitrates	0,04

Tableau 7 : *Composition minérale de l'eau du Mont Roucous*

Les travaux réalisés sur la $CaM\Delta_{I\text{-}II}$ ont conduit au développement d'un nouveau biosenseur, nommé SF1 pour « Senseur Fonctionnel 1 ». Ce dernier est composé du domaine N-terminal de la CaM d'*A. thaliana* présentant une délétion $\Delta_{2\text{-}3}$ au niveau des sites I et II. Cette protéine est entourée des protéines fluorescentes eCFP et citrine (données non publiées). Tout comme son équivalent à 4 sites, le biosenseur SF1 est fonctionnel en milieu complexe et spécifique à l'uranyle en présence de fortes concentrations de compétiteur. Afin d'évaluer le fonctionnement *in vivo* du biosenseur SF1, ce dernier a été exprimé dans les racines de la plante modèle *A. thaliana*, constituant ainsi un biosenseur whole-cell d'uranyle. L'exposition de plantules en culture liquide à une concentration de 10 µM d'uranyle a permis d'observer une variation de FRET (données non publiées ; **Figure 20**). Ces résultats apportent la preuve de concept de la fonctionnalité du biosenseur SF1 pour une utilisation *in vivo.*

Le biosenseur SF1 constitue l'objet d'étude central des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

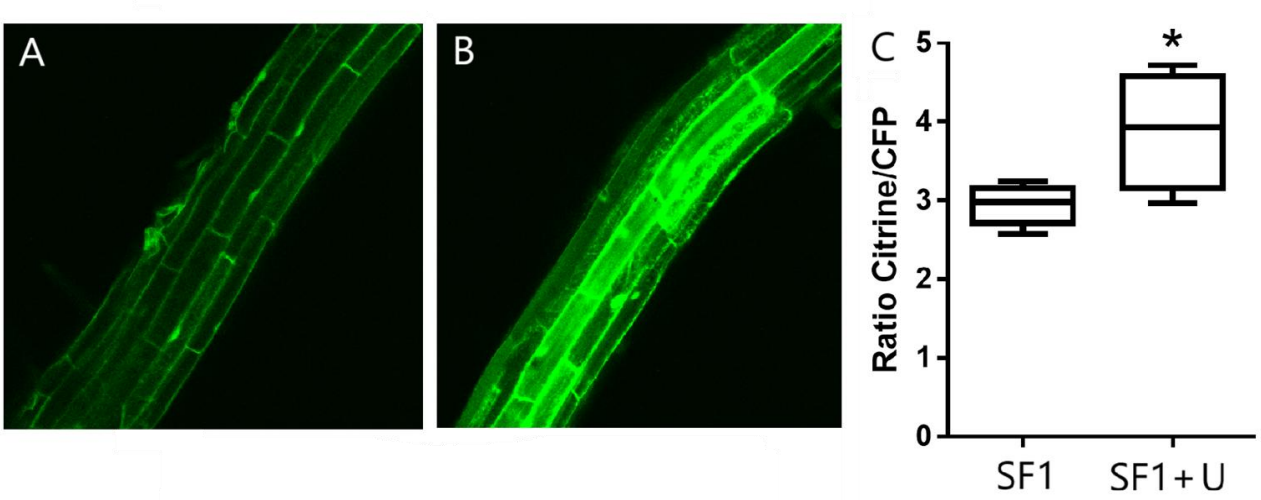


Figure 20 : *Observation par microscopie de racines d'A. thaliana exprimant le biosenseur SF1* ***A.*** *En absence d'uranyle* ***B.*** *En présence de 10 µM d'uranyle.* ***C.*** *Ratio de fluorescence Citrine/eCFP des racines en absence et présence d'uranyle.*

Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse est le développement d'un biosenseur fluorescent pour la détection d'uranyle en ligne dans des eaux environnementales. Ce projet s'inscrit dans un contexte d'assainissement et de démantèlement d'installations nucléaires. Cette thématique intéresse particulièrement la DAM, qui a rendu ce projet possible en finançant ma thèse.

Le biosenseur SF1 développé par l'IPM est au centre des travaux réalisés. De par sa nature protéique, il est codé génétiquement et peut facilement être exprimé *in vivo* pour le développement d'un biosenseur whole-cell au signal de transduction fluorescent et ratiométrique. De plus, les travaux réalisés par l'IPM offrent de nombreuses informations notamment quant à l'affinité de la protéine pour l'uranium dans différentes conditions.

Une partie des travaux réalisés au cours de cette thèse a ainsi porté sur l'expression du biosenseur SF1 au sein d'un être vivant. Nous avons choisi comme organisme d'étude le poisson zèbre *Danio rerio,* un poisson d'eau douce de la famille des cyprinidés naturellement retrouvé dans les eaux du Gange, dans la partie Est de l'Inde et au Népal (Spence et al., 2008). Il est couramment utilisé comme modèle en biologie et en toxicologie. Les œufs de *D. rerio* sont facilement transformables génétiquement, comme démontré par de nombreuses études. L'utilisation d'une technique d'édition génétique telle que CRISPR-Cas9 permet l'insertion à une position définie du génome, et ainsi une expression contrôlée en temps et en localisation de la séquence insérée. Le premier axe de ces travaux a donc porté sur l'édition génétique de larves de *D. rerio*, avec l'objectif de développer une lignée d'individus exprimant le biosenseur SF1. Cet objet d'étude constitue le chapitre I intitulé **« Expression d'un biosenseur d'uranyle chez le poisson zèbre »**.

En parallèle, nous avons cherché à améliorer l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle. Son site I a par le passé été modifié, et le variant $\Delta_{2\text{-}3}$ possède une forte affinité pour l'uranyle. Le site II natif quant à lui est moins affin pour le métal, et présente des possibilités d'optimisation. D'une part, nous avons travaillé au développement d'un protocole permettant le criblage à haut débit de mutants directement sur des cultures de bactéries exprimant le biosenseur SF1, dans le but de proposer un procédé rapide et efficace. Ces travaux constituent le chapitre II de cette thèse, intitulé **« Expression du biosenseur d'uranyle dans la membrane externe d'*E. coli* »**.

D'autre part, nous avons produit et criblé une banque de mutants du site II de la CaM, dans le but d'identifier un mutant plus affin pour l'uranyle par rapport à la protéine de départ. Ces travaux sont rassemblés en chapitre III **« Amélioration de l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle »**.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du développement d'un biosenseur whole-cell basé sur le biosenseur SF1 qui permettrait de proposer un outil de détection d'uranium biodisponible. Ce biosenseur pourrait participer à la surveillance environnementale, proposant des analyses rapides, sur le terrain et à moindre coût.

Matériels & Méthodes

1. Matériels

1.1. Milieux de culture

Le milieu LB (tryptone 10 g/L, extrait autolytique de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L ; Sigma-Aldrich) est utilisé pour les cultures d'*Escherichia coli* aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide (milieu LB-agar ; 15 g/L d'agar). Le milieu est stérilisé par autoclave (120°C, 20 min). Si nécessaire, le glucose est ajouté après autoclave du milieu.

Le milieu MJS est utilisé pour les cultures d'*E. coli* en milieu liquide, et plus précisément pour l'expression membranaire du biosenseur SF1. Sa composition est indiquée dans le **Tableau 8**. Le milieu est stérilisé par autoclave (120°C, 20 min). La thiamine est sensible à la température et doit être ajoutée après autoclave du milieu. Le pH du milieu est ajusté à 6 ou 7.

Composant	Masse pour 1 L de milieu	Molarité
HEPES	2,98 g	12,5 mM
NaCl	2,92 g	50 mM
NH_4Cl	1,07 g	20 mM
KCl	74,55 mg	1 mM
$MgCl_2$	95,21 mg	1 mM
$MnCl_2$	9,89 mg	0,05 mM
Glycérol	40 mL	0,55 M
Casamino acides	8 g	/

Tableau 8 : *Composition du milieu MJS*

Les antibiotiques sont ajoutés lorsque cela est nécessaire aux concentrations finales suivantes : ampicilline (100 µg/mL) ; kanamycine (50 µg/mL) ; tétracycline (10 µg/mL) ; chloramphénicol (25 µg/mL). Les compléments de culture lorsque nécessaires sont ajoutés aux concentrations suivantes : thiamine (50 mg/mL) ; glucose (40 mg/mL) ; sucrose (50 mg/mL).

1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes d'*E. coli* utilisées au cours de cette thèse sont d'une part les souches XL1 Blue et Stellar pour la production et la conservation des plasmides, et d'autre part les souches M15REP4 et BL21(DE3) pour la surexpression de protéines. Leurs génotypes sont présentés dans le **Tableau 9** :

Souche	Génotype	Antibiorésistance
XL1 Blue (Stratagene)	*end*A1 *gyr*A96(nalR) *thi*-1 *rec*A1 *rel*A1 *lac gln*V44 F'[::Tn10 *pro*AB+ *lac*Iq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)	Tétracycline
M15REP4 (Qiagen)	*Nal*S *str*S *rif*S *thi- lac- ara- gal*+ *mtl*-F- *rec*A+ *uvr*+ *lon*+ [pREP4 KanR]	Kanamycine
BL21 (DE3)	F–*omp*T *hsd*SB (rB–, mB–) *gal dcm* (DE3)	/
Stellar	F-, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *rel*A1, *gyr*A96, *pho*A, Φ80d *lac*ZΔ M15, Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), Δ*mcr*A, λ	/

Tableau 9 : *Génotype de souches d'E. coli utilisées*

2. Méthodes

2.1. Biologie moléculaire

2.1.1. Préparation d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN est réalisée au moyen du kit de miniprep NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) ou de maxiprep EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Des colonies d'*E. coli* contenant le plasmide d'intérêt et sélectionnées sur boîte de LB agar + antibiotiques sont mises en culture dans 5 mL de LB liquide pour une miniprep, ou 250 mL pour une maxiprep, et le tout est agité sur la nuit (37°C, 150 rpm). Les cellules sont collectées par centrifugation (4500 g ; 10 min ; 4°C), puis sont lysées en présence de RNAse et de détergents. L'ADN génomique est précipité et éliminé par centrifugation en même temps que les débris membranaires. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est fixé sur une colonne affine pour les oligonucléotides. Les contaminants (ARN, protéines, sels) sont éliminés par un lavage à l'éthanol. L'ADN plasmidique est ensuite élué dans l'eau milliQ stérile. L'ADN plasmidique est ensuite quantifié par spectrométrie UV-visible à 260 nm au moyen d'un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo-Fischer). L'ADN obtenu est stocké à -20 °C. Les plasmides utilisés dans le cadre des travaux de cette thèse sont rassemblés dans le **Tableau 10**.

Plasmide	Description	Résistance
pTwist	Plasmide commercial (Twist Biosciences) de clonage utilisé dans le cadre de l'édition génétique du poisson zèbre	Ampicilline
pQE-30	Plasmide d'expression utilisé pour la production de la calmoduline et du biosenseur SF1	Ampicilline
pET-28a	Plasmide d'expression utilisé pour la production du complexe SF1-ST	Kanamycine
pTF-16	Plasmide d'expression utilisé pour la production des complexes SC-AIDA-I, Lpp-OmpA-SC et PgsA-SC	Chloramphénicol

Tableau 10 : *Liste des plasmides utilisés durant la thèse*

2.1.2. Digestion d'ADN

Les digestions d'ADN par des enzymes de restriction sont utilisées en vue de clonages et pour le contrôle d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

100 ng d'ADN à digérer, 0,2 µL d'enzyme de restriction (10 U) et 1 µL de tampon 10x adapté à l'enzyme utilisée sont ajoutés à de l'eau milliQ pour un volume total de 10 µL (adapter les volumes de tampon si le volume total excède 10 µL). Le tout est incubé à 37°C pendant 1 h pour des quantités d'ADN inférieures à 200 ng et jusqu'à une nuit pour des quantités supérieures à 2 µg. L'avancement de la digestion est contrôlé périodiquement par prélèvement de 1 µL de la réaction et migration sur gel d'agarose. Une fois la réaction terminée, l'enzyme est inactivée thermiquement pendant 20 minutes à la température d'inactivation de l'enzyme utilisée.

Dans le cas de digestion d'un même ADN par deux enzymes de restriction différentes, les deux enzymes peuvent être mises en réaction simultanément s'il existe un tampon de digestion efficace et compatible aux deux enzymes, et le protocole est le même qu'indiqué précédemment. Certaines manipulations n'ont pas permis cette approche en raison d'une compétition entre les enzymes rendant l'une d'elles moins efficace. Dans ce cas, les digestions sont réalisées de manière successive. Pour ce faire, l'enzyme la moins efficace est mise en réaction la première jusqu'à vérification d'une digestion totale, puis est inactivée thermiquement. L'enzyme la plus efficace est ensuite ajoutée au même mélange réactionnel sans purification au préalable, et le tout est incubé jusqu'à digestion totale.

Si l'ADN digéré est constitué d'une seule bande, ce dernier peut être purifié par le kit Gel & PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Le produit purifié est contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans le cas de la libération d'un insert, au moins 2 fragments d'ADN sont obtenus. Afin d'obtenir uniquement le fragment d'intérêt, le mélange réactionnel est séparé par migration sur gel d'agarose. La bande d'intérêt est sélectionnée puis découpée, et l'ADN correspondant est purifié par le kit Gel & PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). L'ADN purifié est dosé par fluorescence à 260 nm au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo-Fischer Nanodrop 2000), et peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

Dans le cas de digestions en amont de manipulations de ligation, les extrémités du vecteur peuvent être déphosphorylées afin d'éviter une recircularisation du vecteur sans insert. La digestion est réalisée comme présenté. Une fois la réaction terminée, 1 µL de phosphatase alcaline (20 U/µL ; Roche) est ajouté au mélange de digestion. Le tout est incubé à 37°C pendant 1 h, puis l'enzyme est inactivée par incubation à 75°C pendant 10 minutes.

2.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

La taille des ADN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose dont le pourcentage varie de 0,7 à 4 % selon la taille en kb de l'échantillon dans du tampon TAE 0,75x (Tris-HCl 20 mM ; pH 8,3 ; acétate de sodium 10 mM ; EDTA 0,5 mM) et contenant 0,001 % de bromure d'éthidium (BET). Un volume de tampon de charge NEB purple loading dye 6X (Ficoll®-400 2,5 % ; EDTA 10 mM ; Tris-HCl 3,3 mM ; SDS 0,08 % ; Dye 1 0,02 % ; Dye 2 $8x10^{-4}$ % ; pH 8) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN. Le tout est déposé sur le gel d'agarose, aux côtés d'un marqueur de taille (NEB 1 kb+ : 250-10000 bp ou NEB 10 bp : 10-650 bp selon la manipulation). La migration est effectuée dans du tampon TAE 0,75x sous une tension de 135 V (durée variable entre 20 et 45 minutes selon la taille à observer). Le complexe ADN-BET est révélé par fluorescence sous lumière UV. La comparaison de la position des bandes obtenues avec celles des marqueurs de taille permet de déterminer la taille de l'ADN étudié.

2.1.4. Amplification d'ADN par PCR

2.1.4.1. Conditions standards

La PCR (polymerase chain reaction) a été utilisée dans le cadre de ces travaux pour la production et la mutagenèse de séquences d'ADN, ainsi que pour des clonages.

Les conditions de PCR sont les suivantes : 50 ng de matrice, 10 µM d'amorces et 10 µL de Phusion flash mix (Phusion flash High Fidelity PCR Master Mix 2x ; Thermo-Fischer) sont ajoutés à de l'eau milliQ, pour un volume total de 20 µL. Le mélange est introduit dans un thermocycleur (BIO-RAD C1000 dual gradient 96 well PCR block). La température d'hybridation est déterminée par l'utilisation d'outils adaptés et par la formule $Tm = 64.9 + 41 \times (yG+zC-16.4)/(wA+xT+yG+zC)$ et $Ta = Tm - 5°C$. wA, xT, yG et zC sont les proportions relatives des différents nucléotides A, T, C et G dans la séquence de l'amorce. L'amplicon est purifié au moyen du kit Gel & PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Dans les cas où la réaction génère plusieurs amplicons, le produit de PCR est d'abord séparé par électrophorèse sur gel d'agarose (Cf. **Section 2.1.3**.), puis la bande d'intérêt est découpée et l'ADN est extrait au moyen du même kit.

Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	1 min	1
Dénaturation	95	30 s	25
Hybridation	Ta	30 s	
Élongation	72	15-30 s / kb	
Élongation finale	72	5 min	1

Tableau 11 : *Programme de PCR standard (Ta : température d'hybridation)*

Amorce	Séquence (5' → 3')
S-AddMetPro-atp1b1b	CGTGGAGGAAAATCCCGGCCCAATGCCCGCTCAAAATAAAGACGACGGAGG
AS-AddMetPro-atp1b1b	CCTCCGTCGTCTTTATTTTGAGCGGGCATTGGGCCGGGATTTTCCTCCACG
S-SupPro-eCFP	CAAAACCTTACAGTACACCATGGTGAGCAAGGGAGAGGAGC
AS-SupPro-eCFP	GCTCCTCTCCCTTGCTCACCATGGTGTACTGTAAGGTTTTG
CaMMUT For GNSNAK	ACGAAGTGGAT**GNSNAK**GGTACCATTGAT
CaMMUT Rev GNSNAK	ATCAATGGTACC**MTNSNC**ATCCACTTCGT
As-pET-SalI	TCTCGTCGACTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGC
pQE-FP	CGGATAACAATTTCACACAG
pET-TEV	CTCCGTCGACAAGCTGAGAACCTGTACTTCCAGTCC
Citrine-ST	GACGAGCTGTACAAGGGCGGTGGCGGTAGC
ST-Citrine	GCTACCGCCACCGCCCTTGTACAGCTCGTCCAT
PET-ST	GTGCGGCCGCAAGCTTTATTTGGTCGGTTTATACGCATCCA
S-Hind3-L5	GAGAAAGCTTGGCGGTGG
Xho-Stop-ST	GAGACTCGAGTTATTTGGTCGG
M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC
Seq-SupPro	TTGGAGAGAGCCGGGTACG
Seq-AddMetPro	TACAGAGGCTGAGCTGCAGG

Tableau 12 : *Liste des amorces utilisées dans le cadre de la thèse*

2.1.4.2. Amplification d'ADN par PCR « 2-step »

L'amplification d'ADN par PCR dite « 2-step » est utilisée pour des manipulations impliquant des amorces au Ta supérieur à 72°C. Le mélange de PCR est préparé comme présenté en **Section 2.1.4.1**., à l'exception de l'amplification du fragment ST (SpyTag) qui utilise 20 ng de matrice.

Le programme de PCR appliqué est : 95°C 1 min, (95°C 15 s, Ta 30-45 s/kb) x 25 cycles, 72°C 5 min. La matrice est éliminée par digestion du produit de PCR par *Dpn*I (1 µL, 4 h). L'amplicon est contrôlé sur gel d'agarose. Il est ensuite purifié sur kit de purification d'ADN sur gel. L'ADN purifié peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	1 min	1
Dénaturation	95	30 s	25
Hybridation/Élongation	Ta	30-45 s / kb	
Élongation finale	72	5 min	1

Tableau 13 : *Programme de PCR « 2-step »*

2.1.4.3. Mutagenèse dirigée

La mutagénèse dirigée est utilisée pour la modification de l'ADN donneur SF1 utilisé pour l'édition du génome du poisson zèbre. Cette manipulation consiste en une amplification d'ADN par PCR au moyen d'amorces contenant la mutation souhaitée. Le mélange de PCR et l'amplification sont réalisés comme présenté en **Section 2.1.4.1**. Les amorces utilisées sont S-AddMetPro-atp1b1b et AS-AddMetPro-atp1b1b pour l'addition des résidus méthionine et proline, et S-SupPro-eCFP et AS-SupPro-eCFP pour la suppression du résidu proline.

Le programme de PCR appliqué est : 95°C 1 min, (95°C 15 s ; Ta - 5°C 30 s ; 72°C 30 s/kb) x 25 cycles, 72°C 5 min. La température d'hybridation est abaissée en conséquence du mésappariement provoqué par la mutation présente dans l'amorce. La matrice est éliminée par digestion du produit de PCR par *Dpn*I (1 µL, 4 h). L'amplicon est contrôlé sur gel d'agarose. Il est ensuite purifié sur kit de purification d'ADN sur gel. L'ADN purifié peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

2.1.4.4. Mutagenèse semi-dirigée

La mutagenèse semi-dirigée est utilisée pour la création d'une banque de mutants de la CaM. Cette manipulation consiste en une amplification d'ADN par PCR au moyen d'amorces dites « dégénérées », à savoir un mélange d'amorces présentant les mutations souhaitées. Les amorces dégénérées sont fournies par Eurofins Genomics. La portion dégénérée du primer a été conçue en suivant les codes universels de variation des nucléotides (**Tableau 14**). Ces codes permettent d'indiquer au fournisseur d'amorces commerciales la variabilité souhaitée aux différentes positions des séquences d'ADN à fournir. L'amplification permet d'obtenir en une réaction un mélange d'amplicons présentant à la position souhaitée une variété de mutations correspondant à la diversité

du mélange d'amorces. Le mélange de PCR et l'amplification sont réalisés comme présenté en **Section 2.1.4.1.** Les amorces utilisées pour l'amplification sont MUTForGNSNAK et AS-pET-*Sal*I (**Tableau 12**).

Le programme de PCR appliqué est : 95°C 1 min, (95°C 15 s ; Ta - 10°C 30 s ; 72°C 30 s/kb) x 25 cycles, 72°C 1 min. La température d'hybridation est abaissée en conséquence du mésappariement provoqué par la mutation présente dans l'amorce. La matrice est éliminée par digestion du produit de PCR par *Dpn*I (1 µL, 4 h). L'amplicon est contrôlé sur gel d'agarose. Il est ensuite purifié sur kit de purification d'ADN sur gel. L'ADN purifié peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

Code	Bases possibles
M	AC
R	AG
W	AT
S	CG
Y	CT
K	GT
V	ACG
H	ACT
D	AGT
B	CGT
N	ACGT

Tableau 14 : *Tableau de correspondance universelle des codons dégénérés défini par l'International Union of Biochemistry.*

2.1.5. Clonage

2.1.5.1 Clonage par ligation

Les manipulations de ligation sont réalisées avec environ 100 ng d'ADN. 3 à 10 moles d'insert sont utilisées par mole de vecteur. L'insert et le vecteur sont ajoutés à 0,5 µL de ligase T4 (NEB) et 1 µL de T4 ligase reaction buffer 10x (NEB), et le tout est ajouté à de l'eau milliQ stérile pour un volume total de 10µL. Le tout est incubé à 37°C pendant 4 h ou à 4°C sur la nuit. Une fois la réaction terminée, la ligase T4 est inactivée à 65°C pendant 10 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé sur membrane 0,025 µm (Merck-Millipore) afin d'éliminer les sels contenus dans le tampon de ligase en vue de transformer des cellules électrocompétentes. Le produit de ligation peut être stocké à -20°C.

2.1.5.2. Clonage par PCR

L'ADN SF1-ST utilisé pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli* est obtenu par assemblage des fragments SF1 et ST par une réaction de clonage par PCR. Cette technique consiste en l'amplification des fragments à cloner par des amorces permettant d'ajouter des brins d'homologie à leurs extrémités, puis par l'amplification simultanée de ces derniers.

50 ng du fragment SF1, 10 ng de fragment ST et 10 µM des amorces pET-TEV et pET-ST et 10 µL de Phusion flash mix sont ajoutés à de l'eau milliQ pour un volume total de 20 µL. L'amplification est réalisée par PCR 2-step (Cf. 2.1.4.2.) avec Ta = 75°C. Le mélange réactionnel est séparé par migration sur gel d'agarose à 0,7 %. La bande correspondant au fragment SF1-ST est découpée sur gel, puis purifiée par kit de purification d'ADN sur gel. L'ADN purifié peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

2.1.5.3. Clonage par In-Fusion

La technique In-Fusion permet le clonage d'un insert dans un vecteur linéaire sans l'utilisation de sites de restriction. L'insert doit au préalable être amplifié par PCR avec des amorces permettant l'ajout de brins homologues aux extrémités du vecteur digéré. La conception des amorces ainsi que le calcul des quantités de réactifs peuvent être réalisés par l'utilisation d'outils dédiés (Takara bio infusion primer design tool / infusion molar ratio calculator). La technique In-Fusion est utilisée notamment pour le clonage du fragment SF1-ST dans le vecteur pET-28a.

Pour ce faire, 50 ng de vecteur pET-28a linéarisé et 100 ng d'insert SF1-ST sont ajoutés à 2 µL de buffer Infusion 5x (qsp H_2O 10 µL). Le tout est incubé à 50°C pendant 15 minutes précisément. Le produit de réaction est contrôlé sur gel d'agarose 0,7 % et peut être utilisé directement ou stocké à -20°C. Le produit de clonage peut être utilisé pour transformer des cellules chimiocompétentes commerciales adaptées Stellar comme présenté en **Section 2.1.6.4**.

2.1.6. Transformations de cellules d'*E. coli*

2.1.6.1. Préparation de cellules électrocompétentes

200 ml de milieu LB avec ou sans antibiotique sont ensemencés à 2 % à partir d'une préculture d'*E. coli* XL1 Blue, BL21 (DE3) ou M15REP4. Les cellules sont placées sous agitation (37°C, 150 rpm) jusqu'en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} = 0,5). 20 mL de glycérol sont ajoutés et la culture est agitée doucement sur glace pendant 4h. A partir de cette étape, les manipulations sont réalisées en conditions stériles. Les cellules sont centrifugées (4500 g ; 10 min ; 4°C) puis le culot bactérien est resuspendu dans 100 ml de glycérol 10 % froid et stérile. Les cellules sont centrifugées (4500 g ; 10 min ; 4°C) puis le culot est repris dans 500 µl de glycérol à 10 % froid. Les cellules sont aliquotées par 50 µL et congelées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C.

2.1.6.2. Préparation de cellules chimiocompétentes

Toutes les étapes se déroulent en condition stérile. 200 ml de milieu LB avec ou sans antibiotique sont ensemencés à 2 % à partir d'une préculture d'*E. coli* XL1 Blue, BL21 (DE3) ou M15REP4. Les cellules sont placées sous agitation (37°C, 150 rpm) jusqu'en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} = 0,5). Les cultures sont centrifugées (4500 g ; 10 min ; 4°C) et le culot bactérien est resuspendu dans 100 mL de $CaCl_2$ 100 mM stérile et froid. Le tout est agité sur glace pendant 1h. Les cellules sont centrifugées (4500 g ; 10 min ; 4°C) et le culot est resuspendu dans 500 µL d'un mélange ($CaCl_2$ 100 mM 85 % / glycérol 15 %). Les cellules sont aliquotées par 50 µL et congelées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C (A. Chang et al., 2017).

2.1.6.3. Transformation de cellules électrocompétentes

50 µL de cellules compétentes sont mises en contact avec l'ADN à transformer (ADN plasmidique 5-50 ng ; mix de ligation 2,5-5 µL ; mix d'infusion 2,5 µL). Le tout est ensuite déposé dans une cuve d'électroporation (Bio-Rad). La cuve contenant les bactéries et l'ADN est placée dans un électroporateur (Electroporator 2510, Eppendorf), et un champ électrique (2500 V ; 5 ms) est appliqué. Les cellules sont collectées et incubées dans 200 µL de milieu SOC (2 % tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose) pendant 1 h sous agitation (37°C, 150 rpm). Les cellules sont ensuite étalées sur milieu LB-agar + antibiotiques. Le tout est incubé dans une étuve à 37°C sur la nuit, et les colonies formées le lendemain contiennent le plasmide d'intérêt.

2.1.6.4. Transformation de cellules chimiocompétentes

50 µL de cellules compétentes sont mises en contact avec l'ADN à transformer (ADN plasmidique 5-50 ng ; mix de ligation 2,5-5 µL ; mix d'infusion 2,5 µL) pendant 30 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite incubées au bain-marie à 42°C pendant 45 s, puis sur glace pendant 2 minutes. Les cellules sont collectées et incubées dans 200 µL de milieu SOC (tryptone 2 %, d'extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucose 20 mM) pendant 1 h sous agitation (37°C, 150 rpm). Les cellules sont ensuite étalées sur milieu LB-agar + antibiotiques. Le tout est incubé dans une étuve à 37°C sur la nuit, et les colonies formées le lendemain contiennent le plasmide d'intérêt.

2.2. Biochimie

2.2.1. Liste des protéines

Le **Tableau 15** présenté ci-dessous rassemble les différentes protéines et peptides utilisés dans le cadre de cette thèse. Les séquences et leurs utilisations sont également décrites.

Protéine	Séquence	Utilisation
CaMΔ$_{I-II}$	MADQLTDDQISEFKEAFSLF**DGDGYITTKE**LGTV MRSLGQNPTEAELQDMINEV**DGNGTIDFPE**FLNL MARK	Peptide chélateur d'uranyle
Biosenseur SF1 (les sites de fixation de métal sont indiqués en rouge)	SMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHRFSVSGE GEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWG VQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKAHFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS ALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAELPMADQLTDD QISEFKEAFSLF**DGDGCITTKE**LGTVMRSLGQNPT EAELQDMINEV**DGNGTIDFPE**FLNLMARKPVDM VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEG DATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMC FARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDG NYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH KLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSAL SKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK	Biosenseur fluorescent d'uranyle
AIDA-I	LNPTKESAGNTLTVSNYTGTPGSVISLGGVLEGDN SLTDRLVVKGNTSGQSDIVYVNEDGSGGQTRDGI NIISVEGNSDAEFSLKNRVVAGAYDYTLQKGNESG TDNKGWYLTSHLPTSDTRQYRPENGSYATNMALA NSLFLMDLNERKQFRAMSDNTQPESASVWMKITG GISSGKLNDGQNKTTTNQFINQLGGDIYKFHAEQL GDFTLGIMGGYANAKGKTINYTSNKAARNTLDGY SVGVYGTWYQNGENATGLFAETWMQYNWFNAS VKGDGLEEEKYNLNGLTASAGGGYNLNVHTWTS PEGITGEFWLQPHLQAVWMGVTPDTHQEDNGTV VQGAGKNNIQTKAGIRASWKVKSTLDKDTGRRFR PYIEANWIHNTHEFGVKMSDDSQLLSGSRNQGE	Protéine membranaire utilisée comme carrier pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*.
Lpp-OmpA (le fragment Lpp est indiqué en gras, le fragment OmpA est indiqué en italique)	**KATKLVLGAVILGSTLLAGCSSNAKIDQ***GINPYV GFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLG YPITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGKNHDTGVS PVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPD NGV*	Protéine membranaire utilisée comme carrier pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*.
PgsA	KKELSFHEKLLKLTKQQKKKTNKHVFIAIPIVFVL MFAFMWAGKAETPKVKTYSDDVLSASFVGDIMM GRYVEKVTEQKGADSIFQYVEPIFRASDYVAGNFE NPVTYQKNYKQADKEIHLQTNKESVKVLKDMNF TVLNSANNHAMDYGVQGMKDTLGEFAKQNLDIV GAGYSLSDAKKKISYQKVNGVTIATLGFTDVSGK GFAAKKNTPGVLPADPEIFIPMISEAKKHADIVVVQ SHWGQEYDNDPNDRQRQLARAMSDAGADIIVGH HPHVLEPIEVYNGTVIFYSLGNFVFDQGWTRTRDS ALVQYHLKKNGTGRFEVTPIDIHEATPAPVKKDSL KQKTIIRELTKDSNFAWKVEDGKLTFDIDHSDKLK SK	Protéine membranaire utilisée comme carrier pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*.
SpyCatcher (SC)	VDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDED GKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYP GKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNG KATKGDAHI	Fragment protéique complémentaire à ST utilisé pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*.
SpyTag (ST)	AHIVMVDAYKPTK	Fragment protéique complémentaire à SC utilisé pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane

		externe d'*E. coli*.
Etiquette Histidine (His-Tag)	HHHHHH	Étiquette protéique affine au nickel utilisée dans la purification de protéines d'intérêt

Tableau 15 : *Liste des protéines et peptides utilisés dans le cadre de la thèse.*

2.2.2. Production de protéines recombinantes

500 mL de milieu LB + antibiotiques sont ensemencés à 1-4 % à partir d'une préculture d'*E. coli* M15REP4 contenant le plasmide codant la protéine à produire. Le tout est placé sous agitation (37°C, 150 rpm) jusqu'à DO_{600nm} = 0,5. 100 µM d'IPTG sont ajoutés et les cellules sont maintenues sous agitation (37°C, 150 rpm, 4 h pour la CaM et ses variants, 17°C sur la nuit pour le biosenseur SF1). Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation (4500 g ; 10 min ; 4°C). Le culot bactérien est resuspendu dans du tampon de lyse (Tris 50 mM ; NaCl 300 mM ; EDTA 1 mM ; triton 0,1 % pH 8) à hauteur de 30 mL par litre de culture. Du lysozyme (50 mg/mL) et un inhibiteur de protéases (1 tablette de cOmplete antiprotéase (Roche) pour 100 mL de tampon de lyse) sont ajoutés. Le tout est congelé à -80°C pendant au moins 2 h. Après décongélation pendant 30 min à 25°C, 400 µL de DNAse I (1 mg/mL) et 800 µL de $MgSO_4$ 1 M sont ajoutés. Le tout est placé sous agitation lente à 4°C pendant 4 h ou jusqu'à disparition de la texture visqueuse pour le biosenseur SF1, ou 30 min à température ambiante pour la CaM et ses mutants. Les cellules sont ensuite cassées par sonication (20 kHz ; 30 s on, 30 s off) ou en utilisant un broyeur cellulaire de type One Shot (2 bars), et le mélange est centrifugé (22000 g ; 30 min ; 4°C). Les protéines solubles d'intérêt se retrouvent dans le surnageant, et les débris cellulaires et les corps d'inclusion sont dans le culot.

Le même protocole est appliqué pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*, avec pour différence l'utilisation du milieu de culture MJS pour la production des protéines et l'induction est effectuée avec 100 µM d'IPTG et 0,1 à 1,5 mM d'arabinose. Le tout est agité sur la nuit (150 rpm ; 25°C ou 30°C).

2.2.3. Purification de protéines sur colonne

Les protéines sont purifiées au moyen d'un système de purification FPLC Cytiva. L'entièreté de l'équipement utilisé pour la purification est thermostaté à 17°C.

Une colonne d'affinité HisTrap (Cytiva) chargée en nickel est équilibrée en tampon A (Tris 50 mM ; NaCl 300 mM ; pH 7,5). Le surnageant contenant la protéine d'intérêt obtenu à l'étape précédente est chargé sur la colonne à 5 mL/min. La protéine d'intérêt possédant une étiquette Histidine (His-Tag) est retenue sur la colonne, et la plupart des contaminants sont éliminés. La protéine d'intérêt est collectée par élution avec le tampon A supplémenté en imidazole 250 mM. L'imidazole agit ici comme un compétiteur de l'étiquette His-Tag pour l'interaction avec le nickel. La concentration en protéine dans les fractions collectées est estimée en mesurant l'absorbance à 280 nm (Abs 0.1% (=1 g/l) = 0,288 pour la CaM et 0,774 pour SF1 ; Cf. **Section 2.2.7.1**.). A ce stade de la purification, la protéine possède encore son étiquette His-Tag. Cette dernière est située en position N-terminale de la protéine, et séparée de cette dernière par un séquence peptidique susceptible d'être coupée par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus ; coupe les protéines au niveau d'un site spécifique ENLYFQS). La protéine est en solution dans un tampon contenant 250 mM d'imidazole. Ce dernier peut perturber

le fonctionnement de la TEV ainsi que les étapes de purification suivantes, et doit être éliminé au préalable. Pour cela, la solution contenant la protéine est déposée dans une membrane de dialyse (Spectrapor) qui peut retenir les protéines jusqu'à une masse déterminée, à adapter en fonction de la protéine à purifier (seuil de rétention de 3 kDa pour la CaM ; et de 10 kDa ou 30 kDa pour le biosenseur SF1). La membrane de dialyse contenant la solution protéique est placée dans un tampon de dialyse (Tris 50 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,5 ; 200 mL de tampon pour 1 mL de solution protéique) et doucement agitée à 4°C sur la nuit.

Afin d'éliminer l'étiquette His-Tag, les fractions collectées contenant la protéine d'intérêt sont mises en contact avec la TEV (1 mg de TEV pour 50 mg de protéine) à 4°C sur la nuit. L'étape de dialyse et de coupure TEV peuvent être réalisées en même temps par ajout de la TEV à l'intérieur du boudin de dialyse.

La protéine dépourvue de son étiquette His-Tag est à nouveau déposée sur colonne HisTrap et éluée en tampon A. A cette étape, la protéine d'intérêt ne présente plus d'affinité pour le nickel et est éluée directement. Les contaminants présentant une affinité pour le nickel ainsi que les étiquettes His-Tag et la protéase TEV sont retenus sur la colonne et éliminés par élution avec de l'imidazole.

Afin d'améliorer la pureté de la protéine d'intérêt, cette dernière est séparée par chromatographie d'exclusion stérique (GF75 Superdex Cytiva). Avant le chargement sur la colonne, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont concentrées par centrifugation sur un dispositif d'ultrafiltration Amicon (Merck ; mêmes masses retenues que pour les membranes de dialyse) jusqu'à obtenir un volume total d'environ 5 mL. Le volume à déposer sur colonne doit être minimisé afin d'obtenir une meilleure séparation. La solution contenant la protéine est déposée sur la colonne d'exclusion stérique et éluée à un débit de 1 mL/min dans un tampon Tris 50 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,5. La concentration en protéine dans les fractions collectées est estimée par mesure de l'intensité de fluorescence à 280 nm (Mesure au nanodrop ; Abs 0.1% (=1 g/l) = 0,185 pour la $CaM\Delta_{I-II}$ et 0,778 pour SF1 ; Cf. **Section 2.2.7.1**.). Les fractions sont ensuite concentrées sur Amicon, puis la pureté et la masse moléculaire de la protéine sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant et par spectrométrie de masse (Bruker Impact II ESI-TOF). La concentration de la protéine est mesurée par dosage BCA (Cf. **Section 2.2.7.2**.). La protéine purifiée est stockée à -20°C en aliquots de 1 mL.

2.2.4. Production de protéines en batch

Les travaux « en batch » correspondent à la manipulation de nombreux échantillons en simultané, ici 96 échantillons. La production de protéines en batch repose sur le protocole présenté en **Section 2.2.2**. La préculture est réalisée en plaque de 96 puits stérile (Dutscher Deepwell 96 well 2 mL) contenant 1 mL de milieu LB tandis que la culture cellulaire est réalisée dans des plaques de 24 puits stériles (Axygen 24 well deep well plate sterile) contenant 4 mL de milieu de culture. Pour la préparation des extraits cellulaires solubles, la sonication est incompatible avec ce type de manipulations, et les cellules sont lysées exclusivement par congélation/décongélation.

2.2.5. Purification de protéines en batch

Le protocole de purification en batch repose sur le même principe que celui présenté en **Section 2.2.3**. Cependant, les échantillons ne peuvent pas être purifiés indépendamment sur une colonne de nickel en raison de leur trop grand nombre.

2.2.5.1. Préparation de la résine nickel

La résine utilisée (Thermo-Fischer Ni-NTA HisPur) est une résine constituée de billes d'agarose chargées en ions Nickel divalents. Elle permet la liaison d'une large quantité de protéines possédant une étiquette His-Tag.

10 mL de résine sont prélevés pour traitement en amont de la purification, et sont déposés dans des Eppendorfs de 5 mL. Le tout est centrifugé à basse vitesse afin de ne pas dégrader la résine (1000 rpm ; 4°C ; 5 min). Le surnageant est éliminé et la résine est resuspendue dans un volume d'eau équivalent au volume de résine. L'opération est répétée 2 fois. La résine est ensuite resuspendue dans un volume de tampon A, et le tout est centrifugé (1000 rpm ; 4°C ; 5 min). L'opération est répétée 2 fois.

2.2.5.2. Purification

100 µL du mélange résine / tampon A 1:1 sont ajoutés aux extraits cellulaires contenus dans chaque puits d'une plaque 24 puits, et le tout est mis en incubation (30 min ; 4°C ; 50 rpm).
Chaque échantillon est déposé dans un puits d'une plaque 96 puits disposant d'une membrane filtrante (Macherey-Nagel reciever plates 35 µm 96 well). Le surnageant et les débris cellulaires sont éliminés par aspiration, et les billes de résine portant la protéine d'intérêt sont retenues par la membrane. La résine est lavée par ajout de 200 µL de tampon A, qui sont ensuite éliminés par aspiration. L'opération est répétée 2 fois.

Afin d'enlever l'étiquette His-Tag de la protéine d'intérêt et de libérer la protéine, 200 µL de tampon adapté à la fluorescence (MES 20 mM ; KCl 100 mM pH 6) et 20 µL de TEV (1 mg/mL) sont ajoutés à chaque échantillon. Les deux extrémités des puits sont bouchées par un film autocollant adapté, et le tout est mis sous agitation sur la nuit (4°C ; 50 rpm). Le mélange contenant la protéine sans son étiquette est ensuite filtré et chaque échantillon est collecté dans une plaque 96 puits. La résine est lavée avec 200 µL de tampon MES 20 mM ; KCl 100 mM pH 6, qui sont ensuite collectés et ajoutés aux extraits précédents. Certains extraits contenant la protéine purifiée sont sélectionnés aléatoirement et leur contenu protéique est dosé au moyen du spectrophotomètre Nanodrop (Abs 0.1% (=1 g/l) = 0,183 pour la CaM et 0,778 pour SF1 ; Cf. **Section 2.2.7.1**.) La concentration en protéine des extraits non dosés est considérée similaire à celles mesurées.

2.2.5.3. Régénération de la résine

200 µL de tampon B sont ajoutés dans chaque puits pour régénérer la résine usagée. Le tout est mis sous agitation pendant quelques minutes et le surnageant est éliminé. L'opération est répétée deux fois. Deux lavages en tampon A sont ensuite effectués, suivis de deux lavages en eau milliQ, et

finalement deux lavages par une solution eau / éthanol 80:20. La résine est ensuite collectée et stockée à 4°C à 50 % en volume dans une solution eau / éthanol 80:20. Elle peut être réutilisée plusieurs fois.

2.2.6. Electrophorèse de protéines sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS/PAGE)

Les migrations sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) ont été réalisées sur gels d'acrylamide dénaturants commerciaux à gradient NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen). L'utilisation d'un gel à gradient permet une migration optimale de fragments à haut et bas poids moléculaires sur un même gel. Le marqueur de taille utilisé est le Thermo-Fischer PageRuler Prestained (10-180 kDa).

15 µL d'échantillon protéique (5-10 µg pour des échantillons purifiés et 30-60 µg pour des extraits bruts) sont ajoutés à 5 µL de tampon de charge SDS 4x Loading Buffer (Sigma-Aldrich ; Glycérol 40 %, SDS 8 %, Tris-HCl 424 mM, Tris-Base 564 mM, EDTA 2.04 mM, Phenol Red 0,72 mM, Coomassie Brilliant blue G250 0,88 mM), et le tout est incubé à 95°C pendant 5 min pour dénaturer les protéines. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel, et la migration est effectuée par application d'un courant électrique (200 V, 300 mA, 30 min) dans un tampon MES 50 mM, Tris 50 mM, SDS 3,5 mM, pH 7,3. Les protéines sont révélées par incubation du gel dans une solution de coloration (Bleu de Coomassie 0,1 % ; acide acétique 20 % ; éthanol 40 %) pendant environ 1 h. L'excès de colorant est éliminé par incubation dans une solution décolorante (acide acétique 10 %, éthanol 20 %) sur la nuit.

2.2.7. Quantification de protéines

2.2.7.1. Quantification par spectrophotométrie

La détermination de la concentration en protéines peut être réalisée en utilisant un spectrophotomètre à microvolume Nanodrop en mesurant l'absorbance à 280 nm d'une solution. La concentration en protéine peut être déterminée par la loi de Beer-Lambert $A_{280nm} = \varepsilon \times l \times C$; avec A_{280nm} l'absorbance de la solution, ε le coefficient d'extinction de la protéine à doser, l la longueur de trajet optique et C la concentration en protéine. Les coefficients d'extinction de chaque protéine utilisée dans le cadre de cette thèse sont indiqués en **Tableau 16**.

Protéine	**Coefficient d'extinction** Abs 0,1% (=1 g/l) sans His-Tag	**Coefficient d'extinction** Abs 0,1% (=1 g/l) avec His-Tag
CaMS1YΔ_{2-3}S2Δ_{2-3}	0,185	0,288
CaM mutants contenant un second résidu Y	0,367	/
Biosenseur SF1	0,778	0,774

Tableau 16 : *Coefficients d'extinction molaire des protéines utilisées au cours de cette thèse*

2.2.7.2. Dosage BCA

Le dosage BCA est une méthode indirecte de dosage de protéines basée sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA) et du cuivre Cu^{2+} (Smith et al., 1985). L'ion Cu^{2+} peut être réduit par les protéines selon la réaction de Biuret, pour former du Cu(I). L'acide bicinchonique, présent dans la solution et hautement spécifique pour le Cu(I), forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm. L'absorption de l'échantillon à 562 nm est proportionnelle à la concentration de peptide dosé. L'albumine de sérum bovin (BSA) est ici utilisée comme protéine de référence de concentration connue pour déterminer une gamme d'étalonnage.

Dans une plaque 96 puits adaptée à la mesure d'absorbance (Greiner 96 well Chimney flat transparent), une gamme étalon contenant de la BSA à des concentrations connues est réalisée dans un volume final de 25 µL (**Tableau 17**). Des échantillons de protéine à doser sont ajoutés à la même plaque (3 mesures par échantillon à doser de même concentration ou de quantités variables) dans un volume final de 25 µL. 200 µL d'une solution contenant 1 volume de $CuSO_4$, H_2O à 4 % et 49 volumes de la solution de BCA commerciale (Sigma-Aldrich, BCA-Na_2 1 %, Na_2CO_3, H_2O 25 %, tartrate de sodium 0,16 %, NaOH 0,4 %, $NaHCO_3$ 0,95 %, pH 11,25) sont ajoutés. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis l'absorbance à 562 nm de chaque solution est mesurée. La gamme étalon réalisée au moyen de la BSA permet de tracer une droite d'équation y = ax + b, où « y » est l'absorbance mesurée, « a » la pente de la droite, « b » l'ordonnée à l'origine ou l'absorbance du blanc (échantillon sans protéine), et « x » est la concentration en protéine. La droite étalon permet de connaître « a » et « b », et la concentration en protéine dans un échantillon peut ainsi être calculée à partir de son absorbance.

	Droite étalon avec des concentrations croissantes en BSA						**Échantillon à doser**
Volume de tampon (µL)	25	22,5	18,75	12,5	6,25	0	0 ou 12,5
Volume de solution de BSA 2 mg/mL (µL)	0	2,5	6,25	12,5	18,75	25	0
Concentration en BSA (mg/mL)	0	0,2	0,5	1	1,5	2	/
Volume de solution à doser (µL)	/	/	/	/	/	/	12,5 ou 25
Volume de réactif (µL)	200						

Tableau 17 : *Dosage de la quantité de protéines par la méthode BCA. La droite étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA.*

2.2.8. Culture de bactéries en présence d'uranyle

Les manipulations de culture de bactéries en présence d'uranyle ont pour but de caractériser la réponse du biosenseur exprimé dans le cytoplasme de cellules d'*E. coli* à l'uranyle présent dans le milieu de culture.

25 mL de milieu LB + antibiotiques sont ensemencés à 1-4 % à partir d'une préculture d'*E. coli* M15REP4 contenant le plasmide codant le biosenseur SF1. Le tout est placé sous agitation (37°C, 150 rpm) jusqu'à DO_{600nm} = 0,5. 100 µM d'IPTG sont ajoutés et les cellules sont maintenues sous agitation (37°C, 150 rpm, 4 h pour la CaM et ses variants, 17°C sur la nuit pour le biosenseur SF1). L'uranyle peut être ajouté au moment de l'induction, ou 1-2 h après cette dernière. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation (4500 g ; 10 min ; 4°C). Afin d'éliminer l'uranyle non absorbé, le culot est resuspendu dans du tampon adapté à la fluorescence, et l'opération est répétée deux fois. Les cellules lavées sont ensuite analysées par fluorescence en plaque.

2.2.9. Extraction de protéines par BugBuster

L'extraction de protéines par protocole BugBuster est utilisée pour déterminer les fractions solubles et insolubles lors de la surexpression de protéines chez *E. coli*.

Des cellules d'*E. coli* cultivées en milieu LB sont collectées à hauteur de 1 mL à DO_{600nm} = 1, et sont centrifugées (10000 g ; 3 min). Le culot bactérien est resuspendu avec 80 µL de Bugbuster (Merck). 20 µL sont collectés et constituent l'extrait protéique total. Les 60 µL restants sont centrifugés (10000 g ; 3 min). Le surnageant est collecté et constitue l'extrait protéique soluble. Le culot et resuspendu dans 80 µL de tampon de charge NEB purple loading dye, et constitue l'extrait protéique insoluble. Les différents extraits protéiques sont analysés par migration sur gel d'acrylamide en condition dénaturantes (Cf. **Section 2.2.6**.)

2.3. Analyse biophysique de protéines

2.3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (ESI-TOF) en mode positif a été utilisée pour le contrôle de la masse moléculaire des protéines produites et leur intégrité. Les analyses ont été réalisées au moyen d'un spectromètre de masse Impact II (Bruker France). Les protéines à analyser ont été diluées dans une phase dénaturante eau/acétonitrile (50/50 - vol/vol) contenant 0,2 % d'acide formique. Les échantillons ont été injectés en continu à un débit de 3 µL/min. Les spectres de masse ont été enregistrés dans la gamme masse sur charge (m/z) comprise entre 500 et 7000. La tension du capillaire a été fixée à 3,5 kV, celle de la contre électrode à 3 kV. La pression du gaz de nébulisation (N_2) a été de 0,3 bars ; la température du gaz de séchage (N_2) est de 200°C avec un débit de 4 L/min. Les spectres de masse ont été acquis au moyen du logiciel otofControl et retraités avec DataAnalysis.

2.3.2. Spectroscopie de fluorescence

2.3.2.1. Traitement des protéines pour analyse par fluorescence

Une solution de 350 µL à 50 µM de protéine à analyser et 5 mM d'EDTA dans un tampon adapté à la fluorescence (MES 20 mM ; KCl 100 mM ; pH 6, préalablement traité à 2 % de Chelex) sont incubés à 4°C sur la nuit. Le chelex (Chelex-100 ; BIO-RAD) est une résine permettant de chélater les ions polyvalents, et sert ici à éliminer les ions Ca^{2+} présents dans le tampon. L'EDTA a pour but d'éliminer de la solution les ions divalents qui pourraient être chélatés par la CaM. L'EDTA peut cependant chélater l'uranyle et doit être éliminé. La solution est déposée dans un Amicon 3 kDa puis complétée en tampon pour un volume total de 500 µL et le tout est centrifugé (4°C ; 8000 g ; 30 min). Le filtrat est éliminé, puis du tampon est ajouté pour un volume total de 500 µL et l'opération est répétée 5 fois. La protéine lavée est ensuite reprise dans le tampon de fluorescence pour un volume total de 300 µL. La concentration en protéine dans la solution obtenue est mesurée par dosage BCA.

2.3.2.2. Traitement des cellules pour analyse par fluorescence

1 mL de culture de cellules d'*E. coli* BL21(DE3) exprimant le biosenseur membranaire (complexes carrier-SC et SF1-ST) sont collectés par centrifugation (3000 rpm, 5 min, 20°C). La DO_{600nm} est mesurée, les cellules sont centrifugées (3000 rpm, 5 min, 20°C). Le surnageant est éliminé, et les cellules sont lavées dans 1 mL de tampon NaCl 100 mM pH 6 préalablement chelexé. L'opération est répétée 2 fois, puis la concentration des cellules et ajustée à DO_{600nm} = 0,5 et les extraits sont directement analysés par fluorescence en plaque de 96 puits (Cf. **Section 2.3.2.2**.).

2.3.2.3. Fluorescence en cuve

Les mesures de fluorescence sont réalisées au moyen d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse et d'une cuve adaptée à la mesure de fluorescence (Hellma analytics QS High Precsion Cell Light Path 2 x 10 mm). L'excitation est effectuée à 270 nm, le spectre d'émission de la protéine est mesuré de 290 à 340 nm. Pour chaque mesure, 10 lectures du spectre de fluorescence sont effectuées, puis sont moyennées.

Une solution de 210 µL contenant 5 µM de protéine et 50 µM d'acide iminodiacétique (IDA) dans du tampon de fluorescence est ajoutée à une cuve de fluorescence, et le tout est incubé à 25°C pendant 30 min. L'IDA agit ici comme un compétiteur à la protéine pour la fixation de l'uranyle. Les constantes de dissociation (Kd) IDA-uranyle sont connues et permettront de calculer le Kd conditionnel de la protéine pour l'uranyle. Une fois l'incubation terminée, le spectre de fluorescence de la protéine sans uranyle est mesuré jusqu'à l'obtention d'un spectre stable. 1,5 µL d'une solution de nitrate d'uranyle à 75 µM sont ajoutés, et incubés pendant 3 min dans le but d'atteindre l'équilibre de l'interaction protéine/uranyle, puis le spectre de fluorescence est mesuré. Une diminution de la fluorescence à 302 nm est observée. L'opération est répétée jusqu'à l'observation d'une intensité de fluorescence à 302 nm qui ne varie plus.

Les données de fluorescence sont rassemblées dans un fichier Excel et traitées par le logiciel ReactLab Equilibria Pro (Jplus Consulting). A la suite de ce traitement, les constantes de dissociation correspondant aux deux événements de fixation d'uranyle par la protéine sont calculées.

2.3.2.4. Fluorescence en plaque

2.3.2.4.1. Analyses de protéines

Les analyses de protéines par fluorescence en plaque ont été réalisées au moyen d'un lecteur Infinite M1000 (Tecan). La fluorescence est mesurée à une longueur unique dans le cas d'analyses de la CaM (302 nm), ou sur une plage de longueur d'ondes dans le cas du biosenseur SF1 et des cellules l'exprimant (450-650 nm).

Analyse du biosenseur SF1

Dans chaque puits d'une plaque 96 puits adaptée à la mesure de fluorescence (Greiner 96 well Chimney flat black), 10 µL d'extraits protéiques sont ajoutés à 190 µL de tampon adapté à la fluorescence. Le tout est agité (200 rpm, 5 s) et le spectre de fluorescence des échantillons est mesuré. Une concentration croissante d'uranyle allant de 1 µM à 30 µM est ajoutée aux différents puits, et le spectre de fluorescence est mesuré pour chaque échantillon. Les spectres de fluorescence sont compilés sur un même schéma et la variation du profil permet de rendre compte de la réponse du biosenseur SF1 à l'uranyle.

Criblage de mutants de la CaMΔ$_{I-II}$

Dans chaque puits d'une plaque 96 puits adaptée à la mesure de fluorescence (Greiner 96 well Chimney flat black), 20 µL d'un mutant de la CaMΔ$_{I-II}$ purifié, 2 µL d'IDA (50 µM) et 172 µL de tampon de fluorescence sont ajoutés. Pour chaque série d'échantillons analysée, un des puits de la plaque contient la CaMΔ$_{I-II}$ non mutée à une concentration similaire à celle des mutants et fait office de contrôle interne.
Le contenu des puits est exposé à une longueur d'onde de 270 nm, et l'intensité de fluorescence à 302 nm est mesurée. 2,5 µM de nitrate d'uranyle sont ajoutés à chaque puits, le tout est agité pendant quelques secondes et l'intensité de fluorescence à 302 nm est mesurée.

Les intensités de fluorescence mesurées sont rapportées dans un tableau Excel, et une courbe rendant compte de l'intensité de fluorescence à 302 nm en fonction de la concentration en uranyle est tracée pour chaque échantillon. L'analyse des courbes obtenues permet de rendre compte d'une baisse d'intensité de fluorescence propre à chaque mutant. Une baisse rapide à faible concentration d'uranyle suggère un mutant plus affin pour le métal comparé à la protéine de départ.

2.3.2.4.2. Analyse de bactéries

20 µL d'une solution de bactéries traitées comme présenté en **Section 2.3.2.2.** ou en **Section 2.2.8.** sont ajoutés à 180 µL de tampon adapté à la fluorescence, et le tout est agité (200 rpm ; 5 s). Le contenu des puits est exposé à une longueur d'onde de 440 nm, et le profil de fluorescence de 450 nm à 650 nm est mesuré. Du nitrate d'uranyle est ajouté pour une concentration finale de 1 µM, puis le tout est agité et le spectre de fluorescence est mesuré. L'opération est répétée pour une concentration totale en uranyle de 2 µM, 5 µM, 10 µM et 25 µM. L'échantillon est agité et le spectre de fluorescence est mesuré après chaque ajout d'uranyle. Les spectres de fluorescence sont compilés sur un même schéma et la variation du profil permet de rendre compte de la réponse des cellules à l'uranyle.

Résultats

Chapitre I : Expression d'un biosenseur d'uranyle chez le poisson zèbre

1. Introduction

Le biosenseur SF1 développé par l'IPM offre une limite de détection basse pour l'uranyle, d'environ 0,1 µM. Son signal de transduction de nature fluorescente permet une observation facilitée de sa réponse au métal y compris en milieu biologique, faisant de SF1 un candidat de choix au développement d'un biosenseur whole-cell d'uranyle. Lors d'une précédente thèse réalisée au sein de l'IPM (R. Chérif, données non publiées), le biosenseur SF1 a été exprimé dans les racines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, dans le but de développer un biosenseur whole-cell fluorescent d'uranyle. Ce système a permis la détection d'uranyle chez des plantules cultivées en milieu liquide et exposées à une concentration de 10 µM de métal, apportant la preuve de concept de l'utilisation du biosenseur SF1 dans les racines de la plante. Le projet qui constitue ma thèse vise à développer un outil permettant la détection d'uranium biodisponible en solution aqueuse. L'organisme utilisé doit donc être adapté à un milieu aquatique, ce qui n'est pas le cas d'*A. thaliana*. Nous avons par conséquent choisi de travailler avec le poisson zèbre *Danio rerio*.

D. rerio (**Figure 21**) est un poisson d'eau douce de la famille des cyprinidés naturellement retrouvé dans les eaux du Gange, dans la partie Est de l'Inde et au Népal (Spence et al., 2008). Il est couramment utilisé comme modèle en biologie et en toxicologie (Dooley, 2000 ; Teame et al., 2019). Il présente une homologie génétique d'environ 70 % avec l'être humain, faisant de cette espèce un modèle pertinent pour l'étude de l'effet de composés médicamenteux ou toxiques sur l'organisme. Le maintien d'un cheptel en laboratoire est facilité par la taille des individus (4-5 cm à l'âge adulte), et par la présence d'équipements dédiés. *D. rerio* est également une espèce robuste, capable de s'adapter à de nombreux facteurs de stress abiotiques (pH, salinité, température, lésions corporelles).

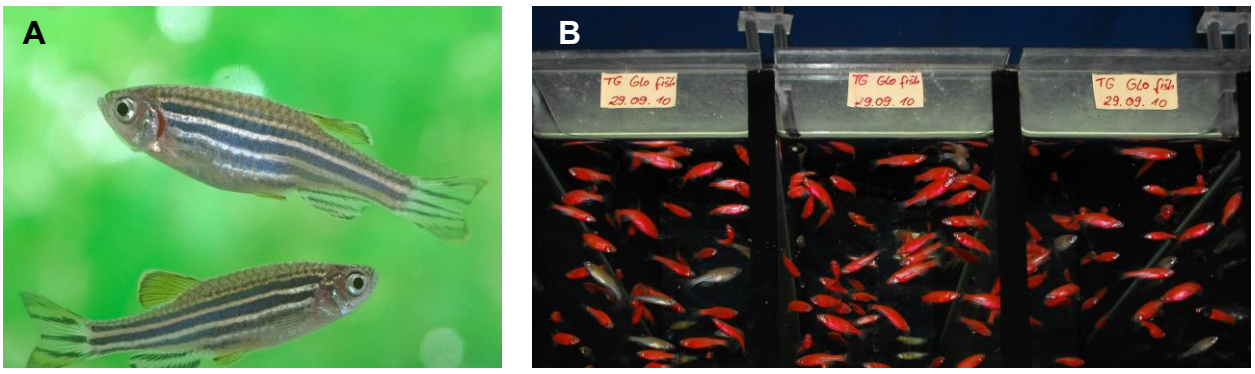


Figure 21 : a. *Individus de D. rerio femelle (en haut) et mâle (en bas).* ***b.*** *Élevage de D. rerio en animalerie de laboratoire.*

D. rerio présente un cycle de développement relativement court, avec une maturité sexuelle atteinte environ 90 jours post-fécondation (**Figure 22** ; Scholz et al., 2008). La reproduction des individus en laboratoire est rapide, facile à mettre en œuvre et permet d'obtenir plusieurs dizaines voire plus d'une centaine d'œufs par couple et par semaine. Ces œufs sont synchronisés et transparents, deux caractéristiques particulièrement intéressantes dans le cadre de ce projet. Les

individus sont également transparents pendant au moins 48 h post-fécondation, donnant accès à une large gamme de manipulations et d'observations.

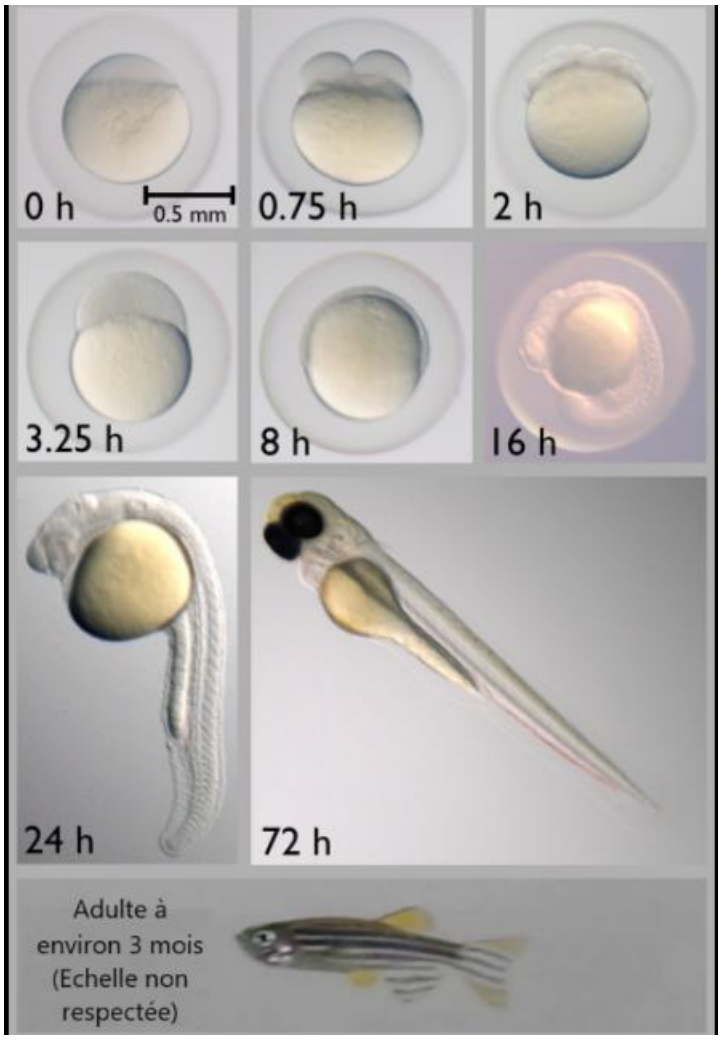


Figure 22 : *Étapes du développement de D. rerio.*
Figure tirée de (Coppola et al., 2023)

Les larves de *D. rerio* sont facilement transformables génétiquement, comme démontré par de nombreuses études visant à intégrer un gène exogène codant une protéine d'intérêt dans le génome de l'organisme, afin qu'elle soit produite par ce dernier. De nombreuses techniques de manipulation génétique telles que Tol2 (P.-C. Wang et al., 2024) ont par le passé été utilisées avec succès chez *D. rerio*. Nous avons dans le cadre de ce projet choisi d'exprimer le biosenseur SF1 chez le poisson zèbre par édition de son génome au moyen de la technique CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ; Prix Nobel de Chimie 2020 ; Doudna & Charpentier, 2014). CRISPR-Cas9 permet l'insertion d'un gène dans une position ciblée du génome, et s'oppose ainsi aux techniques de transgenèse qui insèrent le gène d'intérêt de manière aléatoire, à la fois en nombre et en localisation. Le caractère aléatoire de ces techniques requiert la mise en place de contrôles visant à caractériser la modification génétique réalisée (nombres de copies du transgène, positions d'insertion, observation ou non d'un phénotype), qui peuvent être suivis d'étapes de sélection. Ces étapes sont réduites voire éliminées par l'utilisation de CRISPR-Cas9 et constituent principalement en l'observation ou non d'un phénotype associé à l'insertion.

2. Principe de l'édition

CRISPR-Cas9 est une technique d'édition génétique basée sur l'utilisation de l'enzyme Cas9 (CRISPR Associated protein 9). Les protéines Cas sont impliquées chez les bactéries dans des systèmes de défense contre les virus et les plasmides (Charpentier & Marraffini, 2014). Elles permettent la coupure à une position précise d'une séquence d'ADN double brin à proximité d'un site dit « motif adjacent au protospacer » (PAM ; protospacer adjacent motif), dont la séquence est propre à chaque enzyme Cas. Pour la Cas9, la séquence PAM est NGG (N étant un nucléotide aléatoire), et la coupure est effectuée trois nucléotides en amont de ce dernier (**Figure 23**). Pour être fonctionnelle, l'enzyme Cas9 doit être associée à un fragment d'ARN dit guide (ARNg), un ARN simple brin synthétique composé de deux portions : le crRNA (CRISPR RNA) complémentaire à la séquence génomique d'appariement, et le tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) qui permet d'assurer l'activité catalytique de la Cas9 complexée à l'ADN.

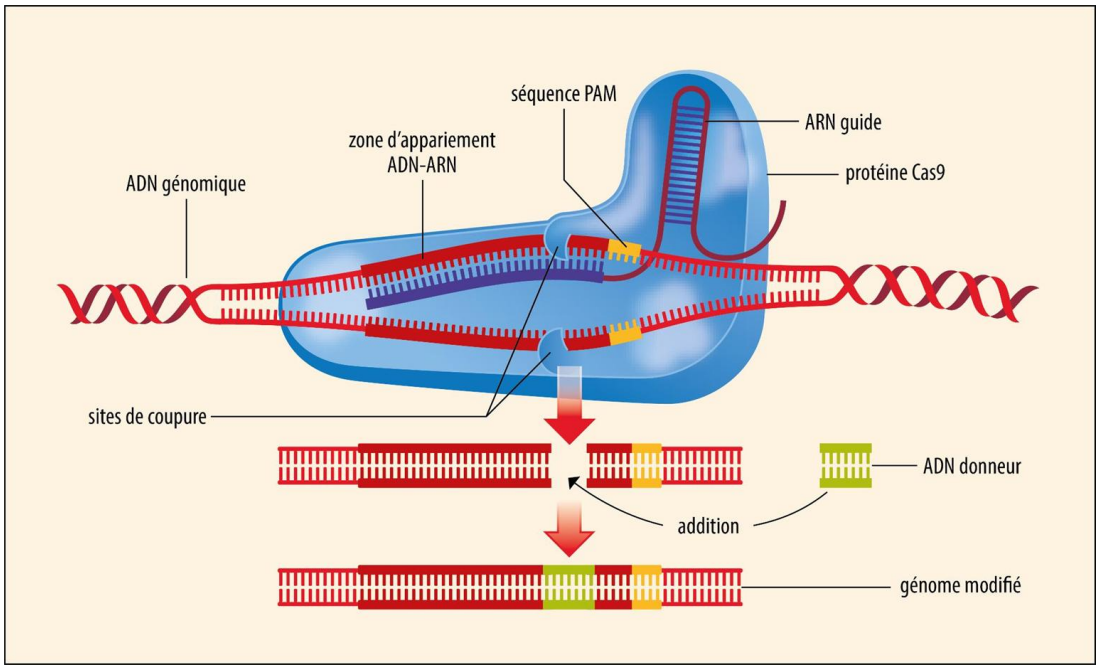


Figure 23 : *Principe de l'édition génétique par la technique CRISPR-Cas9. Pour l'ARN guide, la portion crRNA est indiquée en bleu et la portion tracrRNA est indiquée en rouge. Figure tirée de Encyclopædia Universalis France.*

La coupure provoquée par l'enzyme Cas9 est perçue comme une erreur par la cellule, et cette dernière va par conséquent chercher à la réparer en refermant la coupure. Dans la nature, cette réparation est dite NHEJ (non homologous end-joining), et consiste soit en la délétion ou l'insertion d'un fragment de quelques paires de bases, soit en la substitution de quelques paires de nucléotides. En laboratoire, il est possible d'effectuer une réparation dite HDR (homology directed repair), qui permet l'insertion d'un gène d'intérêt dans le site de coupure de la Cas9. Pour cela, on ajoute au système Cas9/ARNg une troisième composante dite ADN donneur (ou simplement « donneur »). Le donneur est constitué du gène à insérer entouré de deux séquences d'ADN, chacune complémentaire à une des extrémités du site de coupure et qui peuvent donc s'apparier avec l'ADN génomique. Les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN peuvent ainsi intégrer un gène d'intérêt au génome de l'organisme. La cinétique de ce procédé est très fortement déplacée vers la réparation de la coupure sans insertion du gène d'intérêt. En effet, si la Cas9 est particulièrement efficace et offre un taux de coupure souvent supérieur à 90 %, le taux d'intégration est largement plus faible et souvent inférieur

à 1 % chez *D. rerio*. Ce dernier varie également avec la taille du gène à insérer, et des constructions plus grandes présenteront un taux d'intégration plus faible.

Le contrôle de la position d'édition du génome permet en effectuant l'insertion en aval du promoteur d'un gène endogène de faire correspondre l'expression du gène inséré à celle du gène endogène, à la fois en termes d'intensité, de temporalité et de localisation. Le contrôle de la position d'édition permet également d'éviter l'insertion dans des gènes dont la perturbation pourrait conduire à l'apparition de phénotypes chez les individus et potentiellement à des défauts de développement (Sorlien et al. 2018).

Afin d'observer une édition de la totalité des cellules chez des organismes pluricellulaires, l'édition doit être réalisée au stade 1 cellule. Chez le poisson zèbre, ce stade est particulièrement court (15 minutes post-fécondation) et ne permet pas toujours l'édition, qui se fait alors à des stades de développement ultérieurs où le nombre de cellules est supérieur à 1. Ainsi il est fréquent que le transgène soit intégré seulement dans une fraction des cellules constituant l'organisme à un stade de développement donné. Les individus transformés de génération F0 expriment par conséquent la protéine d'intérêt dans une faible proportion de leurs cellules. La mise en reproduction des individus de génération F0 permet l'obtention d'individus de génération F1 hétérozygotes, certains présentant une expression de la protéine d'intérêt dans l'entièreté des cellules ciblées. La sélection de ces individus et leur mise en reproduction permet l'obtention d'individus de génération F2 homozygotes pour le gène édité (**Figure 24**).

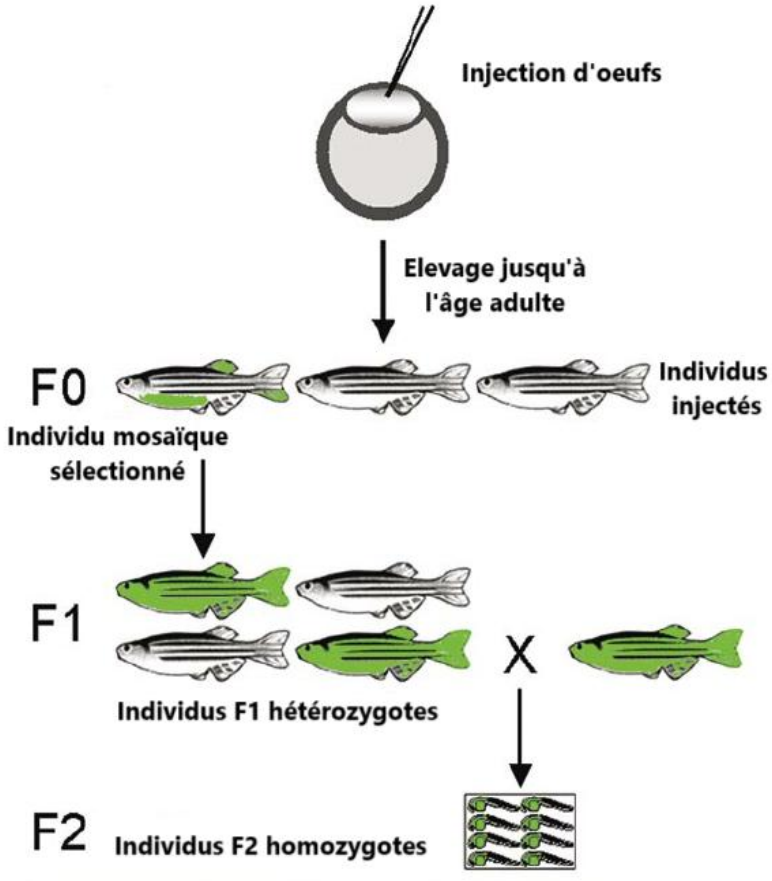


Figure 24 : *Principe de la création et du développement de lignées transgéniques homozygotes de D. rerio. La coloration verte indique l'expression de la protéine d'intérêt. Figure tirée de (Berghmans et al., 2005)*

3. Détermination d'une position d'insertion

Ce travail a été effectué en collaboration avec la plateforme TEFOR Paris-Saclay (https://tefor.net/), qui a apporté son expertise pour le choix des cibles endogènes d'insertion et pour la conception et la modification des ADNs donneurs. TEFOR a réalisé l'ensemble des manipulations d'élevage, d'édition et d'observation des larves de *D. rerio* présentées au travers de ce manuscrit. Les travaux de biologie moléculaire portant sur l'assemblage et la modification des donneurs ont quant à eux été réalisés par l'IPM.

L'objectif de ce projet est de développer un système permettant la détection d'uranium biodisponible dans l'eau. Par conséquent, il est pertinent de cibler une expression du biosenseur d'uranyle dans des tissus en contact avec l'eau tels que les branchies ou la peau, ou fortement accumulateurs d'uranium tels que le foie, l'intestin ou les gonades (Simon et al., 2019). Les tissus exprimant le biosenseur d'uranyle doivent également permettre une observation de la fluorescence de ce dernier, et il est donc judicieux d'éviter les organes internes. Le gène endogène ciblé doit également posséder un site PAM proche du promoteur pour assurer l'expression du gène inséré.

La transparence des larves de *D. rerio* est un élément clé à ce projet. En effet, le biosenseur d'uranyle que nous envisageons d'exprimer utilise comme signal de transduction la fluorescence, dont l'observation peut être rendue difficile par l'apparition de pigmentation. Cette dernière se développe progressivement chez les individus à partir de 24 heures post-fécondation (hpf) et jusqu'à 120 hpf. Il est donc nécessaire que le gène ciblé soit fortement exprimé de manière précoce afin de garantir une production suffisante du biosenseur avant l'apparition de la pigmentation. En revanche, les larves de moins de 3 jours post-fécondation sont trop fragiles pour être utilisées dans le cadre d'observations de fluorescence, et il n'est pas nécessaire d'exprimer le gène d'intérêt dès les premiers stades de développement des individus (moins de 24 hpf). La précocité d'expression du gène ciblé est également en lien avec l'aspect administratif du projet. En effet, la réglementation éthique encadrant les expérimentations animales attribue aux individus jusqu'à 5 jours post-fécondation un statut particulier. Cette durée correspond au passage des larves d'une diète endogène à une diète exogène. Par conséquent, la réglementation considère des manipulations réalisées sur des individus de moins de 5 jours comme *in vitro*. Ce cadre de travail ne nécessite pas d'autorisations particulières ni de contrôles vétérinaires, simplifiant grandement les travaux envisagés.

Le gène endogène ciblé peut voir sa fonction perturbée par l'insertion. En effet, l'ajout d'une séquence à exprimer en aval d'un promoteur et en amont du gène endogène peut diminuer l'expression de ce dernier et ainsi perturber les mécanismes biologiques associés. Si ce gène a un fort impact sur le développement, l'édition peut causer des problèmes de développement et conduire à des phénotypes difformes ou létaux. L'utilisation d'individus au développement affecté est peu souhaitable d'un point de vue éthique, et peut rendre plus complexes les manipulations et plus particulièrement l'obtention et la validation de certains résultats. Il est donc préférable de cibler un gène peu impactant dans le développement des individus. En consultant la littérature et la base de données ZFIN (base de données bio-informatiques consacrée au modèle animal *D. rerio* ; www.zfin.org), nous avons identifié trois cibles d'insertion potentielles remplissant les critères cités précédemment : les gènes *atp1b1b*, *foxi3b* et *krt8*.

4. Édition du gène *atp1b1b*

Le gène *atp1b1b* code la protéine Atp1b1b de 302 acides aminés, impliquée dans l'homéostasie du sodium et du potassium et exprimée dans l'ectoderme, le système nerveux et les ionocytes (canaux ioniques situés au niveau des branchies ; **Figure 25**). Son expression commence dès 6 hpf et peut être considérée comme forte dès 24 hpf (**Figure 26**). Il fait partie d'un groupe de nombreux gènes codant des ATPases et possède plusieurs homologues tels que *atp1a1a*, *atp1a1b* et *atp2a1*. Nous envisageons ici une insertion en aval du promoteur et en amont de la partie codante de *atp1b1b*. Une telle position permet de garantir une expression forte du gène inséré due à la proximité entre ce dernier et le promoteur endogène de *atp1b1b*. En contrepartie, il est possible que l'expression de *atp1b1b* diminue en raison de son éloignement du même promoteur.

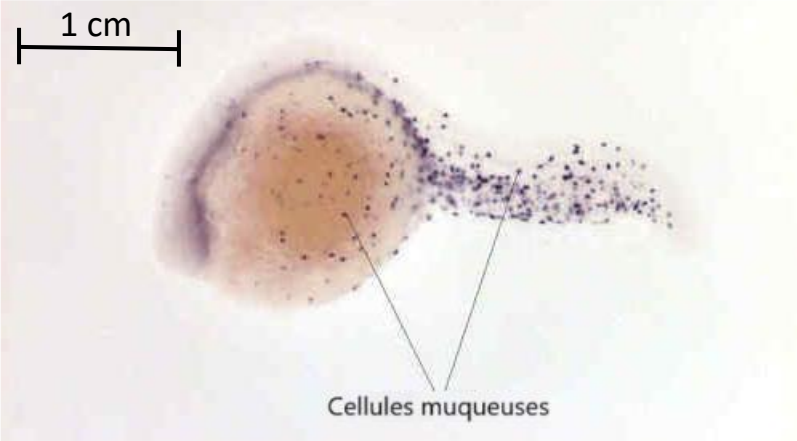


Figure 25 : *Expression du gène atp1b1b chez une larve de D. rerio à 20-24 hpf. La pigmentation indique l'expression du gène. Figure tirée de (Thisse et al., 2001)*

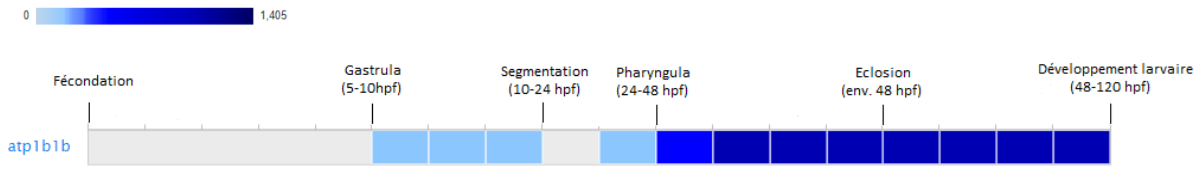


Figure 26 : *Atlas d'expression du gène atp1b1b chez D. rerio. Une coloration plus foncée indique une expression plus forte du gène au cours du développement du poisson. TPM : transcrits par minute. Figure tirée de zfin.org ; données issues de (White et al., 2017)*

4.1. Validation des sites d'insertion et test des ARNgs

Au préalable de l'insertion du gène codant le biosenseur SF1, il est nécessaire de vérifier la faisabilité de cette dernière. L'enzyme Cas9 utilise un ARNg synthétique, conçu par analyse des séquences génomiques adjacentes au site de coupure visé. La longueur de cet ARNg et sa séquence influencent son interaction avec l'ADN génomique et avec la Cas9. Un ARNg non optimisé peut diminuer l'efficacité de la coupure de l'ADN par la Cas9 et donc les chances d'une insertion réussie du gène codant le biosenseur. Il est par conséquent nécessaire de vérifier le taux de coupure associé à un ARNg donné. Pour ce faire, des tests mettant la Cas9 en réaction *in vitro* avec l'ADN génomique

ciblé et deux ARNg candidats ont été réalisés. L'amplification par PCR de l'ADN obtenu a permis de confirmer l'efficacité des guides testés (88 % de coupure en moyenne) pour les différents gènes ciblés puis de sélectionner le plus performant pour la suite des manipulations.

4.2. Insertion du gène codant la mCherry

Comme mentionné précédemment, la coupure de l'ADN génomique et l'insertion d'un gène exogène peuvent perturber l'expression du gène subissant l'insertion et conduire à des phénotypes indésirables. Un des contrôles préalables à l'édition est donc de caractériser l'impact de l'insertion d'un gène à la position ciblée sur le développement des individus. De la même manière, il est nécessaire de caractériser l'expression du gène inséré. La protéine exprimée doit être fonctionnelle, et doit être produite de manière suffisante et adaptée aux travaux envisagés, à la fois en localisation et en temporalité. Pour ce faire, nous avons édité le génome d'œufs de *D. rerio* pour insérer aux positions ciblées le gène codant une protéine fluorescente de type GFP, la mCherry. Cette manipulation a pour but de vérifier à la fois l'efficacité *in vivo* des ARNgs sélectionnés, mais également de caractériser le taux d'insertion du gène codant la mCherry. Le contrôle de la viabilité des individus édités après 24 h et 120 h permet de mesurer un taux de survie et de rendre compte de potentiels phénotypes chez les individus.

Les essais d'édition d'*atp1b1b* avec le gène de la mCherry ont consisté en deux séries de manipulations, pour un total de 731 individus injectés. Ces travaux ont permis d'observer un taux de mortalité satisfaisant des larves : 45 % et 55 % à 24 hpf et 120 hpf pour les individus injectés, proche de celui des larves contrôles (41 % et 78 %, respectivement). Les individus viables ne présentent pas de défauts de développement. Le taux de transformants positifs au travers des deux séries d'injections était de 9,72 % et 3,23 % respectivement. L'observation à 24 hpf et 48 hpf d'une fluorescence intense de la protéine mCherry chez les transformants viables confirme d'une part l'efficacité de la coupure et de l'insertion, et d'autre part l'expression d'une protéine fonctionnelle (**Figure 27**). Elle valide également la faisabilité de manipulations impliquant la fluorescence des tissus ciblés. Les petits points blancs observés sur la **Figure 27** indiquent que toutes les cellules n'expriment pas le transgène. Les poissons sont transgéniques de façon mosaïque car l'insertion du gène codant la mCherry n'a pas été réalisée au stade 1 cellule.

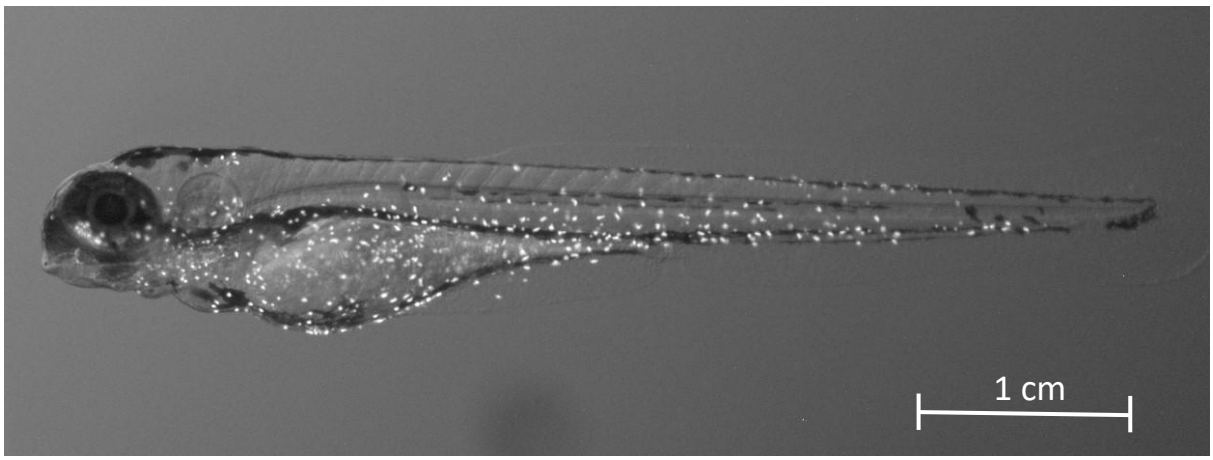


Figure 27 : *Larve de D. rerio à 96 h exprimant la protéine fluorescente mCherry dans le gène atp1b1b.*

4.3. Insertion du gène codant le biosenseur SF1

L'identification d'une position d'insertion viable a permis d'engager la synthèse d'un gène codant le biosenseur SF1 adapté à l'édition de *atp1b1b*, et qui sera utilisé comme ADN donneur pour les manipulations d'édition (Cf. **Section 2. Principe de l'édition**). Ce donneur est basé sur le gène codant SF1 normalement utilisé par l'IPM pour la surexpression de la protéine chez *E. coli*. La séquence de ce dernier est adaptée à une expression bactérienne et comprend certains codons considérés comme rares chez *D. rerio* (codons faiblement utilisés et dont la présence peut perturber l'expression chez un organisme donné ; Cf. **Annexe 1**). Elle a donc été optimisée pour l'expression chez *D. rerio*. La séquence dépourvue de codons rares a été utilisée pour la conception d'un gène pouvant être inséré dans la position de *atp1b1b* choisie. Ce gène de 2638 paires de bases est composé de la séquence du biosenseur SF1 (Domaine Nter de la CaM d'*A. thaliana* portant les mutations $\Delta_{2\text{-}3}$ dans les sites 1 et 2, entouré des protéines fluorescentes eCFP et citrine) dépourvue d'un codon stop afin d'éviter l'arrêt de la transcription après SF1, et ainsi d'englober *atp1b1b*. La séquence du biosenseur SF1 est entourée en 5' par un brin d'homologie avec *atp1b1b* dit « amont » et en 3' d'une séquence codant un peptide de clivage T2A et d'un brin d'homologie avec *atp1b1b* dit « aval » (**Figure 28**). Les brins d'homologie possèdent une séquence complémentaire aux extrémités du site de coupure envisagé dans *atp1b1b*. Ils sont nécessaires à l'appariement du gène à insérer avec l'ADN génomique coupé par la Cas9, et permettent ainsi d'augmenter le taux d'insertion réussie (**Figure 29**).

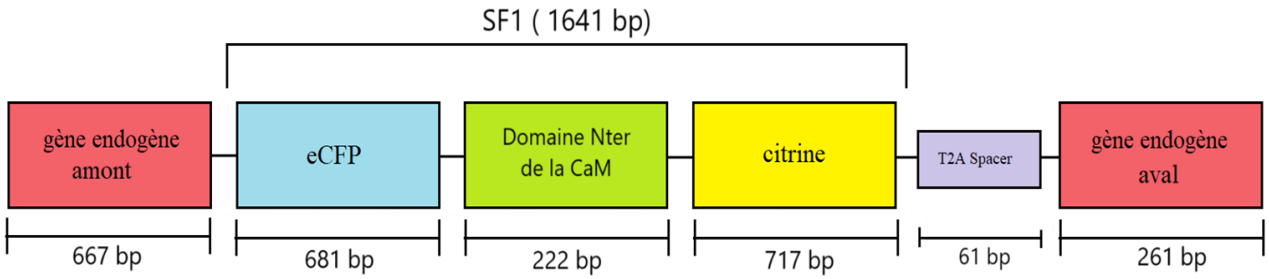


Figure 28 : *Représentation schématique de la séquence du gène utilisé pour l'édition de atp1b1b*

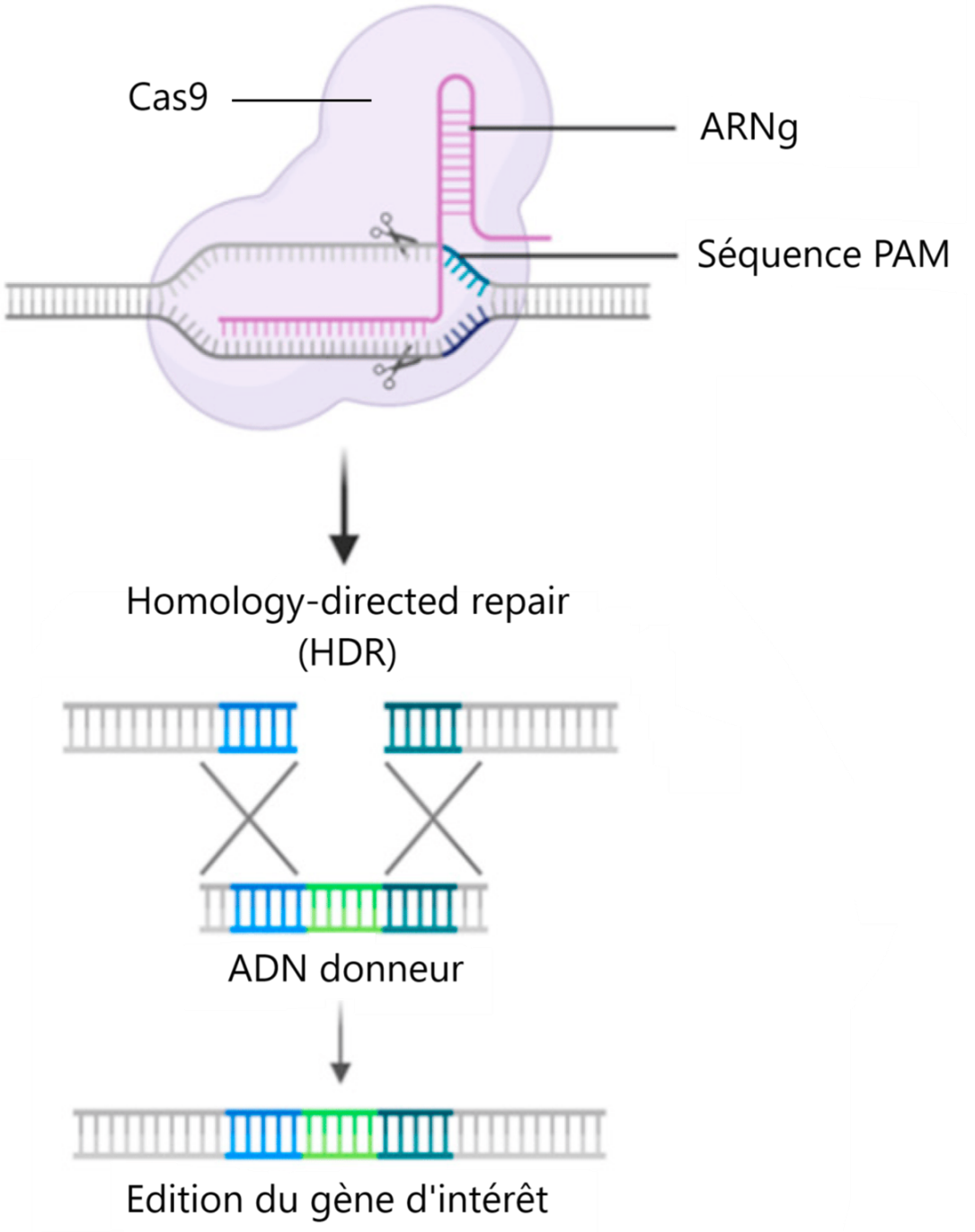


Figure 29 : *Principe de l'insertion d'un gène d'intérêt par CRISPR-Cas9. Le gène d'intérêt est indiqué en vert, les brins d'homologie sont indiqués en bleu. Figure tirée de (Reuven et al., 2021)*

Le peptide T2A, aussi appelé « spacer T2A », est un peptide de 21 acides aminés de séquence GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP. Les peptides auto-clivants 2A sont une classe de peptides longs de 18 à 22 acides aminés, qui peuvent induire un saut ribosomique lors de la traduction d'une protéine dans une cellule. Ces peptides partagent un motif de séquence DxExNPGP et se retrouvent dans un large éventail de familles virales. Ils aident à générer des polyprotéines en empêchant le ribosome de créer une liaison peptidique, avec pour principale conséquence l'insertion de quelques acides aminés

aux extrémités des protéines clivées (X. Wang & Marchisio, 2021). En effet, l'absence d'un codon stop en fin de séquence SF1 conduit à la traduction d'une protéine de fusion sous la forme d'un complexe SF1-Atp1b1b, qui peut conduire à la perte de fonction des deux protéines. L'introduction d'un peptide T2A entre la protéine insérée et la protéine endogène permet d'assurer le maintien de fonction de ces dernières.

Le gène ainsi conçu a été commandé auprès du fournisseur Twist Bioscience. La présence de deux GFPs aux séquences très similaires (10 acides aminés différents) est incompatible avec les méthodes de synthèse utilisées pour la production de gènes synthétiques. Pour pallier cette difficulté, nous avons choisi de commander le donneur en deux fragments, respectivement (amont-eCFP-CaM-aval) et (citrine) possédant des sites de restriction permettant l'assemblage de la citrine entre la séquence de la CaM et le brin d'homologie aval. Le gène *atp1b1b-SF1* entier a ainsi pu être assemblé par nos soins, et a par la suite été utilisé pour des manipulations d'édition du génome de *D. rerio*. L'ARNg ici employé est celui ayant été identifié dans les essais préliminaires d'insertion du gène codant mCherry.

Plusieurs essais d'édition ont été réalisés par l'injection d'un total de 1883 œufs au travers de plusieurs séries de manipulations. Le taux de survie des individus injectés a été mesuré et le taux d'édition réussie des individus viables a été contrôlé par fluorescence. Le taux de mortalité des individus s'est montré élevé, avec une moyenne de 30 % et 54 % à 24 hpf et 120 hpf respectivement, et de 21 % et 31 % respectivement pour les larves contrôles. Le taux d'individus positifs varie de 0 % à 4,14 % selon les manipulations, pour une moyenne de 0,21 % ou 4 individus positifs sur la totalité des injections, tous présentant un phénotype létal après 24 hpf. Ce nombre est trop faible pour permettre le développement d'une lignée viable, et il est difficile d'un point de vue expérimental d'augmenter le nombre d'œufs à injecter. Il est donc nécessaire d'améliorer à la fois le taux de survie des individus mais également le taux de transformants parmi les individus viables.

4.4. Modification du donneur et seconde série d'édition du génome

Le délai de survie des larves transformées correspond au début d'une phase d'expression forte de *apt1b1b*, et nous avons supposé que l'expression de ce dernier était perturbée par l'insertion du gène SF1. Différentes raisons peuvent expliquer la mortalité observée :

- Le biosenseur SF1 est une protéine nettement plus grande et de structure plus complexe que la mCherry précédemment exprimée et qui n'avait posé aucun problème (546 acides aminés, 61,4 kDa et 236 acides aminés, 26,7 kDa respectivement). Il est par conséquent possible que le biosenseur SF1 présente une toxicité pour les larves de poisson dans le cas d'une forte expression. La littérature décrit cependant l'expression du biosenseur Caméléon 1 (Miyawaki et al., 1997) chez différents organismes, dont *D. rerio*, avec obtention d'individus viables. Caméléon 1 est un biosenseur de calcium constitué d'une calmoduline entourée de deux protéines fluorescentes, soit une structure similaire à celle de SF1 pour une masse légèrement plus élevée. Il est donc peu probable que SF1 présente une toxicité chez les larves de poisson. Par conséquent, nous avons supposé que la mortalité observée était due à une expression perturbée de *atp1b1b*. Il est également possible que le clivage du peptide T2A soit peu efficace, conduisant à la traduction d'un complexe SF1-Atp1b1b, et qui pourrait fortement perturber la fonction de la protéine endogène.

- Deux codons (ATG CCG) normalement présents au début de la séquence codante de *atp1b1b* ont été délétés suite à l'insertion du donneur. Le codon ATG (codon start) est nécessaire à l'initiation de

la transcription. Le codon CCG code une proline, un acide aminé rigide fortement impliqué dans la structure des protéines, dont l'absence pourrait empêcher la formation d'une structure tertiaire fonctionnelle pour *atp1b1b*. Ce codon est présent en fin du brin d'homologie amont et se retrouve avant le biosenseur à la suite de son insertion dans *atp1b1b*. Ces observations nous ont amené à proposer que l'introduction d'une séquence ATGCCG à l'extrémité 5' du brin d'homologie aval permettrait d'améliorer l'expression de la protéine endogène.

Dans le but d'améliorer la survie des larves, nous avons supprimé par mutagenèse dirigée la proline en amont du gène synthétique codant le biosenseur, et ajouté les deux codons ATG et CCG manquants en début de la séquence d'homologie aval. Les deux mutations (suppression d'une proline en amont du biosenseur et ajout d'une méthionine et d'une proline en aval) ont été réalisées de manière successive : le codon codant la proline a d'abord été supprimé, et l'ADN obtenu a été utilisé pour introduire les codons codant les résidus Met et Pro au niveau du brin d'homologie aval (**Figure 30** ; **Figure 31**).

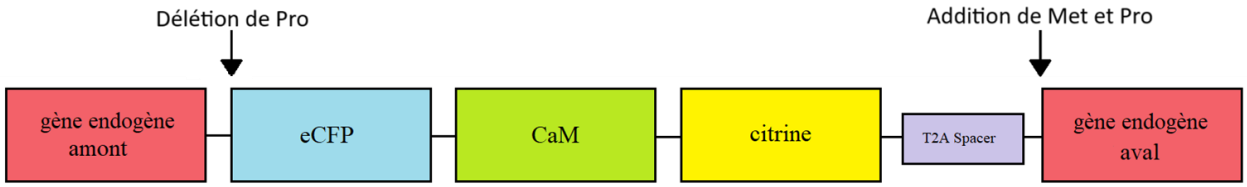


Figure 30 : *Représentation schématique de la modification du donneur atp1b1b-SF1*

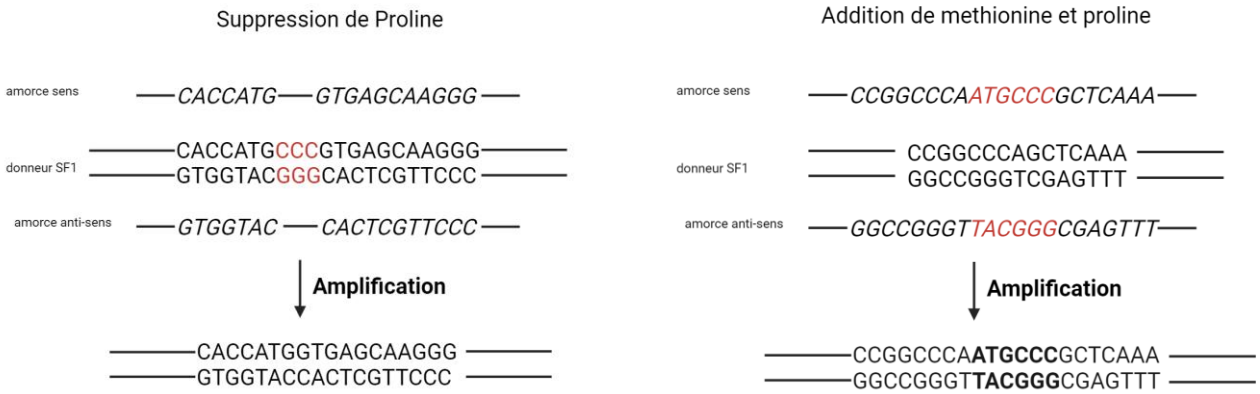


Figure 31 : *Modification de la séquence du donneur atp1b1-SF1*

Dans le but d'améliorer l'efficacité de l'édition du génome, nous avons également produit l'ADN donneur à un niveau de pureté supérieur à celui utilisé pour la première série d'injections. En effet l'ADN purifié sur kit peut contenir différents contaminants qui peuvent inhiber la réaction de la Cas9 avec l'ADN génomique, et présenter un caractère toxique pour les individus injectés. La présence de contaminants peut aisément être identifiée par la mesure des ratios d'absorbance à 260 nm/230 nm (présence de carbohydrates et composés phénoliques) et 260 nm/280 nm (présence de protéines) des ADNs produits. Ces ratios pour de l'ADN sont compris entre 0 à 2,0 et de 0 à 2,3 respectivement. Des valeurs d'au moins 1,8 pour le ratio A_{260nm}/A_{280nm} et de 2,0 pour le ratio A_{260nm}/A_{230nm} indiquent un échantillon avec une pureté satisfaisante. Des méthodes de production et purification d'ADN en grand volume et un procédé de purification de l'ADN plus spécifique (purification par kit de maxiprep suivie d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol) ont permis d'obtenir

un échantillon d'ADN donneur utilisable pour des manipulations d'édition génétique de *D. rerio* avec des ratios A_{260nm}/A_{280nm} = 1,84 et A_{260nm}/A_{230nm} = 2,28.

L'ADN donneur muté ainsi obtenu a été utilisé pour l'injection de 7562 œufs au travers de différents essais d'injection. Ces derniers ont permis d'observer un taux de mortalité élevé : 67 % et 85 % à 24 hpf et 120 hpf respectivement pour les individus injectés contre 34 % et 45 % respectivement pour les individus contrôles. L'édition était réussie chez 16 individus ou 0,21 % des œufs injectés, viables jusqu'à 48 hpf et qui présentent un phénotype létal passé ce délai. Ces observations suggèrent que l'expression du gène *atp1b1b* reste perturbée malgré les mutations réalisées. En effet, le taux d'expression de *atp1b1b* augmente progressivement dans le temps, avec à 48 hpf un taux d'expression est environ 10 fois plus élevé qu'à 24 hpf. L'efficacité d'un promoteur diminue avec la longueur de la séquence transcrite, et l'insertion d'un gène long tel que celui codant SF1 pourrait perturber l'expression d'un gène en aval. Il est ainsi possible que la partie codante de *atp1b1b* soit exprimée partiellement, conduisant à la production d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Cette limitation n'aurait ainsi pas été observée pour l'insertion du gène codant la mCherry en raison de sa taille nettement plus faible.

Ces résultats indiquent que le gène *atp1b1b* est fortement impliqué dans le développement des larves de *D. rerio*, et que l'insertion d'un gène de grande taille affecte de manière importante les chances de survie des larves. Si l'insertion de la mCherry dans *atp1b1b* a été effectuée avec succès, celle du biosenseur SF1 s'est montrée plus difficile, et nous avons par conséquent choisi d'abandonner l'édition du gène d'*atp1b1b*.

5. Édition du gène *foxi3b*

Le gène *foxi3b* code un facteur de transcription impliqué dans des mécanismes de différentiation des cellules épidermiques. Il code la protéine Foxi3b de 383 acides aminés exprimée dans le noyau des cellules de l'ectoderme, des ionocytes (**Figure 32**) et qui est associée à l'expression du gène *atp1b1b* (Hsiao et al., 2007). L'expression de *foxi3b* commence dès 8 hpf et peut être considérée comme forte dès 24 hpf (**Figure 33**), bien que nettement moins forte que celle d'*atp1b1b* en terme du nombre de transcrits par minute. Nous envisageons ici une insertion en aval de la partie codante de *foxi3b*. Par opposition à *atp1b1b*, nous avons ici choisi de favoriser l'expression du gène endogène. Ce choix a été motivé par le rôle de facteur de transcription de *foxi3b*, qui suggère l'importance de maintenir son expression. De plus, insérer le gène codant le biosenseur SF1 d'une part en amont chez *atp1b1b* et de l'autre en aval chez *foxi3b* permet de mieux connaître l'influence de la position d'insertion et de guider les choix expérimentaux dans le cadre de futurs travaux. Comme pour l'édition de *atp1b1b*, différents ARNgs ont été testés, et ont montré un taux de coupure moyen de 70 %. Ce taux est plus faible que pour *atp1b1b* mais reste suffisant pour envisager la suite des manipulations. Les essais d'édition du gène codant la mCherry n'ont pas permis d'observer des individus viables et positifs à l'édition après injection de 2511 œufs. Un taux de survie particulièrement faible a été observé chez les larves transformées, avec une mortalité de 49 % à 24 hpf et de 70 % à 120 hpf, par comparaison à 35 % à 24 hpf et 59 % à 120 hpf pour des injections contrôles. Les individus viables ont été contrôlés négatifs à l'édition. Ces résultats suggèrent que l'insertion dans *foxi3b* perturbe le fonctionnement du gène endogène et que ce dernier est fortement impliqué dans le développement des larves. De par ces résultats, nous avons choisi d'abandonner l'insertion dans *foxi3b*.

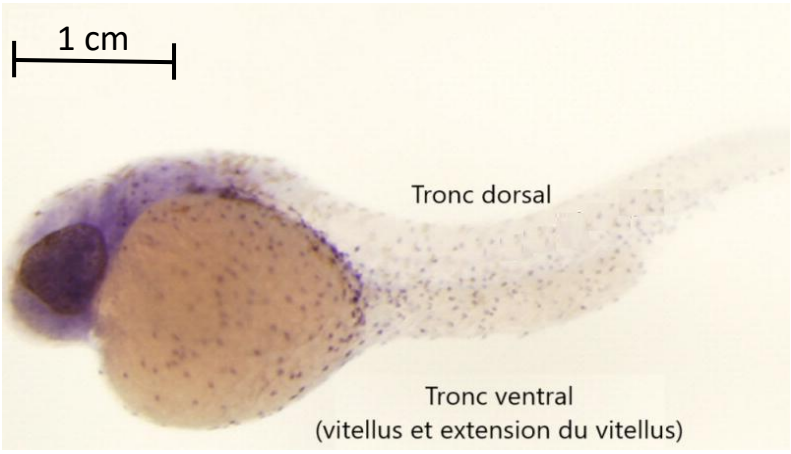


Figure 32 : *Expression du gène foxi3b chez une larve de D. rerio à 20-24 hpf. La pigmentation indique l'expression du gène. Figure tirée de (Esaki et al., 2009)*

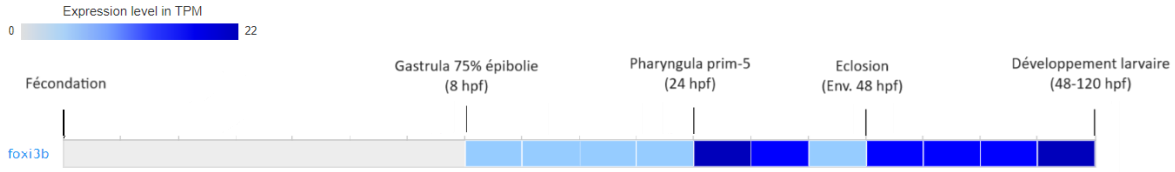


Figure 33 : *Atlas d'expression du gène foxi3b chez D. rerio. Une coloration plus foncée indique une expression plus forte. TPM : transcrits par minute. Figure tirée de zfin.org ; données issues de (White et al., 2017)*

6. Édition du gène *krt8*

krt8 est un gène de 4663 paires de bases, pour une portion codante de 1560 paires de bases. Il code la protéine Krt8 impliquée dans la structuration de l'épiderme par l'organisation des cytokératines. Le gène *krt8* présente chez le poisson zèbre un grand nombre d'homologues appartenant à la famille *krt*, et susceptibles d'assurer un maintien de fonction en cas de perturbation de Krt8. *krt8* est également exprimé de manière intense dès 8-9 hpf et ce dans un grand nombre d'organes d'intérêt (système cardiovasculaire, système nerveux, peau, reins, branchies, nageoires) (**Figure 34** ; **Figure 35**).

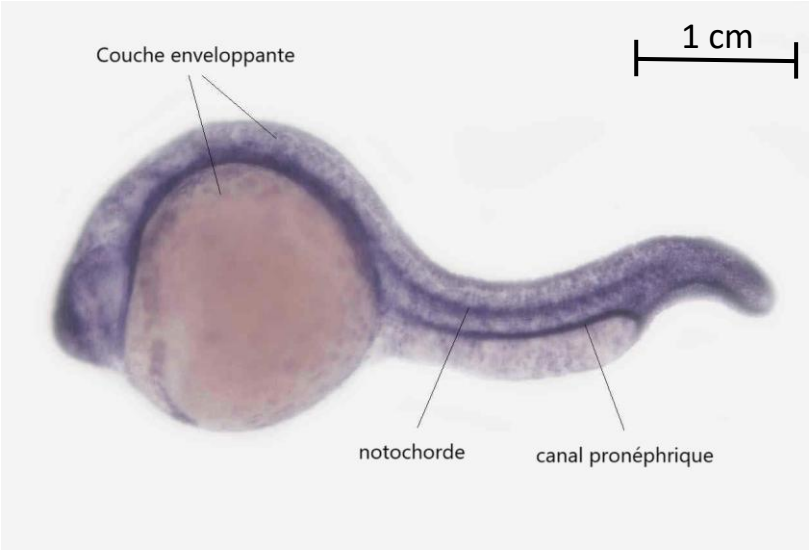


Figure 34 : *Expression du gène krt8 chez une larve de D. rerio à 20-24 hpf. La pigmentation indique l'expression du gène. Figure tirée de (Thisse et al., 2001).*

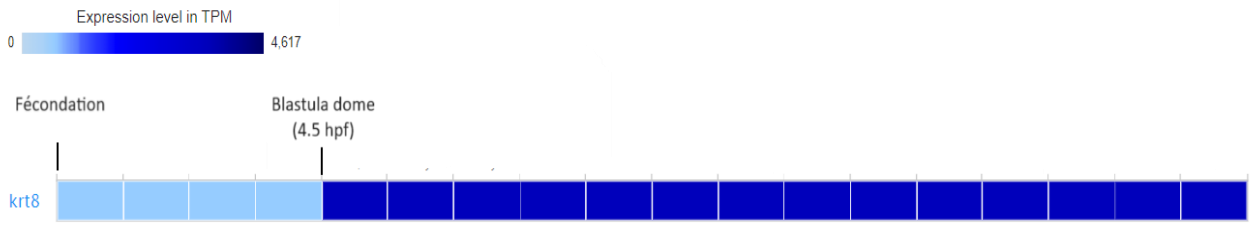


Figure 35 : *Atlas d'expression du gène krt8 chez D. rerio. Une coloration plus foncée indique une expression plus forte. TPM : transcrits par minute. Figure tirée de zfin.org ; données issues de (White et al., 2017).*

Pour l'édition de *krt8*, deux sites PAM (GGG et TGG) situés à proximité l'un de l'autre ont été ciblés. Deux ARNgs ont été testés pour chacun d'entre eux, avec un taux de coupure maximal de 82 % et 80 % pour chacun des PAMs respectivement. Afin de tester l'insertion du gène codant le biosenseur SF1 dans *krt8*, un ADN donneur a été conçu. Ce dernier présente une structure similaire à l'ADN donneur utilisé pour l'édition de *atp1b1b*, à la différence qu'il contient une séquence de clivage P2A au lieu de T2A (séquences et efficacités de coupure différentes) et que le gène *krt8* se retrouve en amont du gène du biosenseur. De la même manière que pour le donneur *atp1b1b-SF1*, l'ADN a été synthétisé de manière commerciale en deux fragments puis a été assemblé par nos soins. Le donneur *krt8-SF1* a été utilisé pour plusieurs tentatives d'édition du gène *krt8*, qui ont consisté en l'injection de 2593 œufs au travers de plusieurs séries de manipulations. La mortalité observée était de 14 % à 24 hpf et de 20 % à 120 hpf, avec 4 % des individus viables présentant des malformations à 120 hpf. Malgré un taux de survie satisfaisant, ces manipulations n'ont pas permis d'obtenir des individus positifs à l'insertion du gène codant SF1 dans *krt8*.

Les travaux d'édition de *krt8* sont en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit. Ces derniers ciblent un nouveau site PAM, utilisent des ARNgs plus performants et une séquence de donneur plus courte.

Conclusions / Discussion

Dans le but d'étudier la faisabilité de l'insertion du gène codant le biosenseur SF1 dans une de ces cibles, nous avons dans un premier temps inséré le gène codant une protéine fluorescente utilisée comme contrôle, la mCherry. L'observation en microscopie des individus édités a permis d'observer la fluorescence de la mCherry lorsqu'insérée dans *atp1b1b*, suggérant la possibilité d'insérer le biosenseur SF1 dans ce même gène. L'insertion du gène codant le biosenseur SF1 dans *atp1b1b* a conduit à la production d'individus ne survivant que jusqu'à 24 hpf. Ce délai correspond au début d'une phase d'expression forte de *atp1b1b*, et suggère que l'insertion du gène codant le biosenseur SF1 perturbe l'expression du gène endogène. Afin de d'améliorer l'expression du gène endogène, nous avons effectué deux modifications de la construction génétique utilisée pour l'insertion du gène codant le biosenseur SF1 dans *atp1b1b*, consistant en la délétion d'un codon proline en amont du gène codant le biosenseur, et en l'ajout de deux codons méthionine et proline en aval de ce dernier. Ces modifications ont permis d'augmenter la survie des larves de 24 hpf jusqu'à 48 hpf, mais aucun individu positif à l'insertion n'était viable passé ce délai. Les hypothèses formulées pour expliquer cet effet, sont d'une part, un défaut de coupure par le peptide T2A conduisant à la production d'une protéine de fusion de type SF1-protéine endogène qui perturberait la fonction de la protéine endogène. D'autre part, la perturbation de l'expression du gène endogène *atp1b1b*, du fait de la taille du gène inséré conduisant à une quantité de protéine endogène insuffisante au développement des individus.

De la même façon nous faisons l'hypothèse d'une perturbation de l'expression du gène *foxi3b* pour expliquer l'absence d'individus positifs à l'insertion viables, suite à l'édition de *foxi3b*. Ces résultats nous ont incité à cibler des gènes moins impliqués dans le développement des individus. Nous avons par conséquent choisi de nous tourner vers une autre cible d'édition, le gène *krt8*. Ce gène tout comme *atp1b1b* et *foxi3b* est exprimé de manière forte et précoce. Cependant, plusieurs homologues de ce gène sont présents dans le génome de *D. rerio* susceptibles d'assurer le maintien de la fonction biologique de Krt8 dans le cas où l'édition perturberait l'expression de ce dernier. De plus, nous avons supposé que la pigmentation des cellules est une fonction biologique moins cruciale que l'homéostasie du sodium et du potassium. Le faible taux de mortalité observé au cours des expériences d'édition est en accord avec cette hypothèse. Cependant, l'absence d'individus positifs indique qu'il faut sans doute améliorer la stratégie d'insertion du gène cible à cette position.

L'obtention d'individus positifs et viables jusqu'à 48 hpf dans le cas de l'édition de *atp1b1b* indique que l'insertion d'un gène de grande taille tel que celui codant le biosenseur SF1 est possible. En revanche, cette même insertion semble perturber fortement l'expression du gène endogène ciblé. De plus, nos critères de sélection de cibles d'insertion impliquent un gène endogène présentant une expression forte et précoce. Les gènes endogènes remplissant ces critères ont de fortes chances d'être fortement impliqués voire cruciaux au développement des individus. Par conséquent, la perturbation de l'expression de ces gènes a de fortes chances d'être impactante, voire létale aux individus transformés.

Afin de contourner cette difficulté, plusieurs options sont envisageables :

- La recherche d'une nouvelle cible d'édition consisterait en l'approche la plus aisée à mettre en place. De nombreux gènes remplissant nos critères existent chez *D. rerio*, dont certains ont déjà été identifiés, comme les gènes des familles *col*, *mitf* et *anx*, impliqués respectivement dans la formation du collagène, dans la structuration des mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation), et dans la régulation d'une phospholipidase.

- La famille des peptides de clivage 2A est composée deux plusieurs séquences alternatives à T2A, telles que P2A, E2A ou F2A. Il est envisageable de construire des ADNs donneurs utilisant ces différents peptides afin de comparer leur efficacité de clivage et d'améliorer l'expression des protéines endogènes ainsi que celle du biosenseur SF1.

- D'autres techniques de modification du génome existent et ont montré leur efficacité dans la création de lignées transgéniques de *D. rerio*. On peut par exemple citer les techniques Tol2 ou I-SceI. Ces techniques consistent cependant en une insertion du gène d'intérêt dans une ou plusieurs positions aléatoires du génome des individus. Si elles augmentent les chances d'une insertion réussie et d'obtenir des individus positifs viables, elles impliquent également des étapes supplémentaires de sélection des individus avant d'obtenir une lignée homozygote possédant une copie unique du gène d'intérêt dans le génome. Ces techniques pourront être considérées dans le cas où l'utilisation de CRISPR-Cas9 se montrerait incompatible avec nos travaux.

- De nombreuses lignées de *D. rerio* existent et sont accessibles au grand public. Ces dernières possèdent des caractéristiques pouvant se montrer intéressantes pour nos travaux, telles que l'albinisme ou la transparence des individus (lignées *albino*, *roy* ou *casper*). L'albinisme et la transparence pourraient faciliter l'observation de la fluorescence notamment dans les organes internes, donnant accès à de nouvelles cibles d'insertion potentielles. L'utilisation de lignées non pigmentées pourrait également permettre de travailler sur des larves plus âgées. Il serait ainsi possible d'élargir notre recherche de cibles d'insertion à des gènes d'expression plus tardive. En fonction du délai d'expression post-fécondation ciblé, une révision du dossier d'autorisation soumis au comité d'éthique serait cependant à envisager.

- La technique CRISPR-PASTE est une variante de CRISPR-Cas9 qui permet l'insertion dans le génome de larges constructions génétiques, jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de paires de bases (Yarnall et al., 2023). L'utilisation d'une telle technique permet d'augmenter le taux de succès de l'insertion, et donc le nombre d'individus positifs pour un nombre d'injection donné et augmentant les chances d'obtention de transformants non létaux. L'avantage principal de cette technique reste sa capacité à insérer dans le génome une construction génétique constituée d'un gène d'intérêt associé à un promoteur constitutif. L'insertion dans le génome d'une telle construction permettrait de cibler des positions nettement moins impactantes dans le développement des larves, telles que des portions non codantes du génome. Il est ainsi possible de contrôler l'expression du gène d'intérêt en temps et en localisation tout en s'assurant de ne perturber aucun gène endogène impliqué dans le développement des individus.

Chapitre II : Expression du biosenseur d'uranyle dans la membrane externe d'*E. coli*

1. Contexte

Le second axe de travail de ce projet vise à améliorer le biosenseur SF1, et plus précisément son affinité pour l'uranyle. Le site I de fixation de métal de la CaM a déjà été modifié dans le cadre de la thèse de R. Pardoux par la délétion des résidus en position 2 et 3 de la boucle de fixation, ce qui a permis d'augmenter l'affinité de ce variant pour l'uranyle d'un facteur 150. Le site II quant à lui reste nettement moins affin pour l'uranyle par comparaison au site I. Il est par conséquent susceptible d'être amélioré de manière significative. Nous avons choisi dans le cadre de cette thèse d'améliorer le biosenseur SF1 par criblage d'une banque de mutants du site II de la $CaM\Delta_{I-II}$.

Le choix d'une méthode de criblage détermine le nombre de mutants qu'il est possible de cribler, et par conséquent la taille de la banque à concevoir. Ainsi, il est nécessaire de mettre au point une méthode permettant le criblage d'un grand nombre de mutants, donnant ainsi accès à la création d'une banque plus large et augmentant nos chances d'identifier un mutant plus affin.

Le biosenseur SF1 possède un signal de transduction de nature optique, suggérant la possibilité d'un criblage direct de cultures de bactéries exprimant des mutants du biosenseur SF1. Le criblage sur cultures de bactéries est une approche offrant l'avantage d'un traitement réduit des échantillons à cribler par comparaison au criblage sur des protéines purifiées. Cette caractéristique augmente drastiquement le débit de criblage et permet la création et le criblage d'une banque plus large. De plus, cette méthode douce et rapide est plus adaptée pour travailler avec SF1 qui est une protéine plus fragile. En contrepartie de ces avantages expérimentaux, le criblage sur cultures de bactéries implique différents aspects techniques qui doivent être étudiés pour évaluer sa faisabilité :

- Le biosenseur SF1 présente un signal de fluorescence basal en l'absence de métaux. Il est nécessaire pour la mise en place d'un protocole de criblage de pouvoir observer ce signal dans un contexte cellulaire. Ce signal doit être intense et sans ambiguïté pour assurer un criblage fiable.

- D'un point de vue cellulaire/moléculaire, l'uranyle doit pouvoir entrer dans les cellules pour se retrouver en contact et interagir avec le biosenseur. Pour cela, il est nécessaire que la spéciation du métal soit maintenue, permettant une présence majoritaire d'uranyle sous forme libre UO_2^{2+} (pH<6). Les cellules utilisées doivent par conséquent pouvoir être cultivées et manipulées dans des conditions permettant une telle spéciation.

- La réponse du biosenseur à l'uranyle *in vivo* doit être quantifiable et reproductible. Si les interactions du biosenseur *in vitro* ont été étudiées, elles restent peu connues en milieu cellulaire.

2. Exposition de cellules exprimant le biosenseur SF1 à l'uranyle dans le cytoplasme

Nous avons dans un premier temps choisi de travailler avec des lignées de cellules d'*E. coli* M15REP4 exprimant le biosenseur SF1 dans leur cytoplasme, et qui sont utilisées par l'IPM pour la surexpression de la protéine. Afin de vérifier l'observation d'un signal du biosenseur SF1 clair et sans ambiguïté, des cultures liquides de cellules exprimant le biosenseur SF1 ont été analysées par fluorescence en plaque. Ces manipulations ont permis d'observer un signal fort et présentant peu de variabilité au travers des échantillons analysés. Le profil de fluorescence du biosenseur SF1 au sein du cytoplasme est similaire à celui émis par le biosenseur SF1 purifié (**Figure 36**).

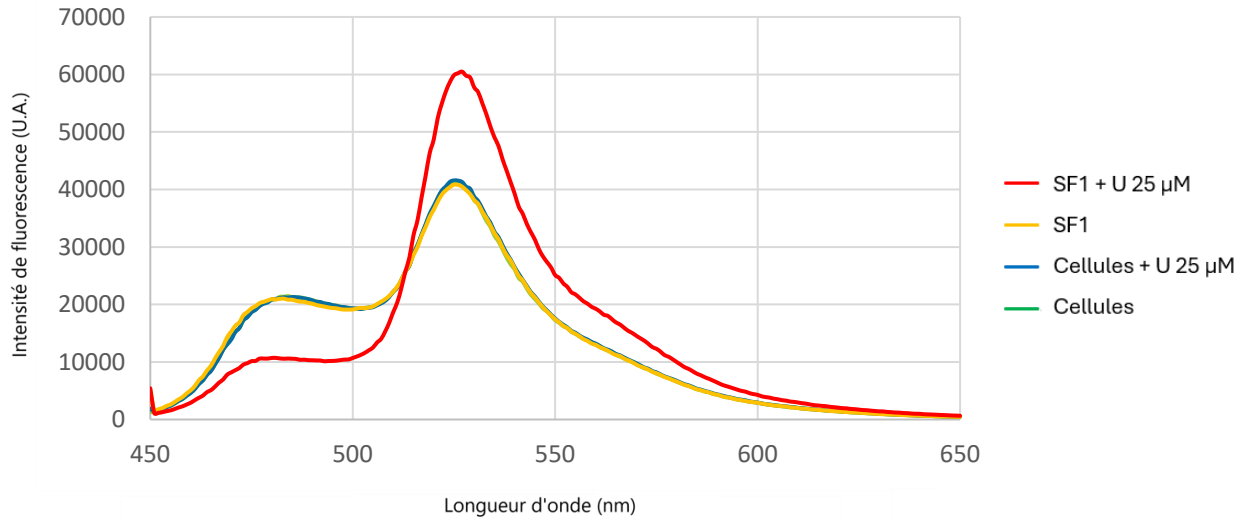


Figure 36 : *Profils de fluorescence des cellules d'E. coli exprimant le biosenseur SF1 dans leur cytoplasme et du biosenseur SF1 purifié en présence et absence de 25 µM d'uranyle.*

La capacité à cultiver des cellules d'*E. coli* dans des conditions permettant la spéciation de l'uranyle sous forme UO_2^{2+} majoritaire a été démontrée par des travaux réalisés précédemment à l'IPM (Khemiri et al., 2014). Ces travaux ont visé à effectuer la préculture de cellules d'*E. coli* en milieu LB liquide à pH 5,5 suivie de leur culture dans un milieu liquide LB dilué par 10, supplémenté à 0,4 % en glucose et tamponné par pH 2,7. L'exposition de ces cellules à des concentrations en nitrate d'uranyle de 50-80 µM a permis d'observer une réponse métabolique des cellules et démontre que l'uranyle libre UO_2^{2+} est capable de pénétrer dans les cellules d'*E. coli* dans le cas d'une culture à pH acide.

En nous appuyant sur ces observations, nous avons testé différentes conditions de culture d'*E. coli* M15REP4 exprimant le biosenseur SF1. Plusieurs milieux de culture ont été testés : LB, LB dilué par 10, LB supplémenté en glucose et MJS (milieu pauvre en ions phosphate). Ces milieux ont été utilisés à pH standard et acide (respectivement 7,0 et 4,5 pour le milieu LB ; 7,1 et 5,4 pour le milieu MJS), à 37°C pour la phase de croissance et à 25°C après induction. L'utilisation de différents pH permet de comparer la croissance des cellules à pH standard et acide. Le milieu MJS n'est pas utilisé à pH 4,5 car nous avons supposé qu'un tel pH associé à un milieu pauvre serait trop impactant pour la croissance des cellules cultivées. Cette dernière a été étudiée au travers des différentes conditions testées (**Figure 37**). Ces manipulations ont permis d'observer une croissance satisfaisante des cellules pour tous les milieux testés à l'exception du milieu LB dilué par 10, qui a par conséquent été écarté.

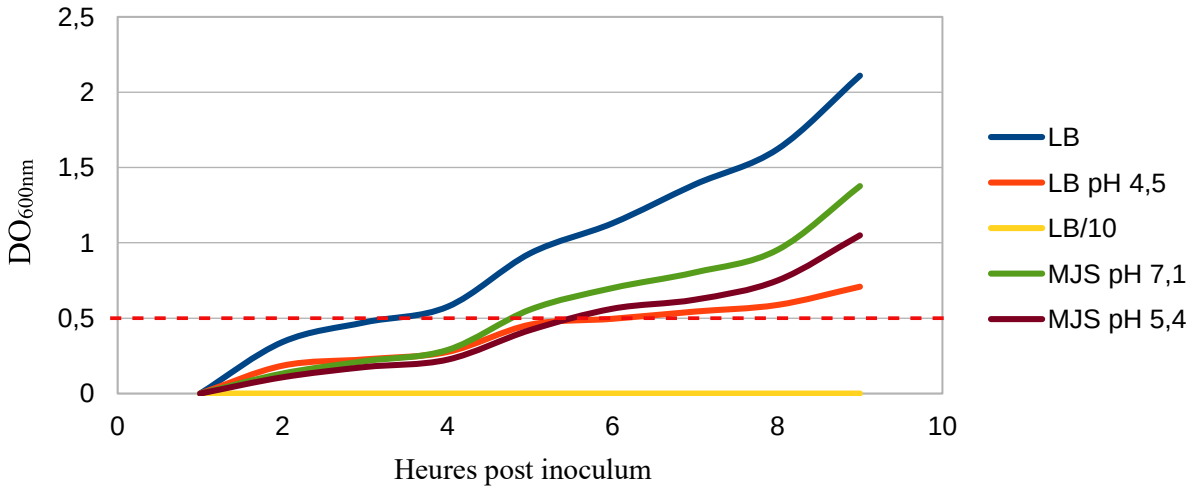


Figure 37 : *Courbes de croissance de cellules d'E. coli exprimant le biosenseur SF1 dans différents milieux. Les cellules sont induites à* DO_{600nm} *= 0,5 (ligne pointillée).*

Le biosenseur SF1 est une protéine dont la production se fait en partie sous forme de corps d'inclusion insolubles, dont la proportion augmente avec la température. Ainsi différentes températures de culture (17°C, 25°C et 37°C) après induction ont été étudiées pour chacun des milieux retenus. La manipulation d'uranyle doit être effectuée dans une pièce (SALTO) et en utilisant des équipements dédiés à l'utilisation de radionucléides. Les incubateurs utilisés pour la culture des cellules et pour leur mise en contact avec l'uranyle ne disposent pas d'une fonction de refroidissement et imposent un travail à température ambiante ou supérieure. Ainsi les travaux suivants ont été réalisés exclusivement au moyen de milieux LB pH 4,5 et MJS pH 5,4 et en appliquant une température de croissance de 25°C après induction.

Ces conditions déterminées, nous avons réalisé différentes expositions des cellules d'*E. coli* exprimant le biosenseur SF1 à l'uranyle en faisant varier les concentrations d'uranyle (25 µM, 50 µM) et les durées d'exposition (2 h, 6 h, 12 h). Afin de tenir compte de l'adaptation des cellules à la présence d'uranyle et de caractériser l'impact de l'induction de la protéine sur l'internalisation de l'uranyle au sein des cellules, nous avons effectué l'ajout d'uranyle soit en début de croissance (DO_{600nm} = 0,1), soit au moment de l'induction (DO_{600nm} = 0,5), soit quelques temps après l'induction (DO_{600nm} = 1,0). Les cellules exposées à l'uranium ont été analysées par fluorescence en plaque. Les profils de fluorescence produits par les cellules exposées à l'uranyle ont ensuite été comparés à celui produit par des cellules non exposées à l'uranyle, mais également aux profils de fluorescence du biosenseur *in vitro*, avec et sans uranyle. Ces manipulations ont permis d'identifier un signal basal (en absence d'uranyle) de la fluorescence du biosenseur en absence d'uranyle au travers d'une large gamme de conditions de culture. Ce signal basal est similaire voire identique à celui du biosenseur purifié, un aspect clef dans l'interprétation de résultats de criblage (**Figure 36**). En revanche, aucune des conditions explorées par cette série de tests a permis l'observation d'une variation du signal de fluorescence témoignant d'une fixation de l'uranyle par le biosenseur SF1 *in vivo*.

3. Choix d'un système d'expression alternatif

Le contexte cellulaire intrinsèque aux manipulations réalisées jusqu'à présent témoigne d'une incompatibilité de l'expression cytoplasmique du biosenseur SF1 chez *E. coli* avec l'observation d'une réponse de la protéine *in vivo* à une concentration d'uranyle dans le milieu. Ce phénomène peut être lié à différents aspects du fonctionnement cellulaire et du milieu :

- L'uranyle peut être chélaté par de nombreuses protéines bactériennes ainsi que par de nombreux composés intra- et extracellulaires avant de pouvoir accéder au biosenseur SF1. La fraction d'uranyle sous forme UO_2^{2+} est alors fortement réduite voire nulle.

- La spéciation de l'U (VI) peut être influencée à la fois par les milieux de culture et par les bactéries cultivées. Ainsi même dans le cas où l'uranyle peut pénétrer dans les cellules, il est possible que ce dernier soit retrouvé sous des formes ne pouvant pas interagir avec le biosenseur SF1.

- Le cytoplasme est un compartiment cellulaire riche en cations, dont le calcium. Il est possible que ces cations interagissent avec le biosenseur SF1 et empêchent la fixation de l'uranyle.

- Il est possible que le biosenseur soit incapable de changer de conformation dans un contexte *in vivo*. Ainsi l'interaction de la protéine avec l'uranyle ne permettrait pas d'observer une variation de FRET.

Ces hypothèses nous ont amené à conclure que notre approche était incompatible avec l'objectif de criblage envisagé. Les difficultés rencontrées étant principalement liées au contexte cellulaire intrinsèque à la manipulation réalisée, nous avons choisi de nous intéresser à des approches permettant de nous en affranchir. Nous avons donc décidé de travailler avec un système permettant l'expression du biosenseur dans la membrane externe d'*E. coli*, afin que ce dernier soit en contact direct avec le milieu.

L'expression de protéines dans la membrane d'*E. coli* est une technique couramment utilisée pour une large gamme d'applications, et notamment pour le développement de biosenseurs (M. Park, 2020). Elle offre divers avantages, en particulier dans le cas de protéines ayant pour but d'interagir avec des composés incapables de pénétrer dans les cellules. De nombreux systèmes sont décrits dans la littérature, la plupart basés sur l'utilisation de protéines de fusion (Lee et al., 2003 ; Van Bloois et al., 2011). Ces derniers s'appuient sur l'expression d'un gène constitué de la séquence codant la protéine d'intérêt associée à celle codant une protéine de fusion, toutes deux parfois séparées par un espaceur. L'utilisation de protéines de fusion est courante dans la littérature, et permet notamment l'expression de protéines récalcitrantes, peu solubles ou difficiles à purifier. Les protéines de fusion utilisées sont des protéines connues et permettant par exemple une meilleure solubilité ou le repliement correct de la protéine d'intérêt (Bell et al., 2013). Par ailleurs, l'utilisation de protéines possédant une séquence d'adressage permettant de forcer la migration de la protéine d'intérêt vers une localisation cellulaire souhaitée. La traduction des deux protéines est ici effectuée simultanément. Les limitations principales imposées par ce type de systèmes sont liées aux propriétés de la protéine à exprimer. En effet, des protéines présentant une masse élevée, une conformation particulière ou une activité catalytique sensible peuvent se montrer incompatibles avec ce type d'expression (Van Bloois et al., 2011). L'utilisation d'un système inadapté peut conduire à une traduction partielle ou à un mauvais repliement de la protéine d'intérêt, voire à la non migration du complexe protéique traduit. Afin d'identifier un système d'expression membranaire compatible avec les travaux envisagés, nous avons réalisé une étude bibliographique de nombreux systèmes d'expression membranaire de protéine décrits dans la littérature et nous avons comparé à la fois la taille maximale des protéines

d'intérêt exprimées, mais également leur nature (protéines de structure particulière, enzymes). Parmi les différents systèmes étudiés, nous avons pu identifier le système SpyCatcher/SpyTag (SC/ST). Ce dernier est basé sur l'utilisation de fragments peptidiques inspirés du domaine CnaB2 (immunoglobulin-like collagen adhesin domain) de la protéine FbaB (Fibronectin-Binding Protein F2) de la bactérie à gram positif *Streptococcus pyogenes* (Amelung et al., 2011). Le domaine CnaB2 est naturellement assemblé par l'interaction de deux sous-unités, et plus précisément par la formation d'une liaison peptidique covalente spontanée à la fois *in vitro* et *in vivo* (**Figure 38**). Cette liaison est spécifique, et se forme dans une large gamme de conditions physico-chimiques. Une fois formée, elle permet au domaine CnaB2 de maintenir sa conformation en présence de forts stress mécaniques et physico-chimiques (jusqu'à pH 2 et 100°C ; Zakeri et al., 2012).

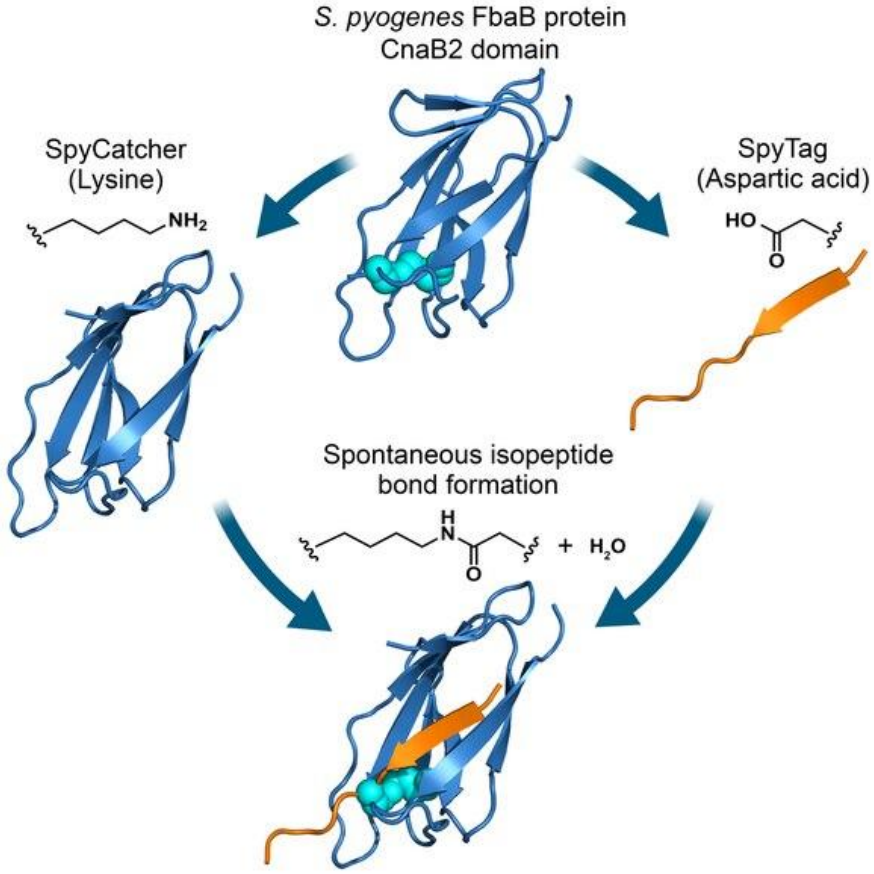


Figure 38 : *Principe de l'assemblage des sous unités du domaine CnaB2 de la protéine FbaB de S. pyogenes.*

L'ingénierie des fragments impliqués dans la formation de cette liaison covalente a permis de mettre au point deux fragments, d'une part une unité protéique (SpyCatcher ; SC ; 138 acides aminés ; 15 kDa) et d'autre part son complément peptidique (SpyTag ; ST ; 13 acides aminés ; 1,5 kDa). L'interaction entre ces deux entités conduit à la formation rapide, à haut rendement et dans une large gamme de conditions d'une liaison covalente (Gad & Ayakar, 2021). Comme pour le domaine CnaB2, la liaison formée est stable à la fois *in vitro* et *in vivo* et même avec d'importants stress physiques (pH, température, stress mécanique) (Reddington & Howarth, 2015).

Les fragments SC et ST peuvent être combinés respectivement à une protéine de transport (dite carrier) et à une protéine d'intérêt pour former un système de fusion de protéine. Le fragment SC est le plus souvent associé à la protéine carrier en raison de sa taille nettement plus élevée par comparaison au fragment ST. De par le mécanisme d'interaction des fragments SC et ST, le système de fusion est ici qualifié de « post-traductionnel », à savoir que les entités carrier-SC et protéine-ST sont traduites indépendamment, et l'assemblage du complexe carrier/protéine s'effectue dans le cytoplasme. Ce complexe est ensuite capable de migrer au sein de la cellule selon la localisation du carrier (**Figure 39**).

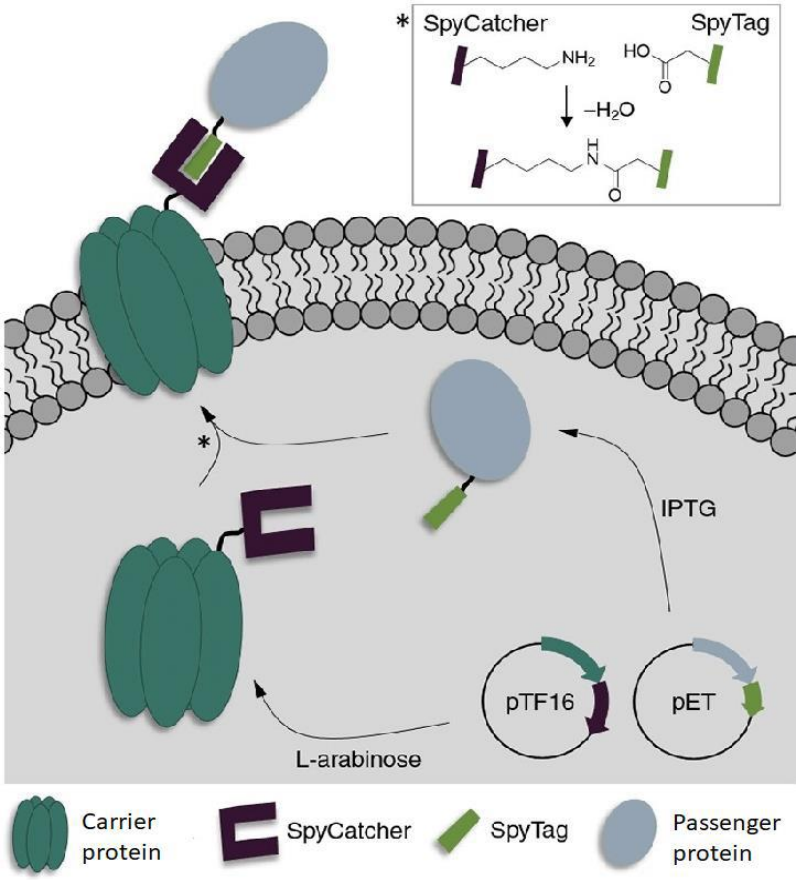


Figure 39 : *Principe d'expression de protéines dans la membrane externe d'E. coli au moyen du système SpyCatcher/SpyTag. pTF16 : vecteur d'expression de la protéine carrier, pET : vecteur d'expression de la protéine d'intérêt. Le L-arabinose permet d'induire la production de la protéine carrier et l'IPTG celle de la protéine d'intérêt. Figure tirée de (Gallus et al., 2022)*

La littérature décrit de nombreux exemples de l'application du système SC/ST pour l'expression membranaire d'une large diversité de protéines de grande taille, ou à la fonction sensible telle que des enzymes (Gallus et al., 2020 ; Peschke et al., 2017). La fonctionnalité de ce système a été démontrée chez *E. coli*, mais également chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Kajiwara et al., 2021 ; Yi et al., 2022). Plusieurs carriers aux performances variables sont également décrits (Gallus et al., 2022), suggérant une forte adaptabilité du système en fonction des travaux envisagés. Pour ces différentes raisons, nous avons choisi d'utiliser le système SC/ST pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*.

4. Développement de souches bactériennes exprimant le système SpyCatcher/SpyTag

Nous avons choisi dans le cadre de ce projet d'utiliser trois protéines carrier distinctes (**Figure 40**) :

- AIDA-I (48,2 kDa), un facteur de virulence retrouvé chez *E. coli* et responsable de son ancrage à des cellules humaines et impliqué dans la formation de biofilms (Maurer et al., 1997)

- Lpp-OmpA (respectivement 2,9 kDa et 12,9 kDa ; Lpp-OmpA = 15,8 kDa), une fusion entre une protéine membranaire impliquée dans la structuration et la fonctionnalisation de la membrane externe et une lipoprotéine (Nicchi et al., 2021)

- PgsA (42,8 kDa), responsable d'une étape de biocatalyse dans la biosynthèse de phospholipides

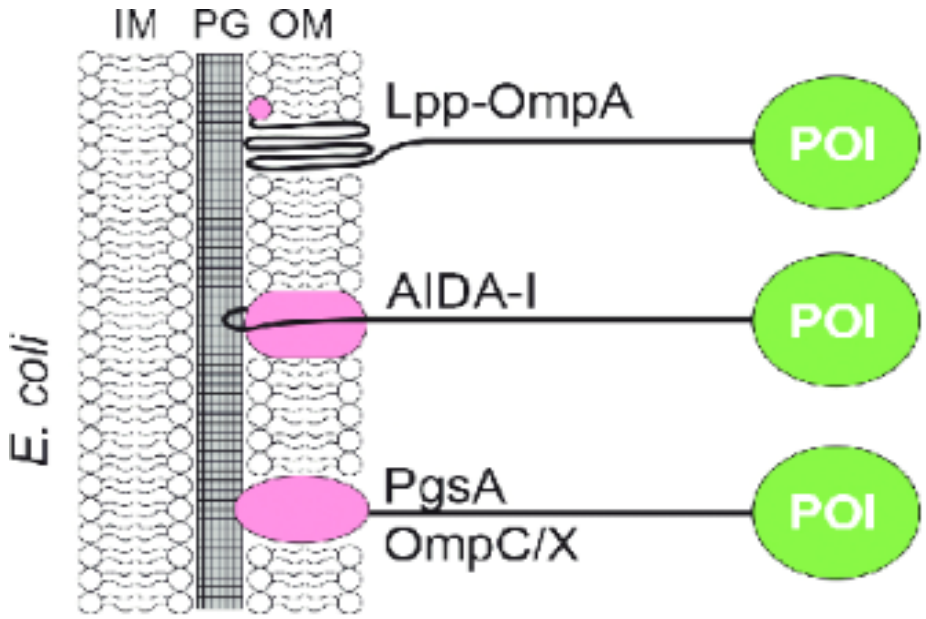


Figure 40 : *Utilisation des protéines Lpp-OmpA, AIDA-I et PgsA pour l'expression membranaire d'une protéine d'intérêt. IM : membrane interne, PG : peptidoglycane, OM : membrane externe, POI : protéine d'intérêt. Figure tirée de (Huang & Clubb, 2017)*

AIDA-I et PgsA sont naturellement retrouvées chez *E. coli*, et Lpp-OmpA est une fusion entre deux protéines d'*E. coli*. Les complexes SC-AIDA-I, Lpp-OmpA-SC et PgsA-SC sont décrits dans la littérature (Gallus et al., 2020, 2022) et ont pu montrer des performances différentes, telles que la taille maximale de la protéine d'intérêt tolérée, ou encore leur impact sur l'intégrité des membranes et sur la viabilité des cellules les exprimant. Les constructions permettant l'expression des complexes carrier-SC ont été gracieusement fournies par le Dr. K.S. Rabe (Karlsruhe Institute of Technology) et son équipe sous la forme de plasmides d'expression pTF-16 portant une résistance au chloramphénicol et inductibles au L-arabinose (**Figure 41**).

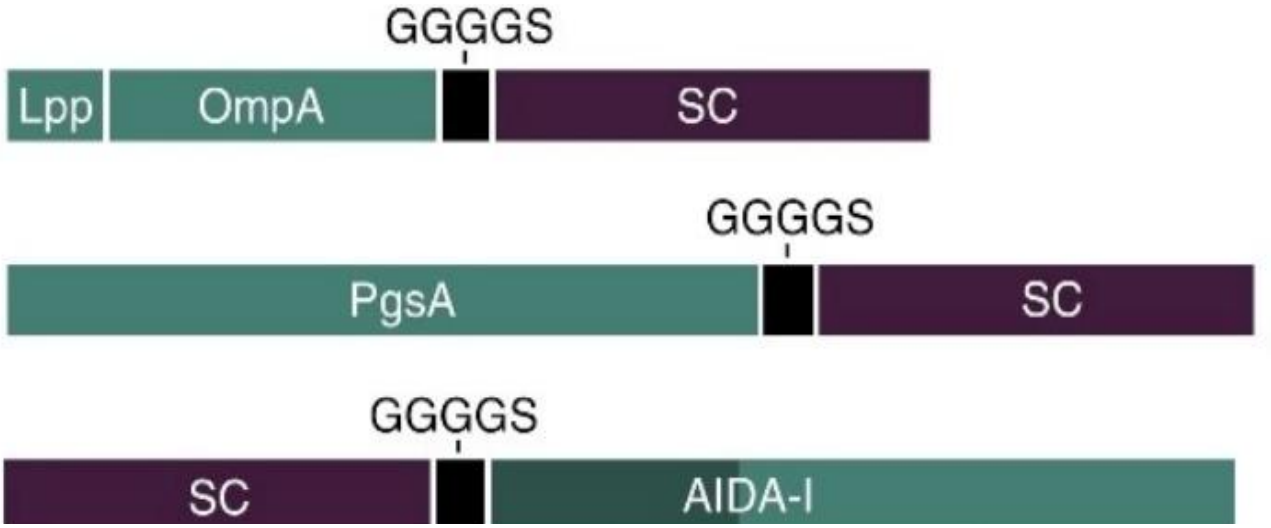


Figure 41 : *Représentation schématique des constructions génétiques des protéines carrier utilisées pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'E. coli liées à leur étiquette SC par un espaceur (GGGGS). Constructions gracieusement fournies par K.S. Rabe et S. Gallus. Figure tirée de (Gallus et al., 2022)*

Le fragment ST a été synthétisé par Eurofins Genomics. Le fragment SF1 est celui couramment utilisé par l'IPM pour la surexpression du biosenseur. Le complexe SF1-ST (1692 bp) a été obtenu par assemblage des fragments SF1 et ST par PCR (**Figure 42**). Pour ce faire, les fragments SF1 et ST ont dans un premier temps été amplifiés séparément par des amorces permettant l'insertion de brins d'homologie aux extrémités de chacun des fragments, ainsi que l'élimination du codon stop en fin de séquence du fragment codant SF1. Les ADNs obtenus après amplification possèdent ainsi chacun un brin d'homologie correspondant à leur complémentaire (SF1 possède un brin homologue à ST et ST possède un brin homologue à SF1), ainsi qu'un brin complémentaire au vecteur de clonage visé. L'amplification simultanée de ces ADNs au moyen des amorces externes a permis l'obtention d'un fragment SF1-ST entouré de brins homologues au vecteur d'expression.

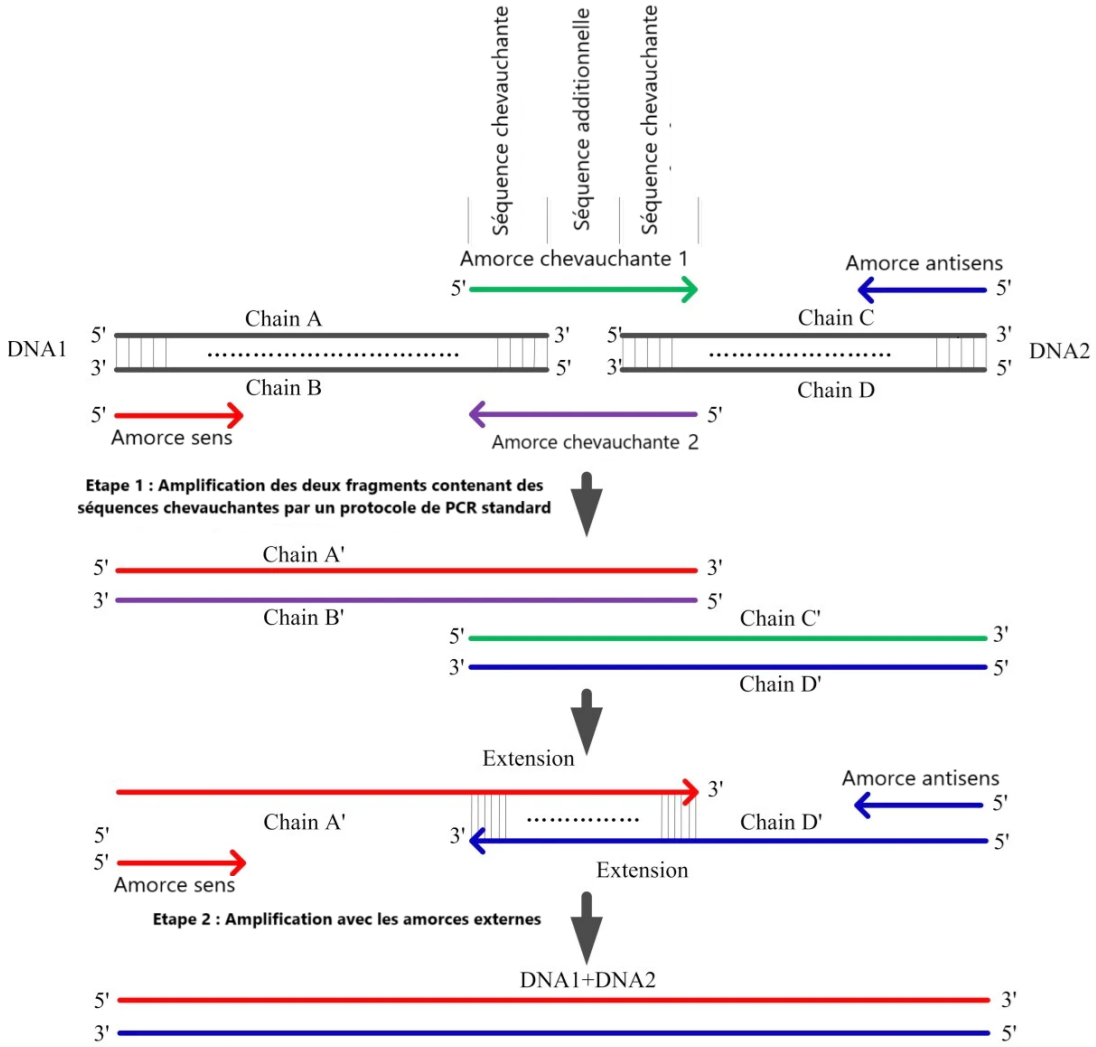


Figure 42 : *Principe de l'assemblage de fragments d'ADN double brin par PCR.*

Le vecteur d'expression utilisé pour le clonage du fragment SF1-ST doit remplir plusieurs critères. Premièrement, son origine de réplication doit être différente de celle présente dans le vecteur pTF-16 afin d'assurer la réplication des deux plasmides au sein de la cellule. Ensuite, il doit offrir une résistance à un antibiotique différente de celle du vecteur pTF-16 afin d'assurer une pression de sélection et la conservation des deux plasmides dans les cellules.

Finalement, le vecteur portant le complexe SF1-ST doit être inductible par un composé chimique différent de l'arabinose, qui permet d'induire l'expression des complexes carrier-SC portés par le vecteur pTF-16. En tenant compte de ces critères, nous avons choisi de cloner le complexe SF1-ST dans le vecteur pET-28a, qui porte une résistance à la kanamycine et est inductible à l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Grâce à l'introduction de brins d'homologie aux extrémités du fragment SF1-ST, ce dernier a pu être cloné facilement dans un vecteur pET-28a linéarisé au moyen de la technique In-Fusion (Takara bio). Le produit de clonage pET-28a-SF1-ST a été utilisé pour la suite des manipulations.

Nous avons choisi d'utiliser ces constructions pour transformer des cellules d'*E. coli* BL21(DE3) adaptées à la surexpression de protéines. Cette lignée est compatible avec les vecteurs pTF-16 et pET-28a, et a été utilisée dans les travaux sur lesquels nous nous appuyons. Les cellules ont été transformées par les deux constructions, et la présence des deux plasmides dans les

transformants obtenus a été confirmée par sélection sur LB agar contenant les antibiotiques propres à chaque plasmide, ainsi que par séquençage.

Ainsi 7 lignées de cellules ont été obtenues :
- BL21(DE3)-pTF16 (SC-AIDA-I), exprimant le carrier SC-AIDA-I
- BL21(DE3)-pTF16 (LppOmpA-SC), exprimant le carrier Lpp-OmpA-SC
- BL21(DE3)-pTF16 (PgsA-SC), exprimant le carrier PgsA-SC
- BL21(DE3)-pET-28a (SF1-ST), exprimant le biosenseur SF1
- BL21(DE3)-pTF16 (SC-AIDA-I ; pET28a-SF1-ST), exprimant le carrier SC-AIDA-I et le biosenseur SF1
- BL21(DE3)-pTF16 (LppOmpA-SC ; pET28a-SF1-ST), exprimant le carrier Lpp-OmpA-SC et le biosenseur SF1
- BL21(DE3)-pTF16 (PgsA-SC ; pET28a-SF1-ST), exprimant le carrier PgsA-SC et le biosenseur SF1.

5. Test d'expression et optimisation de la production des protéines seules et des complexes carrier-SF1

5.1. Carrier-SC et SF1-ST

Les cellules d'*E. coli* transformées avec les constructions pTF-16(carrier-SC) et pET-28a(SF1-ST) seules ont d'abord été utilisées pour vérifier la production des protéines souhaitées.

La mise en culture des cellules BL21(DE3)-pTF-16(carrier-SC) à 25°C dans les différents milieux cités précédemment suivie d'une induction par 0,1 mM d'arabinose a permis d'observer la formation des complexes SC-AIDA-I (environ 60 kDa) et LppOmpA-SC (environ 27 kDa). Le complexe PgsA-SC n'a pas pu être observé, conformément aux résultats obtenus dans les précédents travaux (Gallus et al., 2022). Il est à noter que deux produits de dégradation ont pu être observés pour le complexe LppOmpA-SC, correspondant aux masses des protéines Lpp et OmpA-SC seules (2,9 kDa et 25 kDa respectivement). Ces produits restent cependant minoritaires par comparaison à la protéine de fusion. De la même manière que pour PgsA-SC, ces résultats concordent avec la littérature. Nous avons également observé que les cellules exprimant la construction SC-AIDA-I présentent une meilleure croissance cellulaire ainsi qu'une production plus importante de la protéine, suggérant un meilleur candidat pour la suite des manipulations.

De la même manière, la culture dans les mêmes conditions que précédemment et l'induction avec 0,1 mM d'IPTG des cellules BL21-(DE3)-pET-28a(SF1-ST) a permis d'observer la production du complexe SF1-ST à la taille attendue. L'introduction de l'étiquette ST ne semble pas affecter l'expression du biosenseur SF1.

Différents milieux (LB, LB pH 4,5, MJS pH 7,1, MJS pH 5,4) et différentes températures d'induction (17°C, 25°C, 37°C) ont également été testés par cette première série de manipulations. Nous avons observé que le milieu MJS associé à des températures d'induction de 17°C ou 25°C permettait une meilleure croissance cellulaire ainsi qu'une production plus importante des protéines carrier-SC. La production du biosenseur SF1 sous forme soluble était également plus importante à une température d'induction de 17°C.

5.2. Carrier-SF1

La production des carriers-SC et de SF1-ST seuls validée, nous nous sommes intéressés à l'expression des complexes carrier-SF1. Pour ce faire, les lignées de cellules portant à la fois la construction pTF-16(carrier-SC) et pET-28a(SF1-ST) ont été cultivées dans différents milieux (LB, LB pH 4,5, MJS pH 7,1, MJS pH 5,4) et sous différentes températures d'induction (17°C, 25°C, 37°C). L'induction a été maintenue pour des durées allant de 6 h à 24 h. En plus de ces paramètres, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration de chaque inducteur (arabinose et IPTG) sur la croissance des cellules et sur la proportion des protéines produites (carrier-SC, SF1-ST et carrier-SF1). En effet, une induction trop forte à l'IPTG pourrait conduire à une surproduction de SF1-ST par rapport à carrier-SC, conduisant à une proportion de biosenseur incapable d'être transportée vers la membrane externe et donc localisée dans le cytoplasme. Cette fraction cytoplasmique du biosenseur SF1 influence le profil de fluorescence global des cellules et pourrait diminuer la réponse à l'uranyle perçue, elle doit donc être minimisée.

La double induction de ces mêmes protéines avec 0,1 mM d'arabinose et d'IPTG simultanément a permis d'observer la formation des complexes AIDA-I-SF1 (123 kDa) et PgsA-SF1 (117 kDa) souhaités (**Figure 43**). Le complexe Lpp-OmpA-SF1 (88 kDa) n'a pas été observé. De la même manière que pour la surexpression des protéines carrier-SC seules, nous avons observé une meilleure croissance et une meilleure production des protéines d'intérêt chez les cellules portant la construction SC-AIDA-I par rapport à LppOmpA-SC et PgsA-SC.

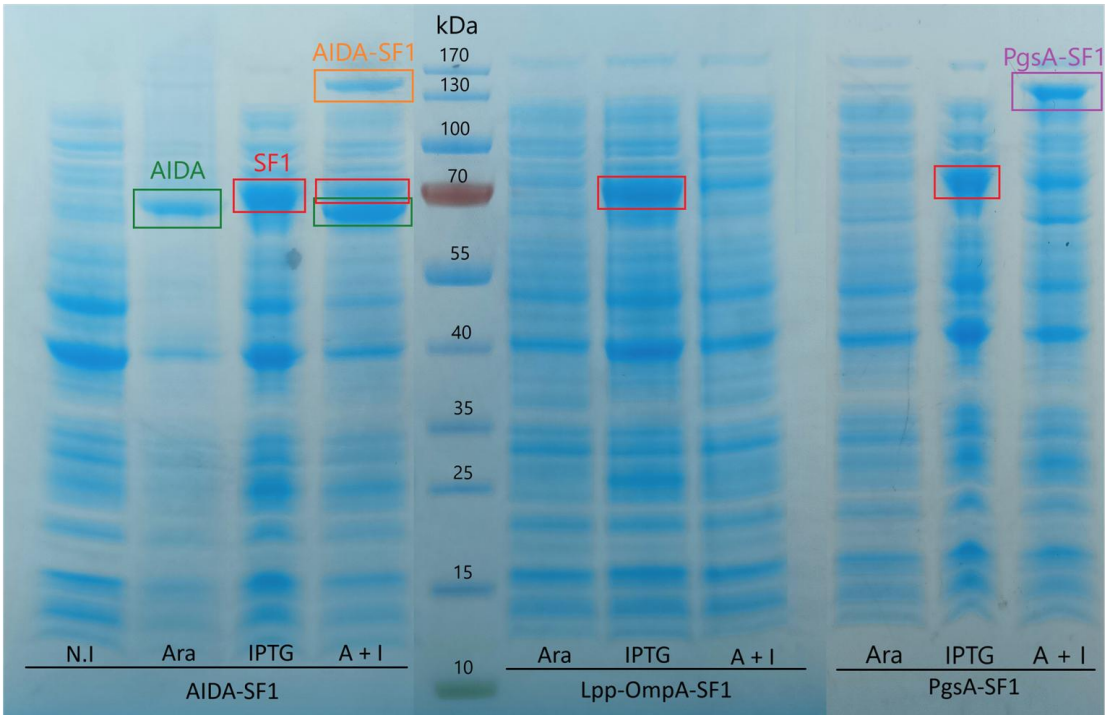


Figure 43 : *Tests d'expression des constructions carrier-SF1 dans E. coli BL21 (DE3). Ara : Induction à l'arabinose ; IPTG : induction à l'IPTG ; A+I : Induction à l'arabinose et à l'IPTG. M : marqueur de taille (les masses indiquées sont en kDa). En rouge le biosenseur SF1 seul, en vert le carrier AIDA seul. En orange et violet les complexes AIDA-SF1 et PgsA-SF1 respectivement. Les protéines Lpp-OmpA et PgsA seules n'ont pas pu être observées lors de ces tests.*

En effet, les cellules exprimant Lpp-OmpA-SF1 ont conduit à l'observation d'une croissance des cellules 5 et 3 fois plus faible par comparaison aux cellules exprimant AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1 respectivement. La production du complexe était par conséquent nettement réduite, et nous avons choisi d'abandonner l'utilisation de cette souche. Une induction à 0,1 mM d'arabinose et d'IPTG conduit cependant à la présence d'une fraction de la protéine SF1-ST non fusionnée au carrier-SC quelle que soit la durée d'induction.

L'analyse par fluorescence des cellules exprimant le complexe carrier-SF1 nous a permis d'étudier la nature du profil de fluorescence produit. Ce dernier est similaire à celui du biosenseur SF1 *in vitro* pour les cultures induites à 17°C ou 25°C (**Figure 44**), mais diffère par son ratio 525 nm / 476 nm basal. En revanche, une induction à 37°C ou en milieu LB standard conduit un profil de fluorescence différent de celui observé pour le biosenseur SF1 *in vitro*, avec un pic de fluorescence à 525 nm d'intensité plus faible que le pic à 476 nm. L'intensité relative des pics à 476 nm et 525 nm du profil de fluorescence du biosenseur est directement lié au degré de FRET entre les deux protéines fluorescentes. Ce dernier est influencé par la distance entre le donneur et l'accepteur de FRET, mais également par leur orientation respective. Un profil de fluorescence dégradé peut être synonyme d'une mauvaise expression du biosenseur SF1, ou d'un changement de conformation lié à sa localisation membranaire. De par ces résultats, nous avons effectué les manipulations suivantes en milieu MJS et LB pH 4,5 avec une induction à 17°C ou 25°C.

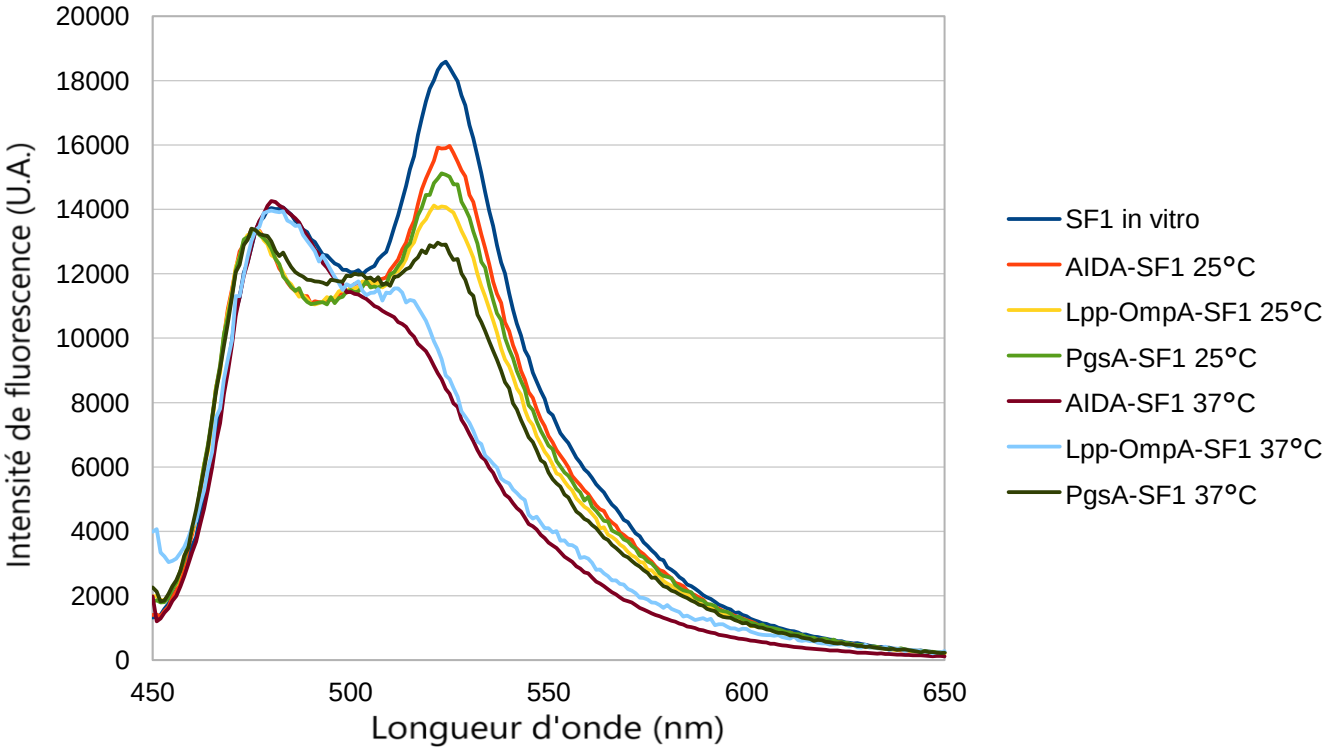


Figure 44 : *Profils de fluorescence du biosenseur SF1 in vitro et des cellules exprimant les complexes AIDA-I-SF1, Lpp-OmpA-SF1 et PgsA-SF1 cultivées à 25°C et 37°C. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

6. Localisation cellulaire des complexes carrier-SF1

Afin de préciser la localisation cellulaire des différentes protéines produites, nous avons procédé au fractionnement des cellules cultivées. Cette étape consiste en la lyse des cellules suivie de la séparation des différents compartiments cellulaires par centrifugation et de leur visualisation sur gel. L'étude des bandes observées a permis de confirmer la localisation d'une fraction de SF1-ST dans le cytoplasme, ainsi que la présence des différents complexes carrier-SF1 dans les fractions membranaires des cellules (**Figure 45**).

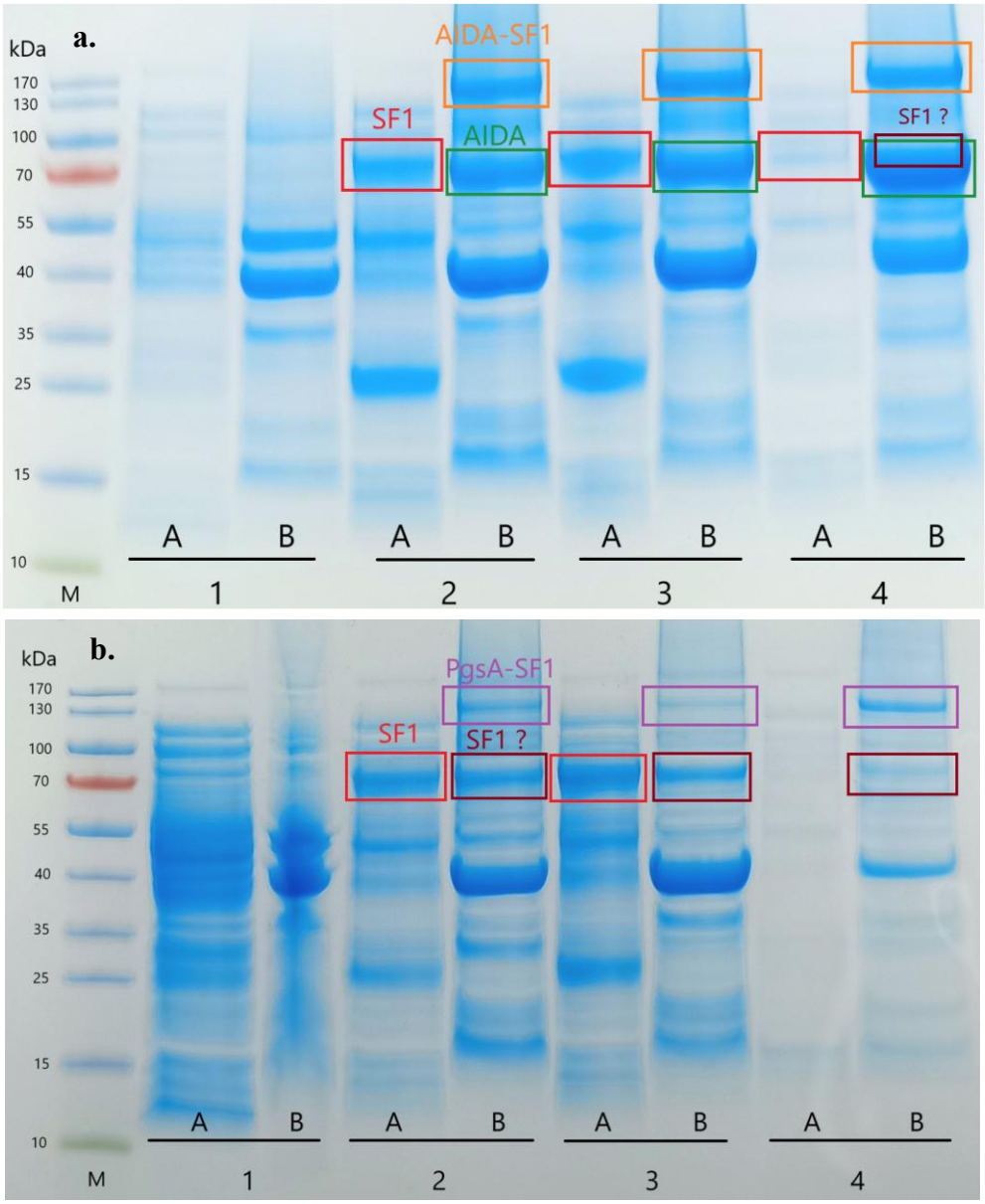


Figure 45 : *Tests d'expression à 25°C en milieu MJS pH 5,4 des constructions AIDA-I-SF1* ***(a)*** *et PgsA-SF1* ***(b)*** *: évaluation de la composition des fractions membranaires et solubles. M : Marqueur de taille ; 1 : Cellules non induites ; 2 : Cellules induites à 0.1 mM d'arabinose et d'IPTG ; 3 : Cellules induites à 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG ; 4 : Cellules induites à 1 mM d'arabinose et d'IPTG. A : fractions protéiques cytoplasmiques. B : Fractions protéiques membranaires. En rouge le biosenseur SF1 seul. En orange et violet les complexes AIDA-SF1 et PgsA-SF1 respectivement. En rouge foncé une protéine non identifiée, supposée être le biosenseur SF1.*

Ces résultats montrent que la totalité des protéines carrier-SC et carrier-SF1 sont retrouvées en fractions membranaires. De plus, la proportion du complexe carrier-SF1 retrouvée en fractions membranaires augmente avec la quantité d'arabinose utilisée pour l'induction. De la même manière, la quantité de SC-AIDA-I retrouvée en fractions membranaires semble augmenter avec la quantité d'arabinose. Comme dans la littérature et dans les travaux présentés précédemment, la protéine PgsA-SC seule n'a pas pu être observée. Ces observations suggèrent qu'une induction forte de la protéine carrier-SC est favorable à nos travaux.

Pour la souche exprimant PgsA-SF1, ces mêmes bandes correspondant à la taille du biosenseur ont été observées en fractions membranaires pour toutes les conditions testées. La protéine à l'origine de ces bandes n'a cependant pas été identifiée. Il est possible que le complexe PgsA-SF1 se dégrade une fois localisé dans la membrane. De par ces résultats, il semble que l'expression du complexe AIDA-SF1 est meilleure, avec une proportion réduite de biosenseur SF1 seul et une localisation majoritairement membranaire.

Ayant validé la localisation membranaire des complexes carrier-SF1 souhaités, nous avons cherché à optimiser la production de ces derniers. Ces manipulations ont visé à cultiver les cellules dans les conditions précédemment identifiées comme optimales (LB pH 4,5 ou MJS pH 5,4 ; induction à 17°C ou 25°C), et d'induire la production des protéines avec des concentrations variables d'arabinose et d'IPTG. L'induction a été maintenue pour une durée variant de 6 h à 24 h.

L'induction avec 0,1 mM d'arabinose et d'IPTG ayant conduit à une surproduction du complexe SF1-ST par rapport au carrier et en nous appuyant sur les contenus protéiques des fractions cytoplasmiques et membranaires à différentes concentrations d'inducteur, nous avons choisi d'augmenter le ratio arabinose/IPTG utilisé. Nous avons observé que l'utilisation de concentrations d'arabinose comprises entre 0,5 mM et 1,5 mM permettait d'améliorer la proportion du complexe carrier-SF1. Ces concentrations en arabinose conduisent également à la présence d'une proportion de carrier-SC non fusionnée dans les fractions membranaires. Cela montre que le carrier est produit en excès par rapport au biosenseur et qu'une partie du carrier migre dans la membrane sans être fusionné au biosenseur. Cela suggère que la totalité du biosenseur produit est complexé et migre dans la membrane, et donc qu'il n'est pas retrouvé dans le cytoplasme ou en quantités négligeables. De plus, la présence de carriers seuls dans les membranes n'est pas gênante pour les travaux envisagés. Ces observations sont univoques au travers des milieux et des températures d'induction étudiés. En revanche, l'utilisation de concentrations d'arabinose supérieures à 1,0 mM (1,5 mM ou 2 mM) conduit à une diminution de la croissance cellulaire après induction.

Nous avons également diminué la concentration d'IPTG utilisée pour l'induction de SF1-ST. Si l'utilisation d'une concentration de 0,05 mM n'a pas eu d'impact notable sur l'expression de SF1-ST, une concentration de 0,01 mM a conduit à une expression trop faible de la protéine. Nous avons conclu que la variation de la concentration d'IPTG n'était pas un élément clé à nos travaux. Ainsi, nous avons déterminé comme conditions de culture optimales l'utilisation du milieu LB pH 4,5 ou MJS pH 5,4, une température d'induction de 25°C et une induction avec 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG sur la nuit (16 h). Afin de simplifier les manipulations, nous avons choisi de réaliser la culture des cellules exclusivement en milieu MJS pH 5,4, avec les conditions d'induction citées ci-dessus.

7. Réponse des cellules exprimant carrier-SF1 à l'uranyle

La production et la localisation dans la membrane externe des complexes carrier-SF1 ayant été validées et optimisées, nous nous sommes intéressés à la réponse du biosenseur membranaire en présence d'uranyle. Nous avons travaillé uniquement avec les lignées exprimant AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1. En raison des contraintes liées à la culture de cellules en présence d'uranyle (pièce dédiée, équipement limité, complexité des milieux), nous avons choisi de cultiver les cellules sans uranyle et de réaliser l'exposition de ces dernières après collecte et traitement.

Les milieux de culture utilisés contiennent des cations qui sont susceptibles d'interagir avec le biosenseur localisé dans la membrane. Il est donc nécessaire de les éliminer avant exposition des cellules à l'uranyle. Pour ce faire, nous avons utilisé un protocole de lavage des cellules permettant d'éliminer la majorité des cations adsorbés par une série de lavages successifs en tampon NaCl dépourvu de cations divalents. La vitesse et le nombre de centrifugations doivent être optimisés afin de réduire le risque de lyse des cellules, qui pourrait relarguer dans le milieu de nombreux composés capables d'interagir avec l'uranyle ce qui perturberait l'interaction du métal avec le biosenseur. Ainsi, nous avons déterminé qu'une série de trois centrifugations à 2000 rpm pendant 3 minutes suivies de lavages en tampon NaCl était le protocole optimal. La température de travail a également été étudiée et nous avons observé que le travail à froid n'améliorait pas la qualité du signal de fluorescence observé. Nous avons également étudié l'influence d'un lavage avec une solution d'EDTA en amont des lavages au NaCl. Nous avons supposé qu'il permettrait une meilleure élimination des cations divalents adsorbés par les cellules. Cependant, l'EDTA est également capable de dégrader les membranes, et donc de lyser les cellules. Nous avons testé différents protocoles de traitement, en faisant varier la concentration en EDTA (5 à 50 mM), ainsi que le temps (30 s jusqu'à 30 min) et la température de contact (4°C et température ambiante) (**Figure 46**). Les résultats de ces tests montrent que le traitement à l'EDTA conduit pour les cellules exprimant AIDA-I-SF1 à une légère augmentation du ratio de fluorescence à 525 nm / 476 nm, normalement synonyme de la fixation de métal par le biosenseur. Sans amélioration notable du signal, nous avons choisi d'abandonner l'utilisation d'EDTA pour le traitement des cellules.

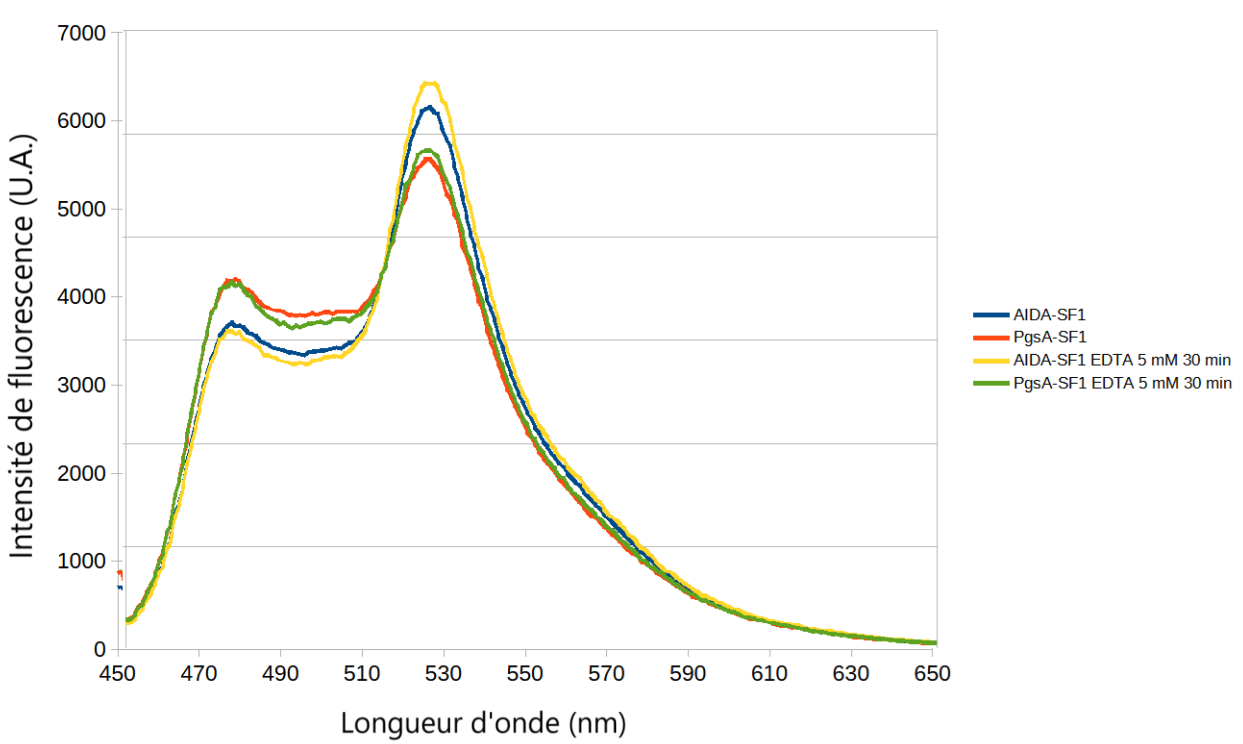


Figure 46 : *Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1 non traitées et traitées avec 5 mM d'EDTA pendant 30 min à 4°C. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

Nous avons dans un premier temps cherché à observer une réponse oui/non des cellules à l'uranyle. Le profil de fluorescence des échantillons est mesuré avant et après ajout de 30 µM de nitrate d'uranyle. Ces manipulations ont permis d'observer pour la souche exprimant AIDA-I-SF1 une augmentation du transfert de fluorescence chez le biosenseur membranaire en présence d'uranyle. La variation de FRET et la différence de ratio 525 nm / 476 nm sont réduites par rapport au biosenseur SF1 *in vitro* (**Figure 47**). Dans le cas de la souche exprimant PgsA-SF1, aucune réponse n'a pu être observée après exposition des cellules à différentes concentrations d'uranyle. Par conséquent, nous avons choisi de réaliser la suite des manipulations en utilisant uniquement la souche exprimant AIDA-I-SF1.

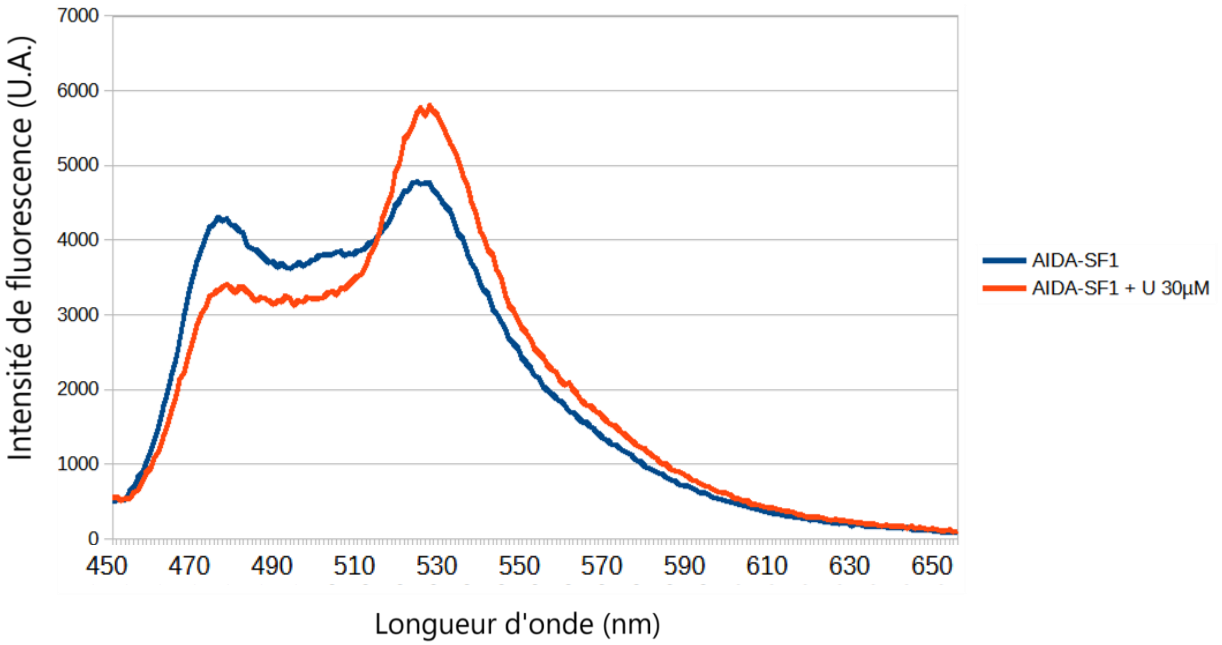


Figure 47 : *Profils de fluorescence de cellules d'E. coli exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C en absence (bleu) et en présence (rouge) de 30 µM de nitrate d'uranyle. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

Afin d'identifier parmi les conditions de culture testées précédemment celles qui permettent une réponse optimale des cellules à l'uranyle, nous avons exposé à l'uranyle des lots de cellules induites avec différentes concentrations en arabinose (1 mM et 1,5 mM pour 0,1 mM d'IPTG) et cultivées à différentes températures après induction (17°C, 25°C et 30°C) (**Figure 48**, **Figure 49**, **Figure 50**).

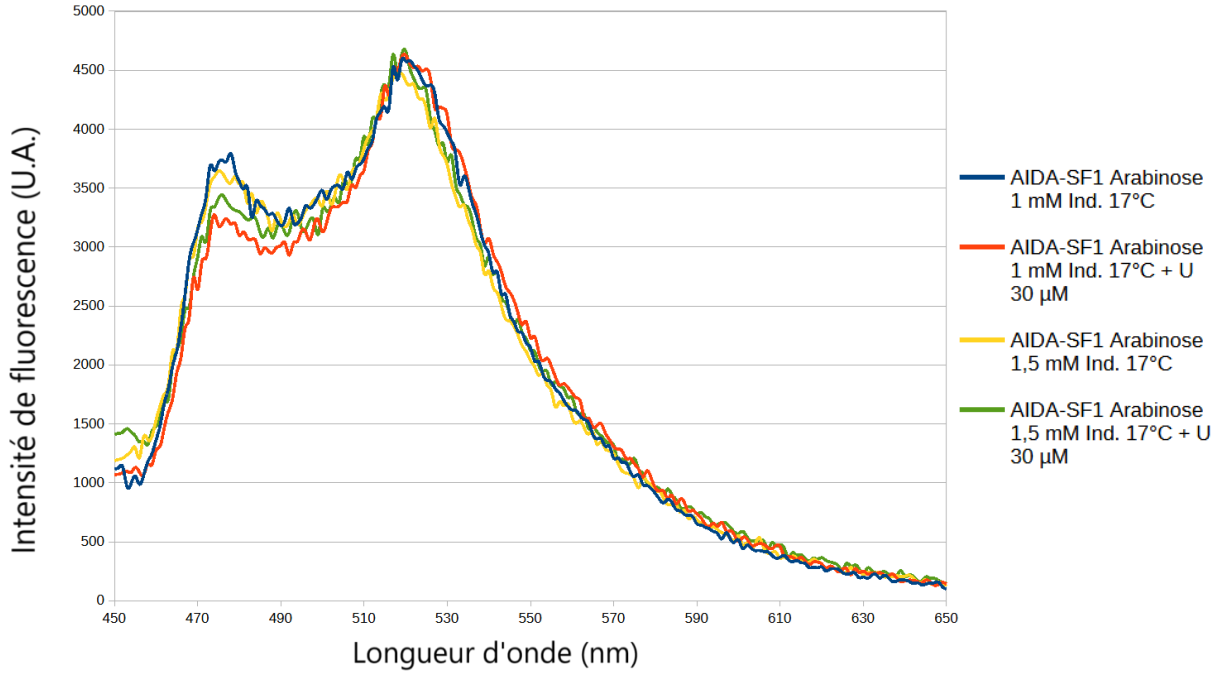


Figure 48 : *Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 17°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose, en absence ou présence de 30 µM d'uranyle. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

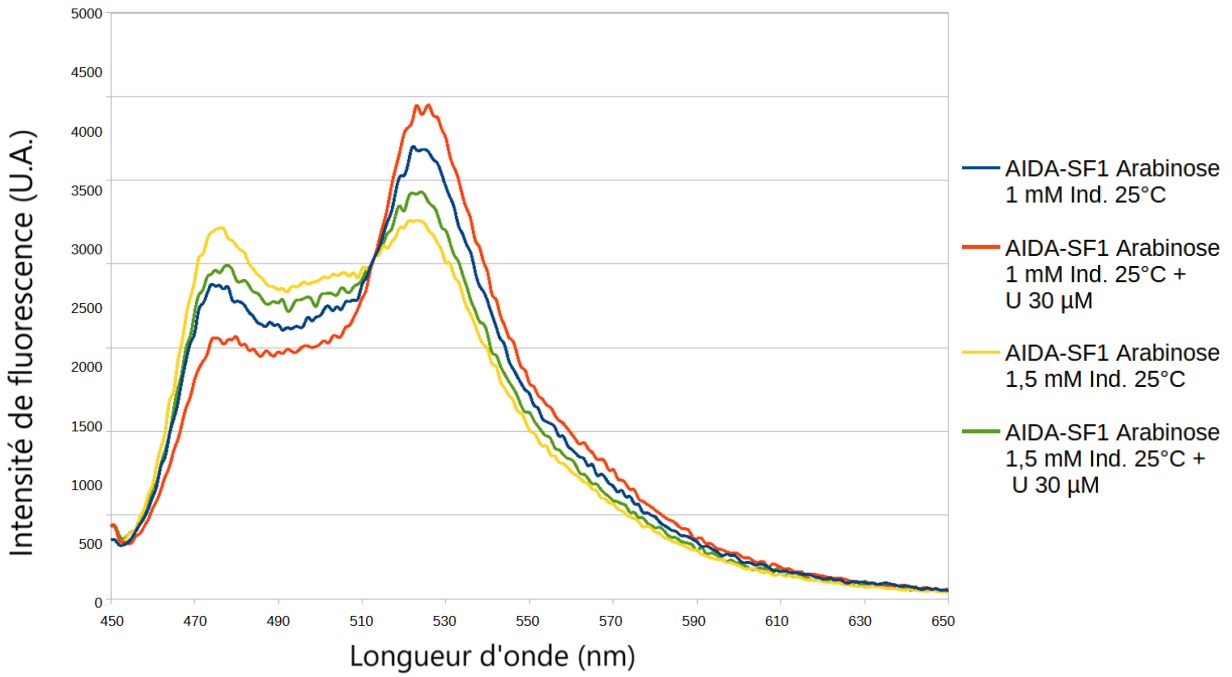


Figure 49 : *Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose, en absence ou présence de 30 µM d'uranyle. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

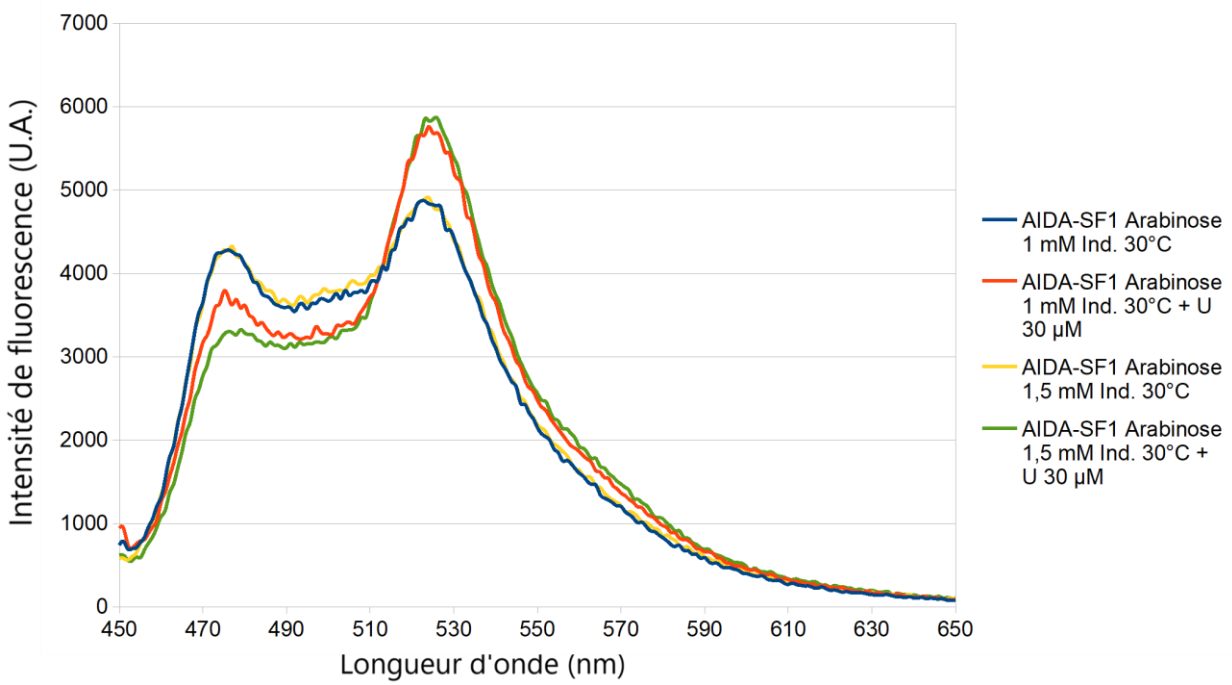


Figure 50 : *Profils de fluorescence de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose, en absence ou présence de 30 µM d'uranyle. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

Les intensités de fluorescence à 476 nm et 525 nm permettent de calculer la gamme dynamique des échantillons ΔR/R (en pourcentage), déterminée par la formule indiquée en **Figure 51**, avec R1 le ratio de fluorescence à 525 nm / 476 nm à l'état basal et R2 le ratio de fluorescence à 525 nm / 476 nm maximal. Il est essentiel d'avoir la gamme dynamique la plus élevée possible. Elle augmente la sensibilité de détection du signal à de faibles variations de la quantité de métal. Les valeurs de ΔR/R des cellules exprimant AIDA-SF1 cultivées selon différentes conditions sont indiquées en **Tableau 18**.

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R2 - R1}{R1} * 100 = \left(\left(\frac{R2}{R1}\right) - 1\right) * 100$$

Figure 51 : *Formule de ΔR/R*

	17°C Ara 1 mM	17°C Ara 1,5 mM	25°C Ara 1 mM	25°C Ara 1,5 mM	30°C Ara 1 mM	30°C Ara 1,5 mM
R1	1,44	1,24	1,43	1,01	1,13	1,13
R2	1,82	1,40	1,88	1,24	1,55	1,77
ΔR/R (%)	26,8	13,4	31,3	22,4	35,4	57,2

Tableau 18 : *Gamme de réponse des cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 17°C, 25°C et 30 °C et induites avec 0,1 mM d'IPTG et 1 mM ou 1,5 mM d'arabinose (Ara) en absence (R1) et présence de 30 µM d'uranyle (R2).*

Ces manipulations ont permis de montrer que l'augmentation de la température de culture après induction augmente la réponse des cellules à l'uranyle quelle que soit la concentration d'arabinose utilisée (**Tableau 18**). La réponse la plus importante a été observée pour une induction avec 1,5 mM d'arabinose et une température de culture post induction de 30°C. La réponse des cellules est plus importante pour une induction avec 1 mM d'arabinose pour une température d'induction de 17°C ou 25°C.

Une réponse oui/non des échantillons ayant été observée et des conditions de culture permettant une réponse des cellules optimale ayant été déterminées (culture en milieu MJS pH 5,4 ; induction à 30°C avec 0,1 mM d'ITPG et 1,5 mM d'arabinose), nous avons cherché à établir une gamme de réponse des cellules exprimant AIDA-I-SF1. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées et traitées comme indiqué précédemment. Le profil de fluorescence de chacun des échantillons a été mesuré afin de s'assurer de l'état basal du biosenseur dans chacun des puits. Une concentration unique et croissante de nitrate d'uranyle a été ajoutée à chacun des puits, et le profil de fluorescence de chaque échantillon a été mesuré. Nous avons choisi d'exposer à l'uranyle les cellules ayant montré une forte réponse à l'uranyle lors des travaux précédents, à savoir celles exprimant AIDA-I-SF1 cultivées à 25 °C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG, et celles cultivées à 30 °C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG. Ces manipulations ont permis d'observer une augmentation du transfert de fluorescence du biosenseur membranaire en présence d'uranyle. Cette augmentation est croissante avec la concentration en uranyle et permet d'établir une gamme de réponse des cellules en présence de métal. Cette gamme a pu être établie pour des cellules cultivées à 30°C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG (**Figure 52**, **Figure 53**, **Tableau 19**), et pour des cellules cultivées à 25 °C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG (**Figure 54**, **Figure 55**, **Tableau 20**). La variation de FRET présentée par les échantillons est ici aussi réduite

par rapport à celle du biosenseur SF1 *in vitro*. Cette observation laisse à penser que malgré la localisation dans la membrane externe de la totalité du biosenseur produit, il est possible qu'une proportion de ce dernier soit piégée au sein de la membrane ou orientée de manière à ne pas permettre l'interaction du biosenseur avec l'uranyle du milieu. Il est également envisageable qu'une partie de l'uranyle ajouté soit chélatée par d'autres protéines de la membrane externe d'*E. coli*, diminuant la concentration effective perçue par le biosenseur SF1. Il est également possible que le contexte membranaire influence le changement de conformation du biosenseur en présence d'uranyle et donc le profil de fluorescence en absence et en présence de différentes concentrations de métal. L'analyse des ratios de fluorescence à 525 nm / 476 nm en fonction de la concentration d'uranyle montre que le ratio augmente avec la concentration en métal mais n'atteint pas de plateau. Cela indique que le biosenseur n'est pas saturé et qu'une réponse plus intense pourrait être observée à de plus fortes concentrations d'uranyle.

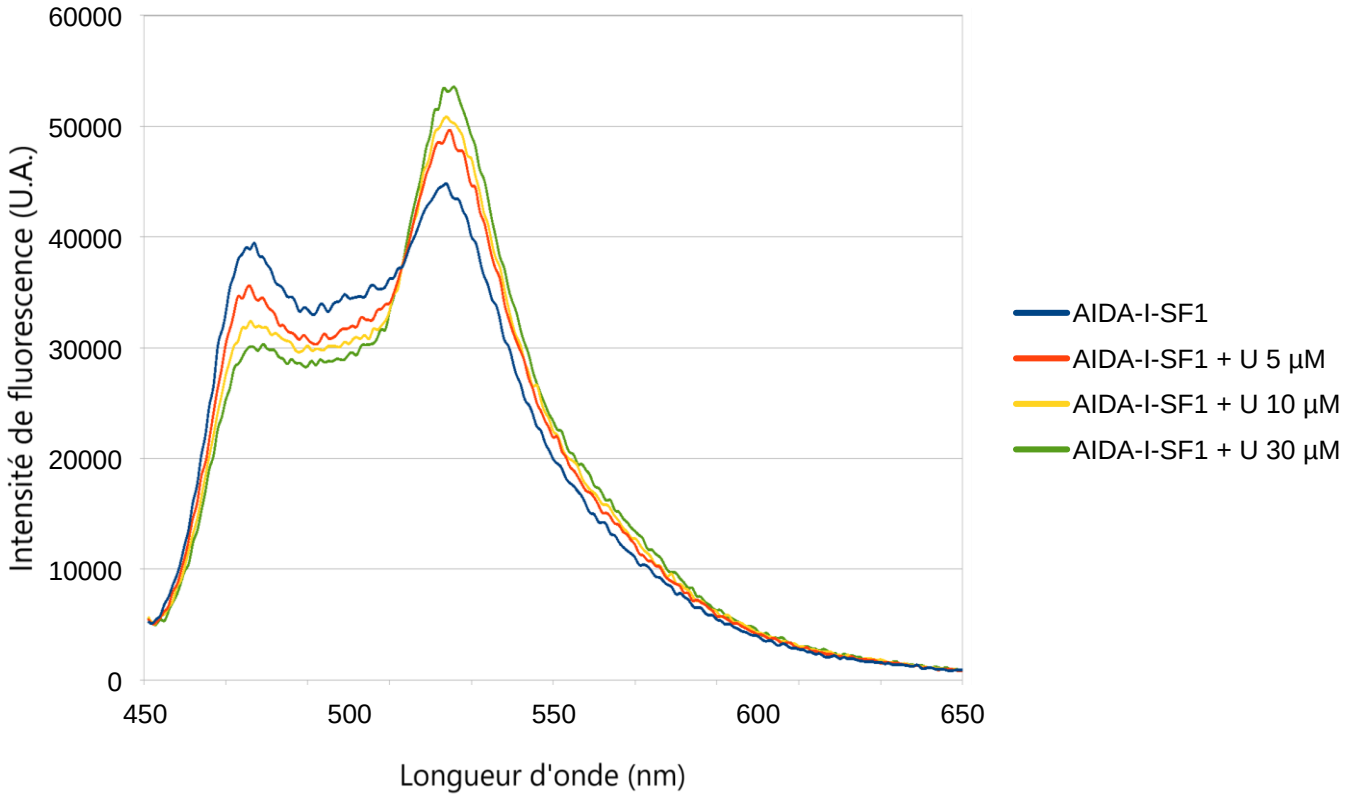


Figure 52 : *Profils de fluorescence de cellules d'E. coli exprimant le complexe AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG, en présence de différentes concentrations en uranyle. Les intensités de fluorescences sont normalisées à 513 nm.*

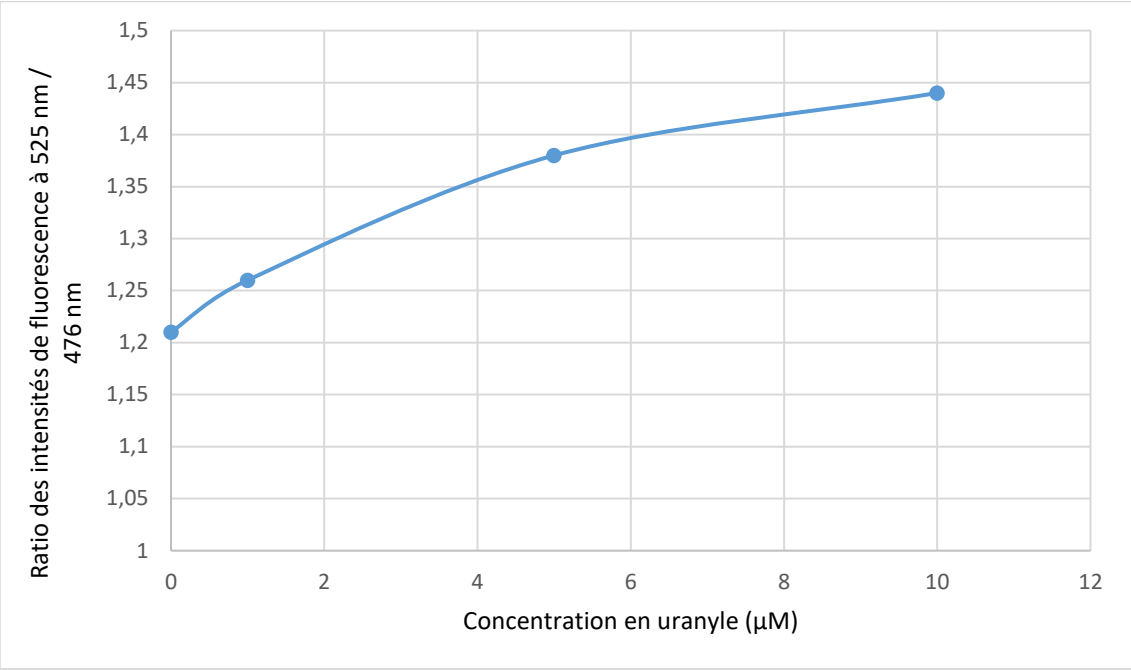


Figure 53 : *Ratio de fluorescence 525 nm / 476 nm de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG en fonction de la concentration en uranyle.*

Concentration en uranyle (µM)	ΔR/R AIDA-I-SF1 (%)
0	0
5	23,76
10	38,13
30	57,23

Tableau 19 : *Gamme dynamique (ΔR/R) des cellules exprimant le complexe AIDA-I-SF1, cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 30°C et induites avec 1,5 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG.*

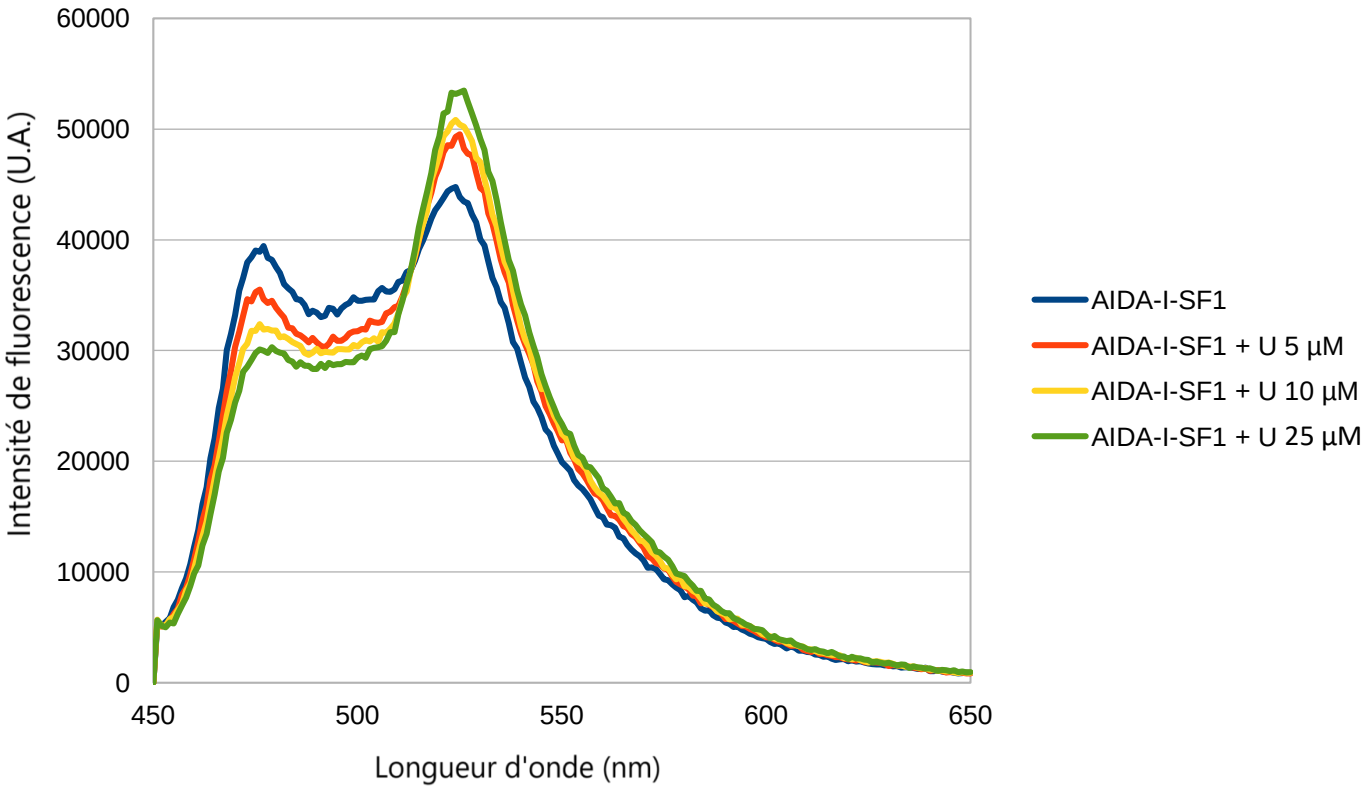


Figure 54 : *Profils de fluorescence de cellules d'E. coli exprimant le complexe AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG, en présence de différentes concentrations en uranyle. Les intensités de fluorescence sont normalisées à 513 nm.*

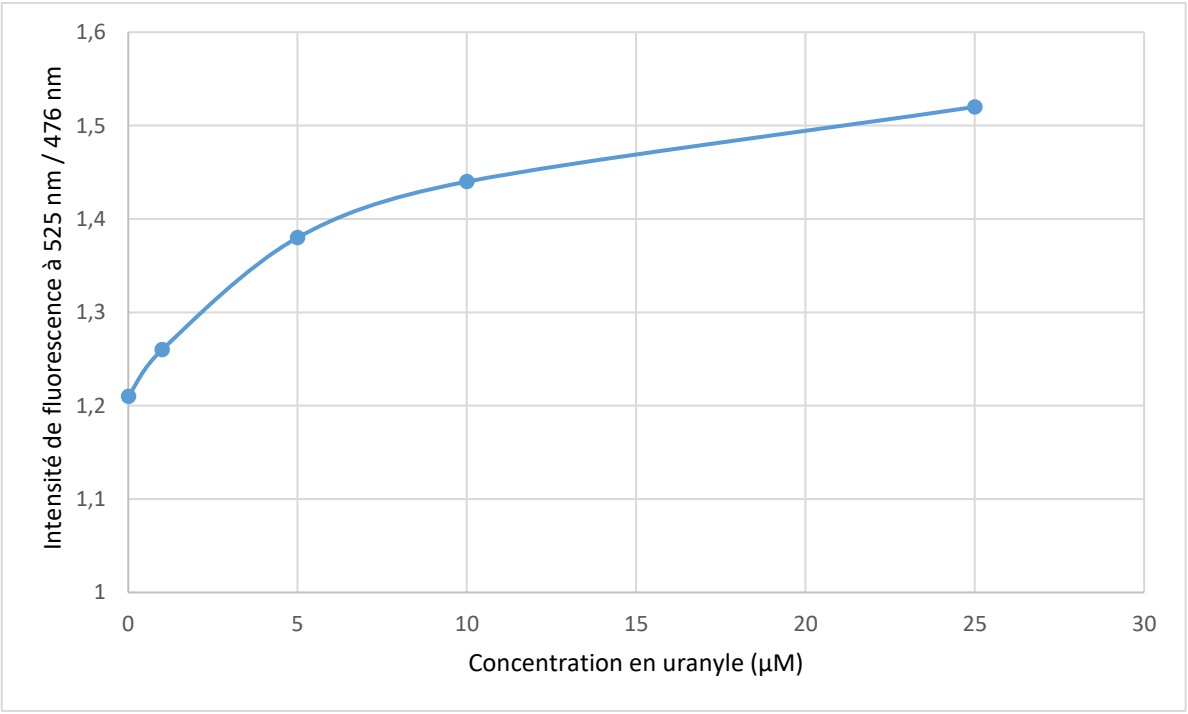


Figure 55 : *Ratio de fluorescence 525 nm / 476 nm de cellules exprimant AIDA-I-SF1 cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG en fonction de la concentration en uranyle.*

Concentration en uranyle (µM)	ΔR/R AIDA-I-SF1 (%)
0	0
1	4,52
5	13,91
10	19,93
25	26,34

Tableau 20 : *Gamme dynamique (ΔR/R) des cellules exprimant le complexe AIDA-I-SF1, cultivées en milieu MJS pH 5,4 à 25°C et induites avec 1 mM d'arabinose et 0,1 mM d'IPTG.*

Si l'observation d'une telle réponse est encourageante, cette dernière a été difficilement répliquée malgré l'application des mêmes conditions. De plus, la réponse observée est fluctuante au travers des manipulations, avec des ratios de fluorescence à 525 nm / 476 nm différents autant en absence qu'en présence d'uranyle pour des cellules cultivées et traitées de manière identique.

Une réponse reproductible et constante est un élément clé au criblage de mutants. En effet, il est nécessaire que les échantillons présentent le même profil de fluorescence basal afin de pouvoir être comparés. Par conséquent, les manipulations réalisées jusqu'à présent ne permettent pas la mise en place d'un criblage de mutants du biosenseur sur cultures de bactéries. En raison d'un manque de temps et pour garantir l'avancée du projet, cet axe de travail a par conséquent été abandonné.

Conclusion / Discussion

Au cours des travaux présentés dans ce chapitre, nous avons dans un premier temps étudié le comportement en présence d'uranyle de cellules exprimant le biosenseur SF1 dans leur cytoplasme. L'analyse par fluorescence de ces cultures nous a permis d'observer un profil de fluorescence similaire voire identique à celui du biosenseur SF1 purifié *in vitro*. Cependant, ces mêmes travaux ont montré que ces lignées cellulaires n'étaient pas en mesure de fournir une réponse du biosenseur en présence d'uranyle. Cette absence de réponse a été attribuée à l'incapacité de l'uranyle à pénétrer dans le cytoplasme des cellules avec une spéciation permettant une interaction avec le biosenseur.

Afin de contourner cette limitation intrinsèque liée au contexte cellulaire, nous nous sommes intéressés à une méthode alternative d'expression du biosenseur. Nous avons identifié l'expression de protéines dans la membrane externe d'*E. coli* comme une méthode compatible avec nos travaux. La principale limitation de ce type d'approche est liée à la taille et aux caractéristiques structurales des protéines pouvant être exprimées par des méthodes conventionnelles. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à des systèmes permettant l'expression membranaire de protéines de grande taille ou présentant une structure complexe. Parmi les systèmes décrits dans la littérature, le système SpyCatcher/SpyTag (SC/ST) s'est présenté comme une des meilleures approches aux travaux envisagés. Ainsi, nous avons développé 3 lignées de cellules capables d'exprimer le biosenseur dans leur membrane externe, sous la forme d'un complexe protéique avec une protéine carrier (AIDA-I, Lpp-OmpA et PgsA respectivement). Les cellules exprimant le complexe AIDA-I-SF1 ont ensuite été exposées à l'uranyle, et ont permis de déterminer une gamme de réponse dans la gamme de concentration en métal que pour le biosenseur SF1 *in vitro*. Ces résultats apportent la preuve de concept de la capacité du biosenseur SF1 exprimé dans la membrane externe d'*E. coli* à répondre à la présence d'uranyle dans le milieu.

Cependant, si l'analyse de cellules exprimant le biosenseur dans leur membrane externe a permis l'observation d'une réponse à la présence d'uranyle dans le milieu, cette réponse n'a pas pu être répliquée pour de nombreux échantillons analysés. En effet, plusieurs échantillons de cellules cultivées et traitées dans les conditions permettant l'observation d'une variation de FRET ont conduit à une absence de réponse après ajout des mêmes concentrations d'uranyle. L'observation d'une réponse constante et sans équivoque au travers des échantillons analysés est un élément clé aux travaux de criblage envisagés. Par conséquent, les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas la mise en place d'un protocole de criblage de mutants du biosenseur par analyse de cultures de bactéries. L'inconsistance de la réponse des échantillons suggère qu'un élément clé des protocoles mis en place n'est pas maîtrisé. Les dernières séries de manipulations réalisées sur les mêmes lignées cellulaires que précédemment n'a pas permis d'observer le profil de fluorescence caractéristique du biosenseur SF1, avec dans certain cas l'absence des protéines carriers sur gel d'acrylamide, suggérant une dégradation du matériel génétique associé voire des lignées cellulaires. De plus, la réponse des cellules à l'uranyle observée lors des travaux réalisés est plus faible que celle du biosenseur SF1 purifié, mais reste tout de même suffisante pour nos travaux. Il est possible que l'intensité de cette réponse ne permette pas de comparer des mutants du biosenseur dont l'affinité pour l'uranyle serait proche. Cette diminution de la réponse observée peut être liée à la présence d'une fraction du biosenseur incapable de répondre à l'uranyle de par sa localisation, ou au contexte membranaire limitant le changement de conformation de la protéine lors de la fixation de métal.

Afin de surmonter ces difficultés, plusieurs approches seront envisageables :

- La forte variabilité de la réponse des cellules en présence d'uranyle suggère un paramètre expérimental non maîtrisé, ou une variabilité intrinsèque au système SC/ST. Afin de confirmer ces hypothèses et à terme d'améliorer la reproductibilité des travaux, il conviendrait de mieux caractériser l'expression du complexe carrier-SF1. Par exemple, si la localisation membranaire du complexe a pu être confirmée pour les souches AIDA-I-SF1 et PgsA-SF1, nous n'avons pas d'informations quant à la localisation au sein de la membrane et l'orientation du biosenseur. Il est possible que ce dernier soit en partie ou totalement emprisonné au sein de la membrane, et que les sites de fixation de métal ne soient pas en contact avec le milieu extérieur. Le marquage des cellules par des anticorps spécifiques à la CaM et/ou aux GFPs permettrait d'obtenir plus d'informations quant à ce paramètre.

- Nous avons constaté une variabilité dans l'expression des différentes protéines du système qui peut être liée aux plasmides utilisés pour l'expression des protéines. Il est envisageable d'utiliser des plasmides alternatifs et présentant des propriétés différentes. L'utilisation d'un couple de plasmides différent pourrait permettre d'améliorer à la fois la production des protéines carrier-SC et SF1-ST, mais également de faciliter la migration du complexe vers la membrane des cellules. Par exemple, le vecteur pET28a utilisé pour l'expression de SF1-ST peut être substitué par d'autres vecteurs de la famille pET, tel que pET-22b qui possède une séquence d'adressage des protéines dans la membrane. Il est également envisageable de modifier les constructions génétiques codant les protéines, par exemple en déplaçant le fragment ST à l'extrémité Nter du biosenseur (ici en Cter), avec l'optique de produire un complexe ayant une structure capable de mieux migrer et interagir avec le métal.

- De la même manière, il serait intéressant d'étudier la croissance des cellules et la production des protéines sous d'autres conditions de cultures, telles que différents milieux pauvres (M9, M63) ou riches (TB, SB, tryptone). Cela pourrait permettre d'améliorer la production des différentes protéines, mais également de diminuer la quantité de composés capables de perturber l'interaction entre le biosenseur SF1 et l'uranyle.

- Il est également envisageable de s'intéresser à l'utilisation d'autres souches bactériennes. Si BL21(DE3) a montré des résultats intéressants au travers de la littérature et de nos travaux, il est possible que d'autres souches permettent une meilleure croissance des cellules notamment dans le cas de l'expression de Lpp-OmpA. De plus, l'utilisation de souches alternatives pourrait favoriser la localisation et l'orientation du biosenseur dans la membrane, et ainsi assurer son contact avec le milieu externe.

- La littérature décrit d'autres carriers tels que la protéine INP (Ice Nucleation Protein) de *Pseudomonas putida*. De nombreuses protéines membranaires utilisées dans des systèmes de fusion sont également susceptibles d'être applicables au système SC/ST. Ces protéines n'ont pas été étudiées au cours de ces travaux, et pourraient constituer une approche alternative pour l'expression du biosenseur SF1 dans la membrane externe d'*E. coli*. L'utilisation de telles protéines pourrait favoriser à la fois la croissance des cellules, la production des protéines, mais également l'orientation du biosenseur dans la membrane et la réponse des cellules à l'uranyle.

Chapitre III : Amélioration de l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle

1. Contexte

Les travaux portant sur le développement d'une méthode de criblage sur culture de bactéries n'ayant pas conduit à des résultats concluants, nous nous sommes tournés vers une autre approche : le criblage sur protéines purifiées. Cette méthode consiste en la production et la purification en parallèle de mutants d'une protéine d'intérêt, suivies de la comparaison de leur affinité pour l'uranyle. Ce type d'approche diffère du criblage sur cultures de bactéries par différents aspects (**Figure 56**) :

- Le criblage sur protéines purifiées implique un travail majoritairement en conditions *in vitro*, et par conséquent un meilleur contrôle des échantillons et des interactions protéine/uranyle. De plus, l'optimisation d'une approche de criblage sur l'interaction CaM/uranyle *in vitro* a été réalisée par l'IPM et les protocoles sont connus.

- Le criblage sur protéines purifiées implique un traitement des échantillons plus long et complexe par comparaison au criblage direct sur culture de bactéries. Cet aspect implique une diminution du débit de criblage et par conséquent une limitation du nombre de mutants pouvant être criblés.

- Si le biosenseur SF1 présente une fluorescence qui permet son analyse *in vivo*, c'est une protéine plus difficile à manipuler *in vitro* par comparaison avec la CaM et ses variants. Nous avons donc choisi ici de travailler avec la $CaM\Delta_{I-II}$, sur laquelle est basé le biosenseur SF1. Cependant, l'amélioration de l'affinité de la CaM (ici du site II) pour l'uranyle ne garantit pas une amélioration de SF1, car différents paramètres jouent un rôle dont des paramètres de repliement de l'ensemble du biosenseur.

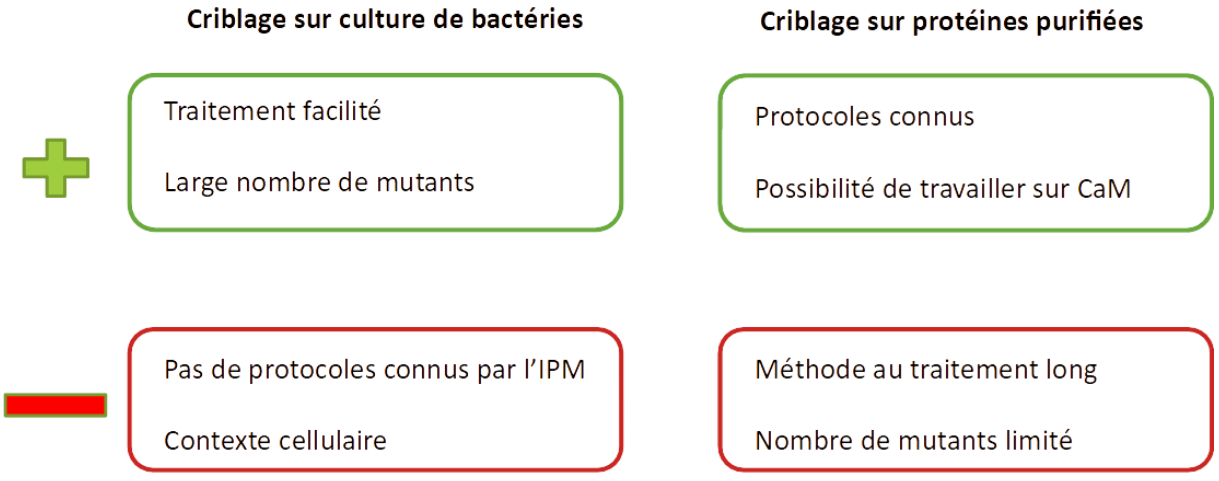


Figure 56 : *Avantages et inconvénients du criblage sur cultures de bactéries et sur protéines purifiées.*

2. Stratégies d'amélioration du site II

Le criblage d'une banque de mutants dérivés de la CaM vise à améliorer l'affinité du peptide pour l'uranyle. Comme mentionné dans l'introduction (**Section 3.6**), l'affinité du site I de la CaM pour l'uranyle a été améliorée d'un facteur 100 par la suppression des acides aminés en position 2 et 3 de la boucle de fixation des métaux (Thèse de R. Pardoux, Pardoux et al., 2022). Cette mutation a également augmenté la sélectivité vis-à-vis du calcium d'un facteur 1000. La délétion équivalente des acides aminés en position 2 et 3 du site II a eu en revanche un effet beaucoup plus limité sur l'affinité du site II pour l'uranyle, d'un facteur environ 2, en passant d'un Kd = 270 ± 43 nM pour le peptide CaM Y II (Beccia et al. 2022) à un Kd = 143 ± 13 nM pour le mutant CaM Y II$\Delta_{2\text{-}3}$ (**Tableau 21**). Cette mutation a cependant augmenté d'un facteur 100 la sélectivité du site vis-à-vis du calcium (Cherif et al., en préparation), et cette sélectivité vis-à-vis du calcium a été conservée dans le biosenseur SF1, construit à partir des deux sites $\Delta_{2\text{-}3}$. L'affinité pour l'uranyle du site I est de l'ordre du subnanomolaire (Kd = 0,67 ± 0,19 nM) alors que l'affinité pour le biosenseur SF1 est beaucoup plus faible (de l'ordre du submicromolaire), ce qui suggère que l'affinité du site II est limitante pour la sensibilité de détection de l'uranyle par le biosenseur.

Pour améliorer l'affinité pour l'uranyle du site II, ce dernier a été modifié par mutagenèse dirigée, guidée par des approches de modélisation par dynamique moléculaire (Chérif et al., en préparation). Le meilleur mutant obtenu inclut une délétion de deux acides aminés en partie C-terminale de la boucle de fixation des métaux et des mutations ponctuelles sur le reste de la séquence (mutant CaM-siteII_{RC}, **Tableau 21**). La constante de dissociation du site II pour l'uranyle de ce mutant est Kd = 15,5 ± 0,6 nM, soit un facteur d'amélioration de 10 par rapport à la protéine de départ. Cette amélioration n'a cependant pas été retrouvée lorsqu'elle a été introduite dans un peptide contenant les deux sites de fixation des métaux.

Il est donc nécessaire de travailler à l'amélioration du site II en présence du site I. Nous avons par conséquent choisi de modifier la séquence du site II à partir du peptide CaM$\Delta_{I\text{-}II}$, possédant 2 sites de fixation de 10 acides aminés chacun (suite à la délétion des acides aminés en position 2 et 3) et utilisé dans le biosenseur SF1. Les séquences de ces sites sont indiquées en **Tableau 21**.

Peptide	Site I	Site II
CaM Y I-II	DKDGDGYITTKE	DADGNGTIDFPE
CaM Y II	AKAGDGYITTKE	DADGNGTIDFPE
CaM Y I$\Delta_{2\text{-}3}$	DGDGYITTKE	AAAGNGTIDFPE
CaM Y II$\Delta_{2\text{-}3}$	AKAGDGYITTKE	DGNGTIDFPE
CaM-siteII_{RC}	AKAGDGYITTKE	DADGDRTEDE
CaM$\Delta_{I\text{-}II}$	DGDGYITTKE	DGNGTIDFPE

Tableau 21 : *Séquences des sites I et II de fixation de métal de la CaM Y I-II et de différents variants*

La stratégie proposée est de créer une banque de mutants du site II à partir de la CaMΔ_{I-II} et de cribler cette banque pour l'affinité des peptides deux sites pour l'uranyle. Cette banque doit être suffisamment large et diverse pour permettre l'étude d'un nombre suffisant de mutants et justifier l'approche de criblage. Cependant, la mutagenèse aléatoire de chaque acide aminé du site II de la CaMΔ_{I-II} correspond à une banque théorique de 20^{10} mutants, un nombre trop élevé pour être criblé après purification des protéines. Une telle banque implique également un certain nombre de séquences à très faible intérêt (ex : AAAAAAAAAA) car fortement susceptibles de présenter une affinité faible pour l'uranyle. La taille de la banque dépend de deux facteurs : d'une part la diversité des acides aminés représentés chez les mutants créés, et d'autre part le nombre de positions du site II à muter. Nous avons ainsi choisi une approche dite « avec a priori », à savoir la création d'une banque ciblée sur quelques acides aminés en nous basant sur les données structurales de CaMs retrouvées dans la littérature, ainsi que sur les résultats expérimentaux obtenus par l'équipe en amont de cette thèse.

Les travaux réalisés par le passé à l'IPM ont visé à muter le site I de la CaM Y I$\Delta_{2,3}$. Plus précisément, le motif DGD en positions 1-3 du site I, qui contient 2 résidus aspartate fixateurs de métal. Le rôle de ces résidus, ainsi que celui de l'acide aminé en position 2 a été analysé en modifiant ces 3 acides aminés par mutagénèse aléatoire. Ces mutations ont permis de confirmer le rôle important de la présence d'acides aspartiques en position 1 et 3 de la boucle et d'identifier une très forte sélectivité du mutant de séquence DDDGYITTKE pour l'uranyle en présence de carbonate de calcium (Brémond et al., en préparation). Ces travaux suggèrent qu'une modification des positions 2 et 3 du site II et plus précisément l'introduction de résidus aspartates pourraient améliorer l'affinité du site II pour l'uranyle. La bonne affinité du mutant CaM-siteII_{RC} pour l'uranyle suggère également un rôle important de l'aspartate en position 3 dans la boucle du site II raccourci à 10 acides aminés pour la chélation de l'uranyle. D'autre part, les acides aminés en début de boucle du site II sont situés à distance du feuillet β inter-site et leur substitution ne devrait pas affecter la stabilité des peptides 2 sites (**Figure 57**). Pour ces raisons, nous avons décidé de cibler les acides aminés en début de boucle.

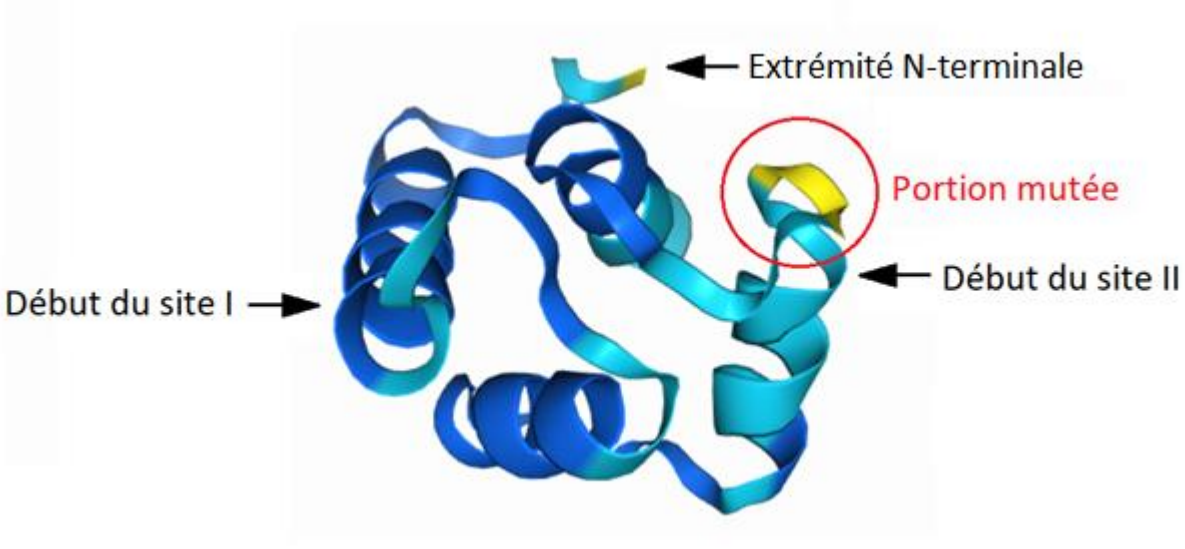


Figure 57 : *Prédiction structurale de la CaMΔ_{I-II} en utilisant AlphaFold 3*

En parallèle à ces travaux, nous nous sommes intéressés aux données de la littérature portant sur la conservation des résidus au travers des différents sites de CaMs documentés (Halling 2016). Il est à noter que ces données concernent des protéines fixant le calcium et non l'uranyle, et ne permettent par conséquent pas de déterminer directement un site optimisé. Nous avons supposé qu'une forte conservation d'un résidu à une position donnée est synonyme d'une influence importante sur l'affinité du site pour le métal. L'analyse des séquences montre une forte conservation des résidus en position 1, 3, 4, 6 et 12 au travers des 4 sites de la calmoduline (positions 1, 2, 4 et 10 pour les sites de la CaM$\Delta_{I\text{-}II}$ ou sites $\Delta_{2\text{-}3}$), conformément aux éléments structuraux caractéristiques de motifs EF-Hand (**Figure 58**, **Figure 59**). Il est cependant à noter que le site II présente une conservation nettement plus élevée des résidus en fin de boucle, notamment aux positions 9 et 10, par comparaison aux 3 autres sites de CaMs sauvages.

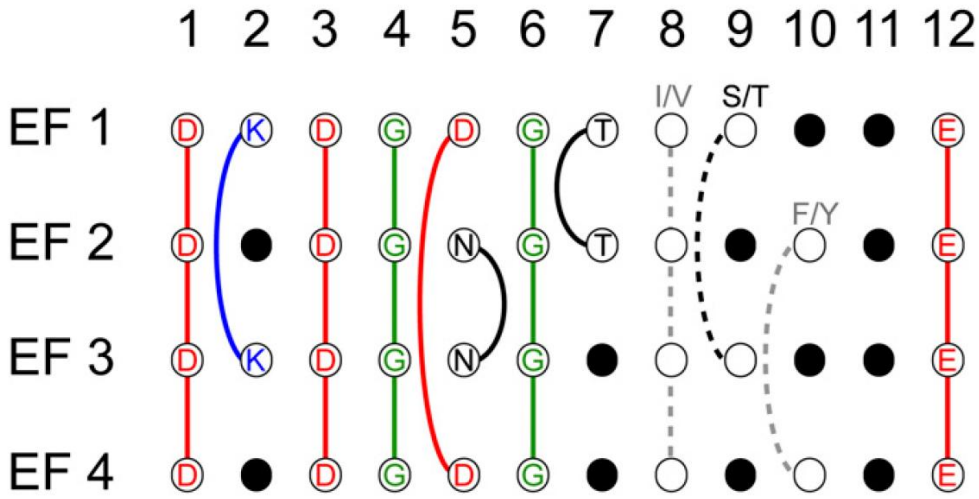


Figure 58 : *Comparaison des séquences de motifs EF-Hand de différentes CaMs de la littérature. Les résidus fortement conservés sont reliés par une ligne. Les positions qui sont uniques à une seule boucle EF sont entourées. Les positions qui semblent n'avoir qu'un seul résidu alternatif dans plusieurs EF-Hand sont reliées par une ligne en pointillés. Les résidus sont colorés comme suit : noir : polaire, bleu : basique, gris : non polaire, vert : glycine, rouge : acide. Figure tirée de Halling 2016.*

Pour les différents sites, les positions 1 et 3 sont majoritairement occupées par un résidu Asp, et les positions 4 et 6 correspondent majoritairement un résidu Gly, formant un motif DxDGxG (DGxG pour les sites $\Delta_{2\text{-}3}$; avec x est un résidu aléatoire). Les résidus des positions 2 et 5 sont moins conservés et le résidu le plus représenté varie en fonction des sites : la position 2 (absente chez les sites $\Delta_{2\text{-}3}$) est majoritairement un résidu Lys chez les sites I et III, et est faiblement conservée chez les sites II et IV avec principalement des résidus non chargés (Val, Ile). Les sites I et III sont plus affins pour les cations par comparaison aux sites II et IV respectivement, suggérant une influence d'un résidu chargé positivement en début de boucle. La position 5 (position 3 chez les sites $\Delta_{2\text{-}3}$) est majoritairement occupée par un résidu Asp chez les sites I et IV, et par un résidu Asn chez les site II et III. On observe ainsi une forte conservation des acides aminés fixateurs de métal, pour un motif DxDGzGxIDFxE (avec Z = D ou N) pour le site II de CaMs sauvages, soit DGzGxIDFxE pour la CaM$\Delta_{I\text{-}II}$.

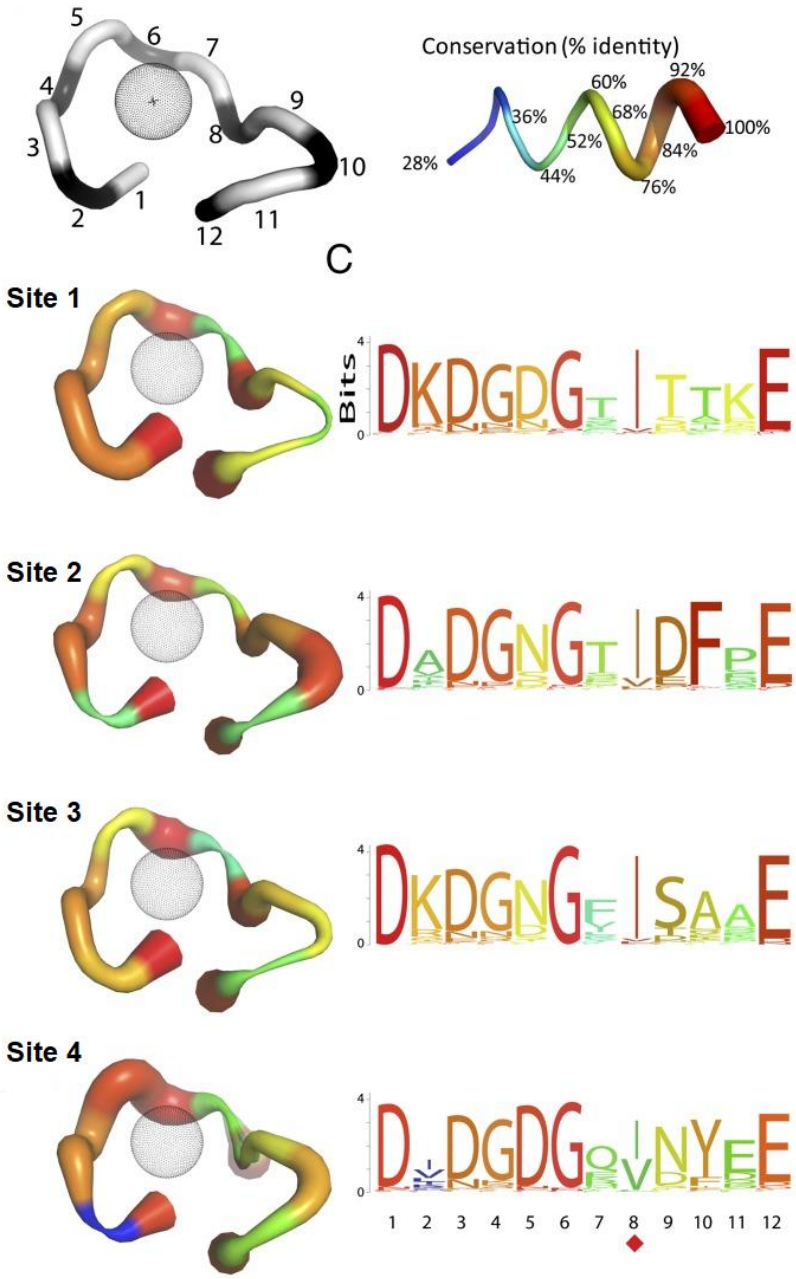


Figure 59 : *Conservation des séquences de chaque motif EF-Hand de différentes CaMs décrites dans la littérature. Une lettre de plus grande taille indique un acide aminé plus conservé. Figure tirée de Halling 2016.*

Au vu des résultats précédemment obtenus par l'IPM et du motif de conservation de CaMs sauvages, nous avons choisi de muter les positions 2 et 3 du site II possédant seulement 10 acides aminés chez la $CaM\Delta_{I-II}$. En considérant la forte conservation du résidu Asp (D) dans les 4 sites des calmodulines de la littérature et le rôle connu des résidus Asp et Glu (E) dans la fixation des cations, nous avons choisi de concevoir la banque de manière à ce qu'elle comporte entre autres des séquences DDxG, DxDG, DExG et DxEG.

3. Conception d'une banque de mutants

Nous avons choisi d'obtenir les mutants de la CaMΔ$_{I-II}$ par mutagenèse semi-dirigée au moyen d'amorces dégénérées selon une approche décrite par Hidalgo et al. (Hidalgo et al., 2008). Ces dernières consistent en un mélange d'amorces qui varient entre elles à une position et avec une diversité de séquences déterminée. L'amplification d'ADN par PCR au moyen d'amorces dégénérées permet la formation d'une multitude de séquences ADN en une seule réaction, et à partir d'une unique matrice de départ. Ces séquences mutées pourront être ensuite utilisées pour la création d'une banque de mutants (chaque souche bactérienne produit un mutant différent et l'ensemble des souches constitue la banque). Le nombre et la diversité des séquences obtenues peuvent être contrôlés par la conception des amorces dégénérées en utilisant la table de correspondance universelle des amorces dégénérées (**Figure 60**). Il est possible de choisir quels nucléotides seront présents ou non aux différentes positions à muter.

A.

Code	Nucléotides
M	A/C
R	AG
W	A/T
S	C/G
Y	C/T
K	G/T
V	A/C/G
H	A/C/T
D	A/G/T
B	C/G/T
N	A/C/G/T

B.

UUU, UUC: Phe UUA, UUG: Leu	UCU, UCC, UCA, UCG: Ser	UAU, UAC: Tyr UAA, UAG: Stop	UGU, UGC: Cys UGA: Stop UGG: Trp
CUU, CUC, CUA, CUG: Leu	CCU, CCC, CCA, CCG: Pro	CAU, CAC: His CAA, CAG: Gln	CGU, CGC, CGA, CGG: Arg
AUU, AUC, AUA: Ile AUG: Met	ACU, ACC, ACA, ACG: Thr	AAU, AAC: Asn AAA, AAG: Lys	AGU, AGC: Ser AGA, AGG: Arg
GUU, GUC, GUA, GUG: Val	GCU, GCC, GCA, GCG: Ala	GAU, GAC: Asp GAA, GAG: Glu	GGU, GGC, GGA, GGG: Gly

Figure 60 : *Conception des amorces dégénérées.* ***A.*** *Tableau de correspondance des amorces dégénérées.* ***B.*** *Tableau des codons. Les différents codons possibles de la position 2 du site II à 10 acides aminés obtenus par mutagenèse sont indiqués en rouge, ceux correspondant à la position 3 en bleu. U est un oligonucléotide de l'ARN et correspond à T chez l'ADN.*

L'aspect expérimental de la mutagenèse est également à prendre en compte. En effet, la modification d'un nombre élevé de nucléotides (plus de 3-4 bases à la suite) peut rendre difficile l'appariement des amorces dégénérées. L'amplification est ici effectuée en présence d'une multitude d'amorces différentes, et une compétition entre ces dernières est donc à prendre en compte. Parmi ces amorces, certaines vont présenter un nombre plus faible de bases non appariées à la matrice initiale, et les mutants correspondants seront par conséquent plus représentés après amplification. Cela peut

conduire à l'absence de certaines séquences ciblées après amplification, ou nécessiter la production d'un nombre plus élevé de mutants. Il est donc pertinent de fixer dans la séquence à muter des bases identiques à la séquence initiale. Afin d'assurer la présence de résidus Asp et Glu, nous avons imposé dans les amorces dégénérées un nucléotide permettant d'assurer leur traduction. Ainsi nous avons choisi de fixer G comme première base du codon 2 et A comme seconde base du codon 3. De la même manière, nous avons choisi de restreindre la 3e base de chaque codon (codon 2 : C ou G ; codon 3 : G ou T) afin de diminuer le nombre de séquences protéiques redondantes. Le choix de ces nucléotides permet d'éviter la présence d'amorces trop similaires à la séquence non mutée (GGT AAC) et diminue les chances d'amplification de cette dernière sans influencer la diversité ou la proportion théorique des acides aminés traduits (**Tableau 22**).

Position du codon du site II à muter	Séquence nucléotidique de la CaMΔ$_{I-II}$	Séquence des amorces dégénérées	Bases possibles	Fonction
2	G	G	G	Homologie avec la CaMΔ$_{I-II}$
	G	N	A, T, C, G	/
	T	S	C, G	Réduction du nombre de séquences, non-homologie avec la CaMΔ$_{I-II}$
3	A	N	A, T, C, G	/
	A	A	A	Homologie avec la CaMΔ$_{I-II}$
	C	K	G, T	Réduction du nombre de séquences, non-homologie avec la CaMΔ$_{I-II}$

Tableau 22 : *Conception des amorces dégénérées*

Nous avons ainsi conçu les amorces dégénérées de séquence nucléotidique GNSNAK. Elles permettent de représenter parmi le mélange d'amorces les codons codant 5 résidus possibles en position 2 (A, D, E, G, V ; ou Ala, Asp, Glu, Gly, Val) et 7 en position 3 (D, E, H, K, N, Q, Y ou Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Tyr) du site II, pour un total de 35 combinaisons possibles (**Figure 60B**). Une telle banque permet l'obtention de séquences d'intérêt tout en limitant le nombre de mutants. Il est à noter que la CaMΔ$_{I-II}$ fait partie des 35 mutants visés. La conception de telles amorces implique la présence d'un codon stop parmi les séquences nucléotidiques représentées au niveau du second codon (de par la nature de l'amorce dégénérée choisie). Un mutant contenant le codon stop conduira à une protéine tronquée au niveau du site II qui ne sera pas pertinente à nos travaux. Les codons stop ont pour séquence TAA et TAG. Leur élimination du mélange d'amorce implique de restreindre la première base du codon à A, C et G. Cette restriction implique cependant l'élimination des codons TAT et TAC codant un résidu Tyr, et donc celle de 5 mutants DxYG de notre banque. Le résidu Tyr est utilisé dans le site I pour la mesure de l'affinité du peptide et sa présence dans le site II peut être intéressante à étudier. Nous avons par conséquent choisi de conserver à la fois les séquences codant les mutants DxYG et celles contenant le codon stop.

4. Méthodologie de criblage de la banque de mutants

Le criblage sur protéines purifiées est principalement limité par les étapes de purification et de traitement des échantillons qu'il implique. Il est par conséquent nécessaire en amont d'un tel criblage de mettre au point et d'optimiser un protocole de production et de purification d'un large nombre d'échantillons. La production de protéines est relativement facile à réaliser pour de nombreux échantillons en parallèle (dit travail en batch). L'utilisation de plaques 24 puits permet de réaliser plusieurs cultures de bactéries en parallèle. Ces dernières offrent un volume de culture permettant l'obtention d'une quantité de protéine suffisante pour un potentiel criblage. Nous avons donc principalement travaillé sur la mise au point d'un protocole de purification de protéines en batch, en nous inspirant de protocoles standards de purification de protéine sur colonne couramment utilisés. Ces derniers consistent en l'utilisation d'une étiquette histidine (His-Tag), à savoir une succession de 6 résidus histidine en Nter de la protéine, la rendant affine aux ions Ni^{2+}. Les extraits cellulaires sont élués sur une colonne IMAC (immobilized metal-ion chromatography) contenant des ions Ni^{2+} immobilisés. La protéine peut ainsi être fixée sur cette colonne puis éluée dans la fraction purifiée. Le His-Tag est ensuite clivé de la protéine par l'action de l'enzyme TEV, puis la protéine est de nouveau éluée et obtenue avec une pureté satisfaisante. Si ce type de méthode est fonctionnel, la purification standard sur colonne ne peut traiter qu'un échantillon à la fois et n'est donc pas compatible avec des manipulations de criblage. Nous avons choisi de purifier des protéines en batch par l'utilisation de résine IMAC non fixée sur colonne. Cette dernière consiste en des billes d'agarose fonctionnalisées avec des ions Ni^{2+}, pouvant être utilisées en solution et donc compatibles avec un objectif de criblage. Une telle méthode a été mise au point dans l'équipe (Brémond et al., en préparation), et nous avons choisi de l'adapter à nos travaux (**Figure 61**).

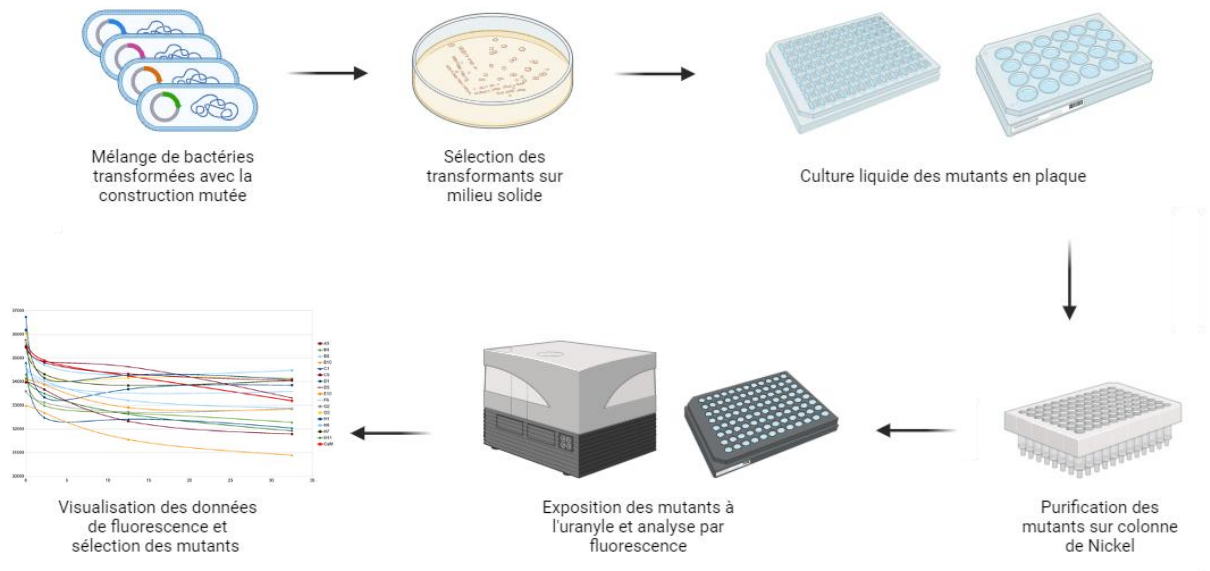


Figure 61 : *Principe de production, purification et criblage de mutants de la CaMΔ$_{I-II}$*

La purification de protéines par un protocole standard sur colonne implique normalement une étape d'élution de la protéine par un tampon contenant de l'imidazole. Ce dernier doit être éliminé par dialyse des échantillons avant ajout de la protéase TEV, une étape incompatible avec des travaux en batch. L'action de cette dernière permet de retrouver la protéine d'intérêt en solution sans étiquette

histidine, qui reste fixée sur la résine. La TEV possède aussi un His-Tag qui se fixe également à la résine. Plusieurs paramètres de cette manipulation ont été étudiés :

- La quantité de résine utilisée doit être optimisée. Une quantité trop faible peut conduire à un rendement en protéine trop faible pour la suite des manipulations, et une quantité trop élevée peut conduire à la contamination des échantillons par des protéines ne possédant pas de His-Tag mais affines aux ions nickel.

- Les paramètres expérimentaux de la coupure TEV sont à déterminer afin d'assurer un taux de coupure satisfaisant, tout en évitant de dégrader la protéine ou de saturer la résine, ce qui pourrait conduire à la présence de TEV non fixée dans les échantillons. L'action de la TEV augmente avec la quantité de TEV, le temps et la température, et différentes conditions expérimentales ont été testées.

Dans le but de collecter un maximum d'informations, ces tests ont été effectués pour la production et purification de la $CaM\Delta_{I-II}$ et du biosenseur SF1.

Afin d'étudier l'influence de la quantité de résine sur la qualité de la purification, nous avons cultivé les cellules exprimant soit la $CaM\Delta_{I-II}$ soit le biosenseur SF1, puis ces dernières ont été lysées par congélation/décongélation. L'étape de purification a été conduite en faisant varier la quantité de résine utilisée de 20 µL à 100 µL par échantillon (**Tableau 23**, **Tableau 24**). La concentration en protéine dans les échantillons a été évaluée après les différentes étapes de lavage avec du tampon Tris et après la coupure TEV. Les échantillons collectés en fin de purification ont également été déposés sur gel d'acrylamide, et l'analyse des bandes observées a permis d'évaluer le rendement en protéine en fin de purification ainsi que la présence d'éventuels contaminants dans les échantillons purifiés (**Figure 62**).

	Résine IMAC		
	20 µL	**50 µL**	**100 µL**
Extraits cellulaires	47,7	43,2	39,5
1x Lavage Tris	22,2	20,3	26,5
3x Lavage Tris	2,78	4,15	12,1
Post TEV	0,87	0,95	1,49

Tableau 23 : *Concentration en protéines (mg/mL) mesurées à différentes étapes de purification de la $CaM\Delta_{I-II}$ en fonction de la quantité de résine.*

	Résine IMAC		
	20 µL	**50 µL**	**100 µL**
Extraits cellulaires	28,9	26,5	25,9
1x Lavage Tris	1,58	2,06	2,53
3x Lavage Tris	0,3	0,65	1,11
Post TEV	0,28	0,381	0,40

Tableau 24 : *Concentration en protéines (mg/mL) mesurées à différentes étapes de purification du biosenseur SF1 en fonction de la quantité de résine.*

Dans le cas de la purification de la CaM$\Delta_{I\text{-}II}$ (**Figure 62**), l'utilisation d'une quantité de résine IMAC allant de 20 µL à 50 µL a permis d'augmenter légèrement le rendement en protéine purifiée, sans observation d'une quantité croissante de contaminants. L'utilisation de 100 µL de résine augmente la concentration en protéine dans les extraits purifiés, mais est associée à la présence de plusieurs contaminants différents. Les bandes observées sur gel d'acrylamide n'ont pas permis d'associer ces contaminants à la présence de TEV (28 kDa), et nous avons supposé qu'ils correspondaient à des protéines endogènes d'*E. coli*. Ces manipulations ont permis d'identifier les conditions optimales pour la purification de la CaM$\Delta_{I\text{-}II}$: l'utilisation de 50 µL de résine pour les extraits cellulaires de cultures de 4 mL induites à 37°C pendant 4 h. Dans le cas de la purification du biosenseur SF1 (**Figure 62**), la concentration globale en protéine dans les échantillons purifiés augmente avec la quantité de résine au travers des conditions testées. En revanche l'analyse sur gel montre que la concentration en biosenseur est maximale pour la purification avec 50 µL de résine, suggérant une fraction moins pure à 100 µL de résine. Tous les extraits contiennent un contaminant d'une masse d'environ 35 kDa, ce qui correspond à la masse de la CaM$\Delta_{I\text{-}II}$ (environ 8 kDa) associée à une des FPs du biosenseur (27 kDa). Aucune des conditions testées n'a permis d'éviter cette dégradation.

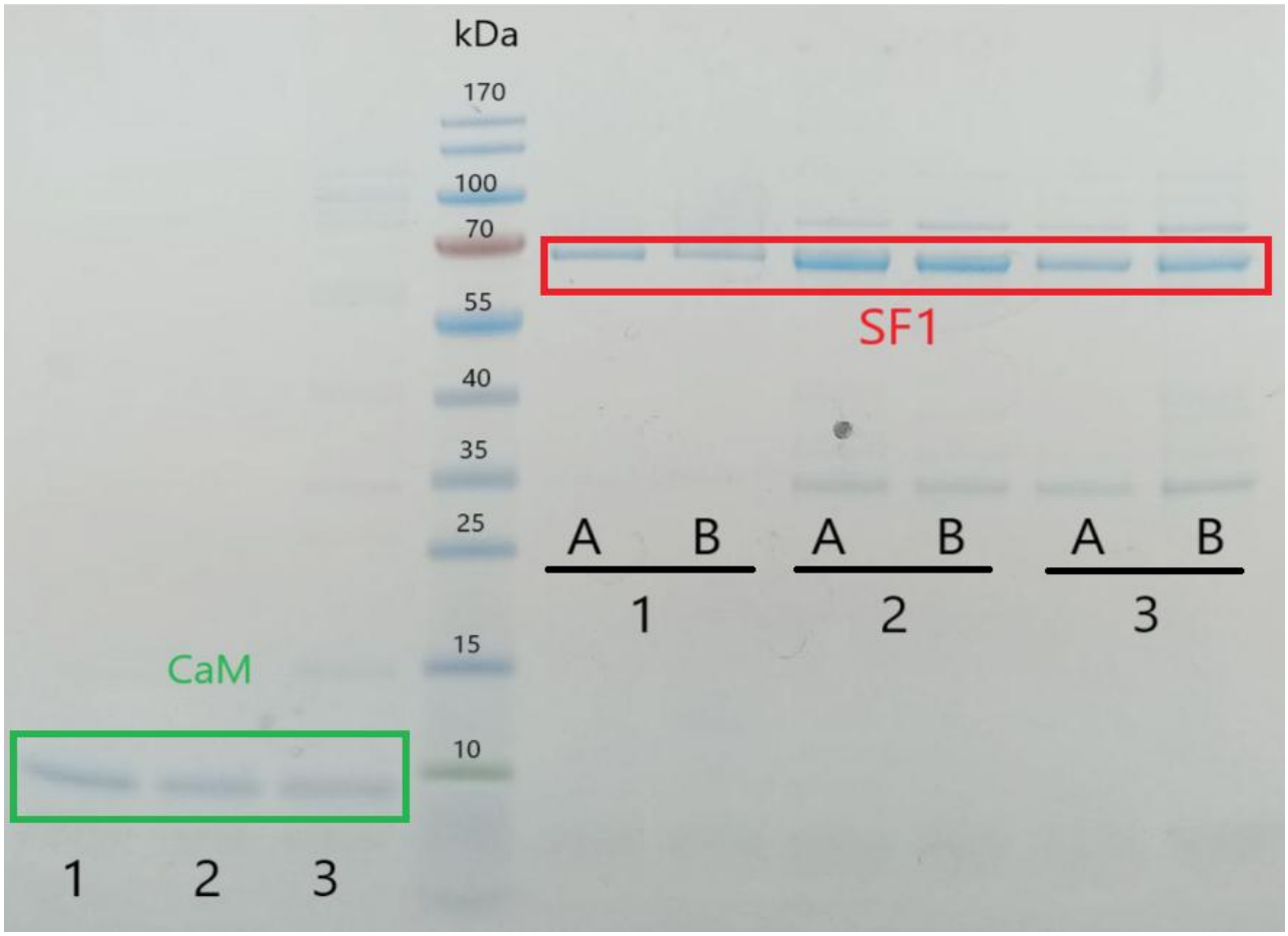


Figure 62 : *Extraits protéiques contenant la CaMΔ$_{I-II}$ (8,4 kDa ; à gauche) ou le biosenseur SF1 (61 kDa ; à droite) purifiés avec 20µL (1), 50 µL (2) ou 100 µL (3) de résine IMAC, et clivés par la TEV pendant 4 h à 4°C (A) et 17°C (B). Pour la* CaMΔ$_{I-II}$*, la coupure TEV a été effectuée pendant 2 h à 17°C.*

Nous avons également étudié l'impact de la durée d'exposition à la TEV. Pour la CaMΔ$_{I-II}$ comme pour le biosenseur SF1, la coupure TEV a été réalisée à la fois à 4°C et 17°C, en faisant varier la durée de contact de 2 h à 24 h. Toutes les conditions testées ont permis d'obtenir un rendement en protéine débarrassée de son étiquette histidine suffisant pour le protocole de criblage envisagé (**Figure 63**). La variation de la durée d'exposition de la protéine à la TEV n'a pas eu d'influence observable sur le rendement en protéine ou sur la composition des fractions purifiées. En particulier l'augmentation de la durée d'exposition à la TEV n'a pas conduit à sa présence dans les fractions purifiées.

Différentes concentrations de TEV ont également été testées, avec un ajout de 9,3 µg ou 18,6 µg (quantité proportionnelle aux conditions standards de purification sur colonne). Ces tests ont montré que l'augmentation de la quantité de TEV et de la température de travail conduisaient toutes deux à une dégradation du biosenseur comme cela peut être observé sur les profils de fluorescence ci-dessous (**Figure 64**).

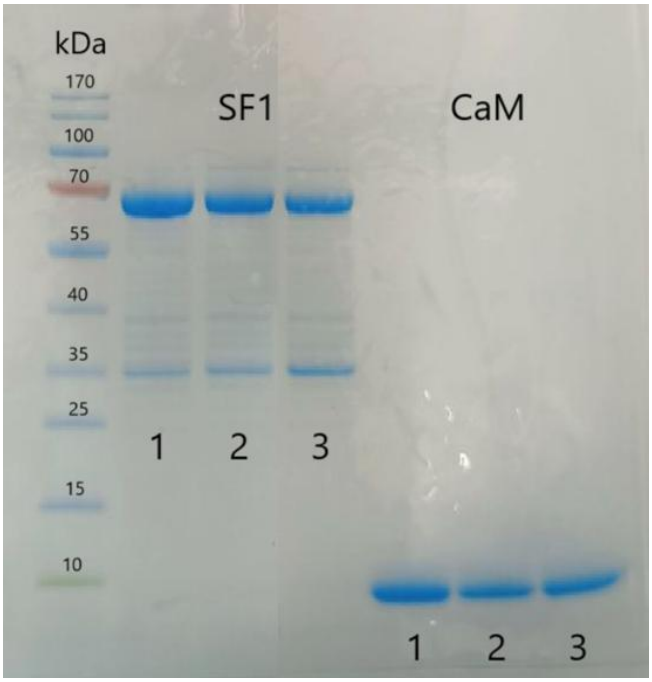


Figure 63 : *Extraits protéiques contenant le biosenseur SF1 (à gauche) ou la CaMΔ$_{I-II}$ (à droite) purifiés en présence de 50 µL de résine et après coupure TEV à 4°C pendant 2 h (1), 4 h (2) et 16 h (3)*

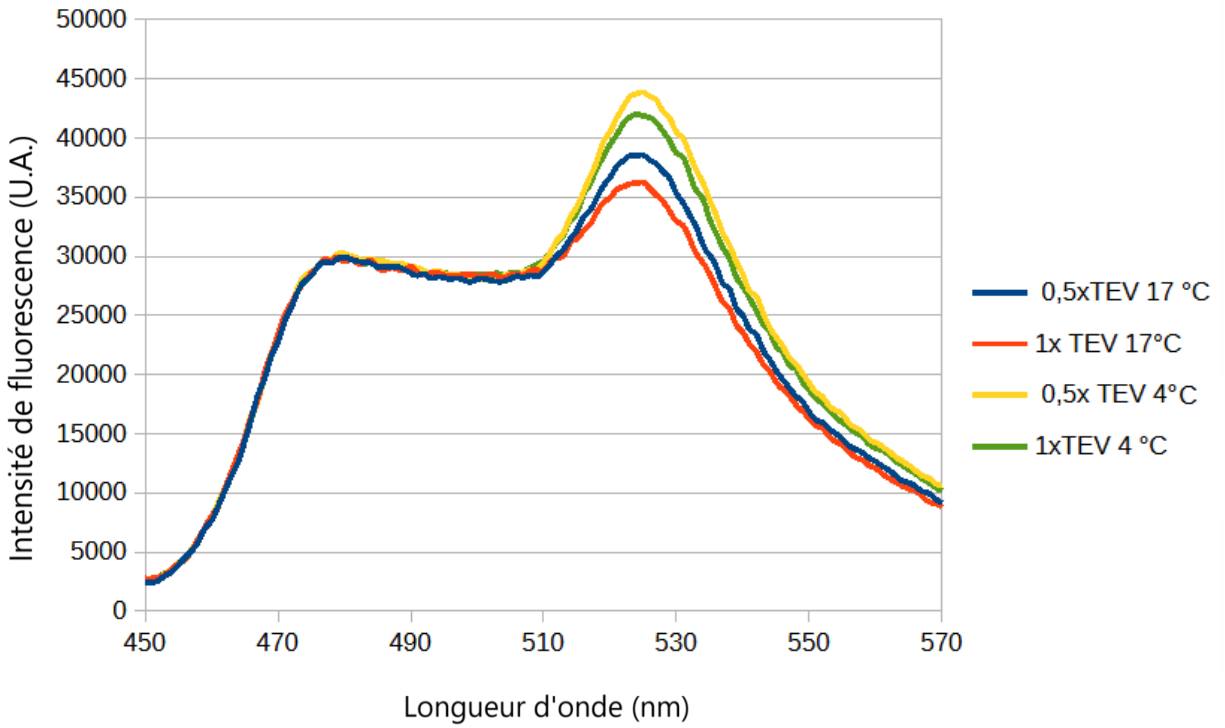


Figure 64 : *Profils de fluorescence d'échantillons du biosenseur SF1 après traitement par la protéase TEV pendant 4h selon différentes conditions expérimentales. Les spectres de fluorescence sont normalisés à 476 nm*

Nous savons également que la CaMΔ$_{I-II}$ et plusieurs de ses variants sont des protéines stables et peu sensibles à des phénomènes de dégradation. Cette propriété est intéressante dans le cadre de manipulations de purification difficiles à effectuer à basse température. De plus, la CaMΔ$_{I-II}$ peut être

produite plus rapidement que le biosenseur SF1, augmentant à terme le débit de criblage. Ainsi nous avons choisi de travailler par la suite sur des protéines dérivées de la CaMΔ_{I-II}, avec comme conditions optimales l'utilisation de 18,6 µg de TEV par échantillon, avec une mise en contact de 2 h à 17°C ou de 16 h (overnight) à 4°C.

5. Création et caractérisation de la banque de mutants

Nous avons choisi d'effectuer la mutagenèse en nous appuyant sur la méthode décrite par Hidalgo et al. (Hidalgo et al., 2008). Les mutants sont obtenus en deux étapes : dans un premier temps, une portion de la CaMΔ_{I-II} est amplifiée en utilisant les amorces dégénérées et une amorce située sur le plasmide pET28a, après le C-terminal du gène codant la CaMΔ_{I-II} (**Figure 65**). Cette PCR permet de former un mélange de mégaprimers, à savoir des amorces de grande taille (plus de 100 paires de bases). Ces derniers portent la mutation souhaitée et sont utilisés dans une deuxième PCR avec une amorce située en amont de l'étiquette His-Tag et spécifique d'un deuxième vecteur pQE30, pour l'amplification de l'ADN de la CaMΔ_{I-II}, conduisant à l'obtention d'un mélange d'ADN mutés, qui sont ensuite clonés et utilisés pour la transformation de cellules.

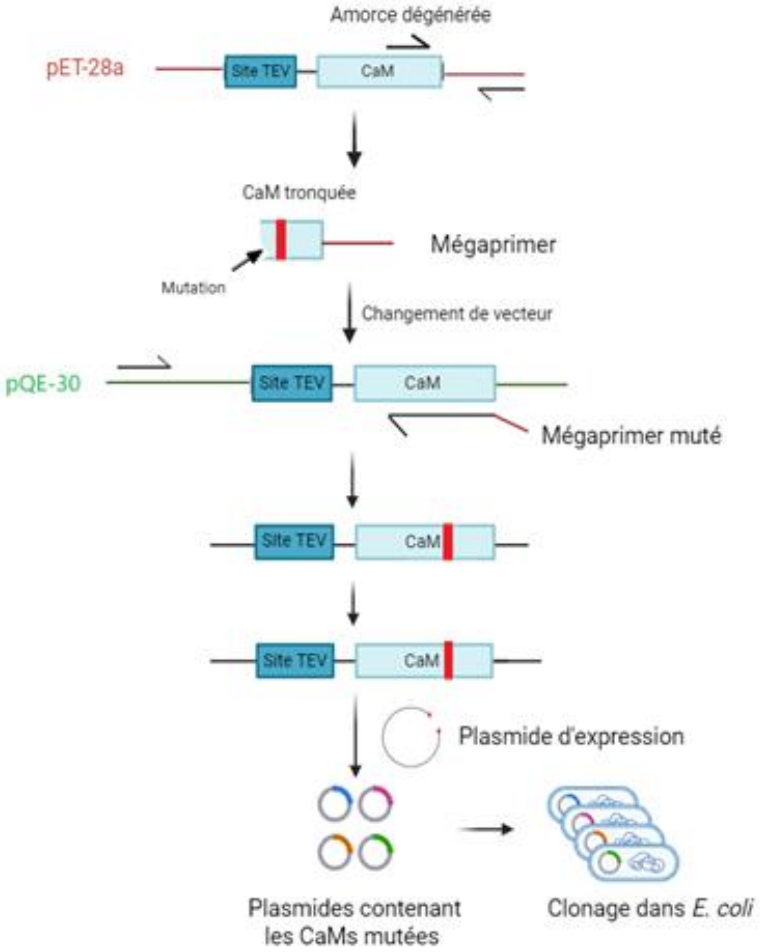


Figure 65 : *Principe de création d'une banque de mutants par mutagenèse semi-dirigée*

Les mégaprimers sont utilisés pour amplifier l'ADN de la CaMΔ$_{I-II}$ mutée à partir d'un vecteur contenant l'ADN codant la CaMΔ$_{I-II}$ mais différent du vecteur initial, pour éviter que l'amplification soit en partie effectuée par hybridation de la partie non mutée de l'amorce avec le vecteur (d'origine pET28b), conduisant à une proportion forte de CaMΔ$_{I-II}$ non mutée. L'ensemble des CaMΔ$_{I-II}$ mutées, constituant la banque de mutants, est ensuite cloné dans le vecteur d'expression final par digestion/ligation et non par PCR, pour éviter l'apparition de mutations pouvant être causées par une réaction de PCR. De plus, un clonage par PCR pourrait conduire, comme pour la production du mégaprimer, à un ADN amplifié ne pouvant pas être séparé de la matrice en raison d'une taille identique. Le clonage par ligation implique l'utilisation d'un vecteur préalablement linéarisé par une enzyme de restriction. Cette linéarisation peut ne pas être totale et il est possible qu'une fraction de vecteur sans insert soit retrouvée dans le produit de ligation, ce qui créerait de nombreux faux positifs lors de l'étape de sélection des colonies transformées sur milieu solide. Afin de contourner cette difficulté, nous avons choisi un vecteur d'expression contenant le gène *sacB*, un gène suicide conduisant à la mort des cellules lors de leur culture en présence de sucrose. Le vecteur doit être digéré par un couple d'enzymes pour éliminer le gène *sacB*, évitant la recircularisation du vecteur sans insert lors de l'étape de ligation. Ainsi, les plasmides obtenus en fin de ligation contiennent soit le gène *sacB* soit celui de la CaMΔ$_{I-II}$ mutée. En ajoutant du sucrose au milieu de culture solide, il est possible de sélectionner les transformants et de permettre la croissance de cellules exprimant un mutant de la CaMΔ$_{I-II}$ exclusivement.

La totalité des séquences envisagées doit être générée par l'amplification par PCR. Les différentes amorces dégénérées présentent une température d'hybridation (Tm) propre à chaque séquence, et influencée par le degré de mésappariement des amorces, à savoir le nombre de bases des amorces qui diffèrent de la séquence initiale. Un degré de mésappariement plus élevé implique l'utilisation d'une température d'hybridation plus faible pour améliorer l'interaction entre l'amorce et la matrice, et ainsi augmenter la quantité d'ADN amplifiée. Nous avons ainsi appliqué une température d'hybridation inférieure de 10°C à celle prédite pour l'amorce. Afin de vérifier la diversité (nombre de séquences différentes représentées) de la banque créée, les transformants étalés sur boîte ont été séquencés. Le séquençage de 116 colonies aléatoires a permis d'observer 30 séquences différentes sur les 35 attendues, et nous avons considéré que la banque était suffisamment représentative des mutants visés (**Tableau 25**).

Résidu 2 / **Résidu 3**	**G**	**V**	**A**	**D**	**E**
D	DGDG	DVDG	DADG	DDDG	DEDG
E	DGEG	DVEG	DAEG	DDEG	DEEG
N	DGNG	DVNG	DANG	DDNG	DENG
K	DGKG	DVKG	DAKG	DDKG	DEKG
H	DGHG	DVHG	DAHG	DDHG	DEHG
Q	DGQG	DVQG	DAQG	DDQG	DEQG
Y	DGYG	DVYG	DAYG	DDYG	DEYG

Tableau 25 : *Récapitulatif des mutants constituant la banque.*

6. Résultat du criblage de la banque de mutants

Nous avons procédé au criblage de 190 colonies exprimant un mutant de la CaMΔ$_{I-II}$ (**Figure 64**). Une telle valeur correspond à plus de 5 fois le nombre de séquences constituant la banque, et permet d'un point de vue statistique de considérer que tous les mutants sont obtenus avec une probabiblité de 95%, et une probabilité équivalente d'obtention de chacun des mutants (Pólya 1930 ; Cf. **Annexe 2**). Les protéines produites ont été purifiées selon le protocole présenté en **Matériels et méthodes Section 2.2.5.2**. Le dosage des échantillons montre que la concentration en protéine varie peu au travers de ces derniers, un élément crucial au criblage. En effet, une forte variation de la concentration pourrait rendre les affinités de différents échantillons peu comparables.

Le criblage sur protéines purifiées est basé sur la lecture de l'intensité de fluorescence d'un résidu Tyr situé dans le site I de la CaMΔ$_{I-II}$, qui diminue avec la fixation d'uranyle. Ainsi, nous avons mesuré la fluorescence des échantillons, en absence et en présence de 3 concentrations croissantes d'uranyle. La compilation des résultats permet de visualiser une courbe de l'intensité de fluorescence (**Figure 66**) et de calculer un pourcentage de baisse de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en uranyle pour chaque mutant (**Tableau 26**). Une forte diminution de la fluorescence à basse concentration d'uranyle suggère une forte affinité du mutant pour le métal. L'utilisation de la CaMΔ$_{I-II}$ comme contrôle interne permet d'identifier les mutants qui semblent plus affins que la protéine de départ.

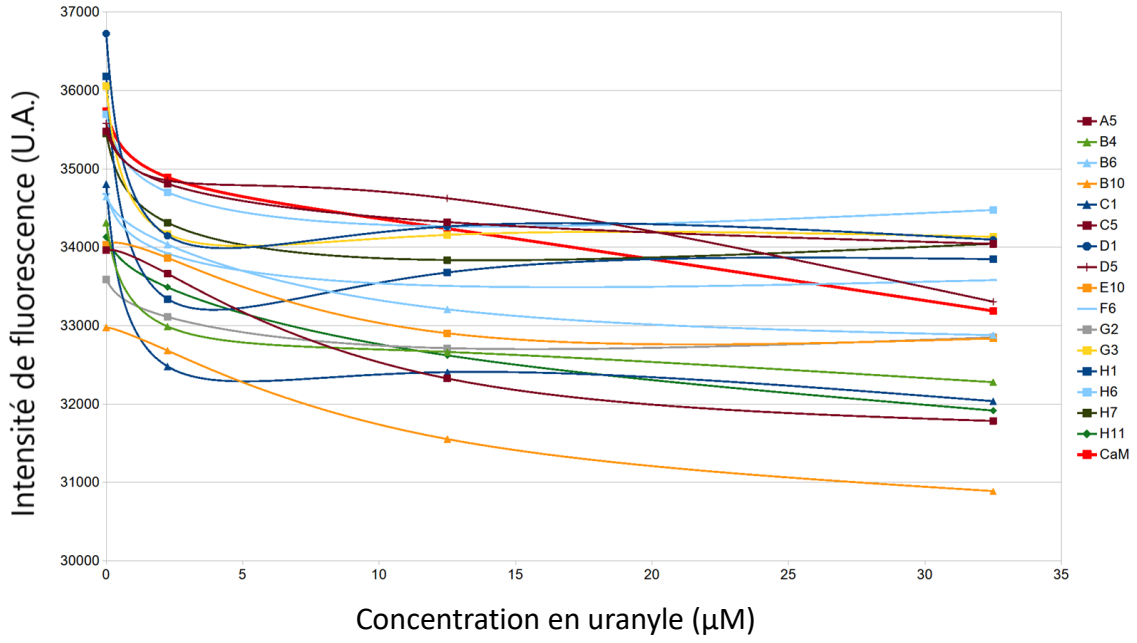


Figure 66 : *Intensités de fluorescence de la CaMΔ$_{I-II}$ et de certains des mutants criblés en fonction de la concentration en uranyle. La CaMΔ$_{I-II}$ est indiquée en rouge. A5, B4, B6 etc. correspondent aux positions dans la plaque de 96 puits contenant les mutants analysés.*

L'analyse de 190 colonies a permis d'identifier 30 échantillons apparemment plus affins pour l'uranyle que la CaMΔ$_{I-II}$. Leur séquençage a permis d'observer 19 séquences différentes, ainsi que 7 doublons, une séquence codant la CaM initiale, une séquence possédant un codon stop. 2 échantillons ont indiqué la présence simultanée de plusieurs séquences qui n'ont pas pu être identifiées. La

présence de 7 doublons renforce l'hypothèse d'une meilleure affinité pour l'uranyle des mutants correspondant. Au terme de ce criblage, plusieurs mutants DExG supposés affins pour l'uranyle n'ont pas été observés, tandis que d'autres ont été observées plusieurs fois (DVDG, DVEG, DENG).

	Concentration en uranyle (µM)		
Mutants	2,25	12,5	32,5
DEKG	0,9	4,8	6,4
DVQG	3,9	4,8	5,9
DGKG	1,8	4,1	5,1
DAYG	6,7	6,9	8,0
DVNG	1,9	3,3	4,0
DADG	7,0	6,7	7,2
DANG	2,0	2,7	6,4
DEQG	0,5	3,3	3,5
DVQG	2,2	3,4	3,2
DGHG	1,4	2,6	2,2
DGEG	5,2	5,3	5,3
DAQG	7,9	6,9	6,4
DGDG	2,8	4,0	3,4
DV-stop	3,2	4,6	4,0
DGYG	1,9	4,4	6,5
CaMΔ_{I-II}	1,0	4,4	5,8

Tableau 26 : *Pourcentages de diminution de fluorescence de la CaMΔ_{I-II} et de certains mutants à différentes concentrations d'uranyle. Les faibles diminutions (Pour 2,25 µM d'uranyle : inférieures à 1 % ; pour 12,5 µM d'uranyle : inférieures à 4,4 % ; Pour 32,5 µM d'uranyle : inférieures à 5,8%) sont indiquées en vert, les diminutions moyennes (Pour 2,25 µM d'uranyle : comprises entre 1 % et 3 % ; pour 12,5 µM d'uranyle : comprises entre 4,4 % et 5 % ; Pour 32,5 µM d'uranyle : comprises entre 5,8% et 6,5 %) en jaune et les fortes diminutions (Pour 2,25 µM d'uranyle : supérieures à 3 % ; pour 12,5 µM d'uranyle : supérieures à 5 %; Pour 32,5 µM d'uranyle : supérieures à 6,5 %) en rouge.*

Ainsi nous avons obtenu un total de 30 mutants sur les 35 possibles : 5 observées par séquençage mais non criblées, 14 criblées et sélectionnées et 11 criblées mais non sélectionnées. Les séquences de mutants identifiés sont indiquées dans le **Tableau 27**. Il est à noter que parmi les 5 mutants absents, 4 ont une séquence contenant le motif DDxG. Ces mutants pourraient être identifiés par le séquençage d'un nombre plus élevé de colonies bactériennes transformées. En raison du temps imparti pour la réalisation de ces travaux, nous avons jugé que des manipulations supplémentaires dans l'optique d'observer la totalité de la banque n'étaient pas justifiées.

Résidu 2 / Résidu 3	G	V	A	D	E
D	**DGDG**	DVDG	**DADG**	**DDDG**	**DEDG**
E	**DGEG**	DVEG	DAEG	DDEG	**DEEG**
N	**DGNG**	DVNG	**DANG**	DDNG	DENG
K	**DGKG**	DVKG	DAKG	DDKG	DEKG
H	DGHG	DVHG	**DAHG**	DDHG	DEHG
Q	**DGQG**	DVQG	**DAQG**	**DDQG**	**DEQG**
Y	**DGYG**	DVYG	**DAYG**	DDYG	DEYG

Tableau 27 : *Récapitulatif des mutants constituant la banque. En vert les mutants sélectionnés par criblage, en jaune les mutants non sélectionnés par criblage, en bleu les mutants observés par séquençage contrôle mais non criblés. Les 5 mutants non observés sont indiqués en blanc. En gras les mutants analysés par fluorescence en cuve (Cf.* ***Section*** *7.).*

7. Mesure de constantes d'affinité des mutants

L'étape de mesure des constantes d'affinité des mutants est limitée en termes de débit (rapidité de traitement des échantillons) et ne permet pas d'analyser la totalité des mutants. Ainsi, nous avons sélectionné 20 mutants dans l'optique de mesurer leurs constantes de dissociation pour l'uranyle, en incluant ceux ayant montré une forte baisse de fluorescence à l'étape de criblage, mais également des mutants présentant une affinité plus faible que la protéine de départ mais possédant une séquence d'intérêt (présence de résidus Asp et Glu). Un des objectifs de notre sélection est d'analyser des mutants par famille de séquences. Nous avons par exemple sélectionné presque tous les mutants de séquence DGxG qui présentent un seul résidu différent de la CaM de départ, et avons éliminé les mutants de séquence DVxG en raison des faibles affinités mesurées à l'étape de criblage. De plus Val est un acide aminé aliphatique comme Ala et nous avons privilégié la série des mutants DAxG.

Les souches bactériennes exprimant les mutants sélectionnés ont été isolées et les protéines correspondantes ont été produites en plus grande quantité par un protocole de production/purification standard. La masse des protéines produites a été contrôlée par spectrométrie de masse afin de confirmer leur séquence (**Figure 67**). Certains échantillons ont permis d'observer deux masses distinctes, indiquant la production simultanée de deux protéines. Cela peut être dû à la transformation de cellules par deux plasmides différents, et les échantillons protéiques ont donc été éliminés. D'autres mutants ont montré une masse différente de celle attendue, que nous avons attribué à une erreur de séquençage à l'étape précédente. A l'issue du contrôle de la masse des mutants, 15 séquences ont été confirmées (notés en caractères gras dans le **Tableau 27**).

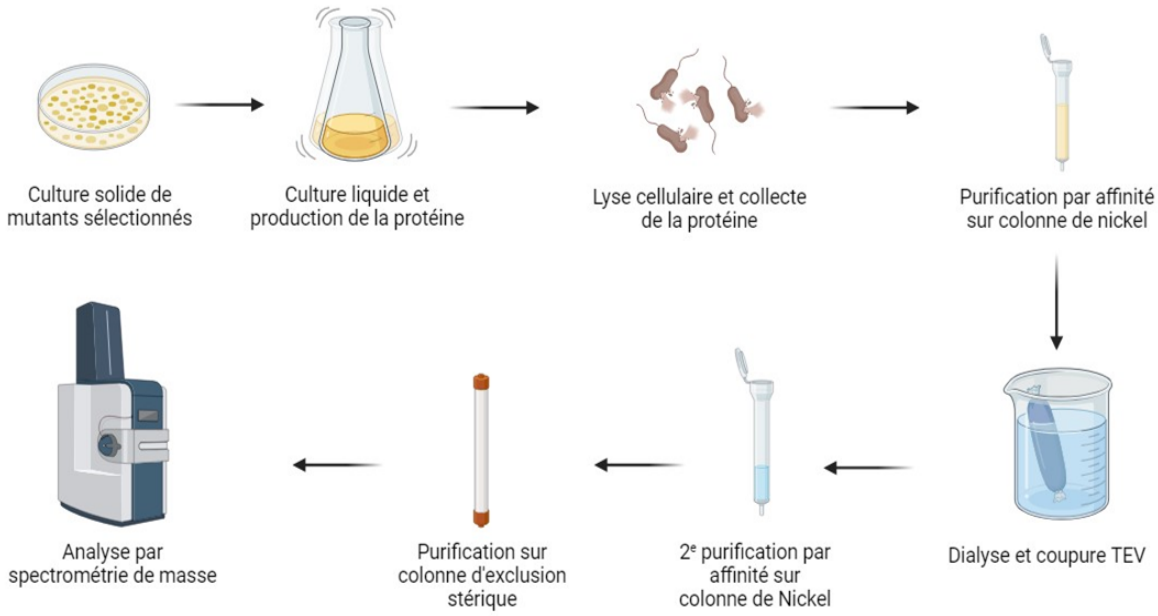


Figure 67 : *Protocole de production et purification des mutants*

Les protéines purifiées doivent être traitées avant analyse, afin d'éliminer des cations divalents susceptibles de rentrer en compétition avec l'uranyle. Ce traitement consiste en la mise en contact de la protéine avec de l'EDTA, qui est ensuite éliminé par une série de centrifugations et lavages en tampon adapté à la manipulation de fluorescence en cuve et dépourvu de cations divalents.

La mesure des constantes de dissociation des protéines consiste à mesurer la fluorescence à 302 nm du résidu Tyr du site I à différentes concentrations d'uranyle, et en présence d'un compétiteur, l'IDA (acide iminodiacétique), qui assure la stabilité de l'uranyle en solution et permet le calcul d'une constante de dissociation conditionnelle Kd. Pour cela, la fluorescence de la protéine est mesurée à des concentrations d'uranyle connues jusqu'à observer un plateau indiquant la saturation de la protéine (**Figure 68** ; **Figure 69**). Les données collectées sont traitées par le logiciel ReactLab, selon un modèle d'interaction à 2 sites qui permet en renseignant les différents paramètres de l'expérience de calculer les constantes spécifiques à la fixation du 1er et 2e cation Kd_1 et Kd_2 (Cf. **Annexe 3**).

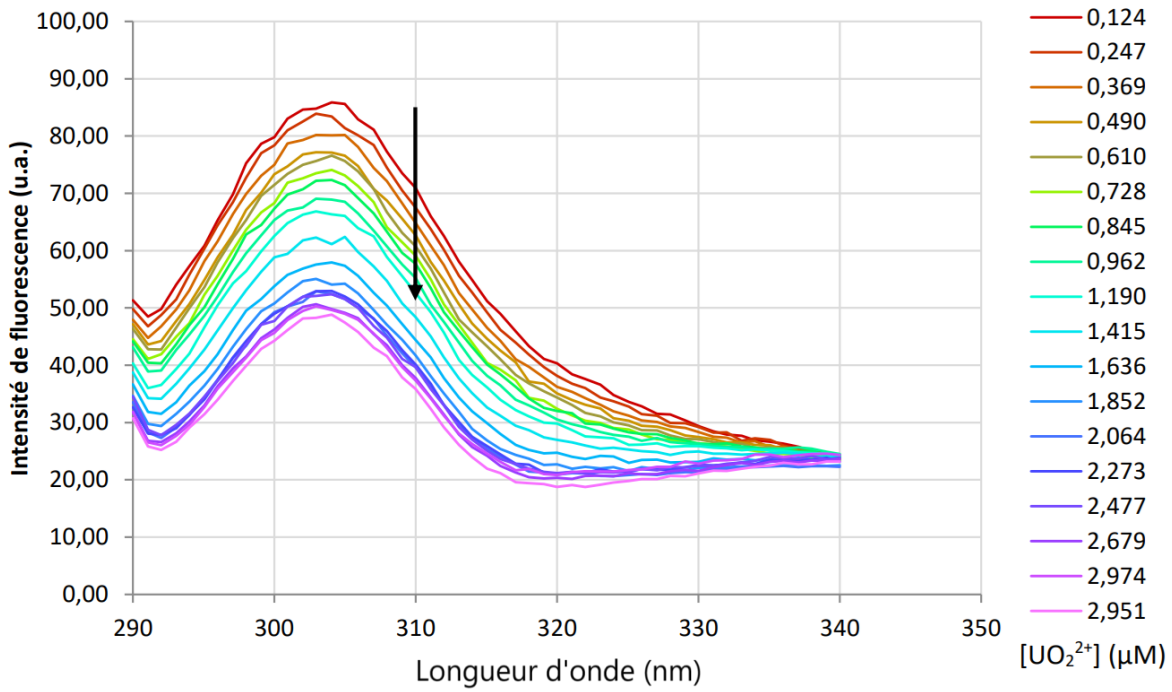


Figure 68 : *Profils de fluorescence de la CaMΔ$_{I-II}$ obtenus en présence de concentrations croissantes en uranyle.*

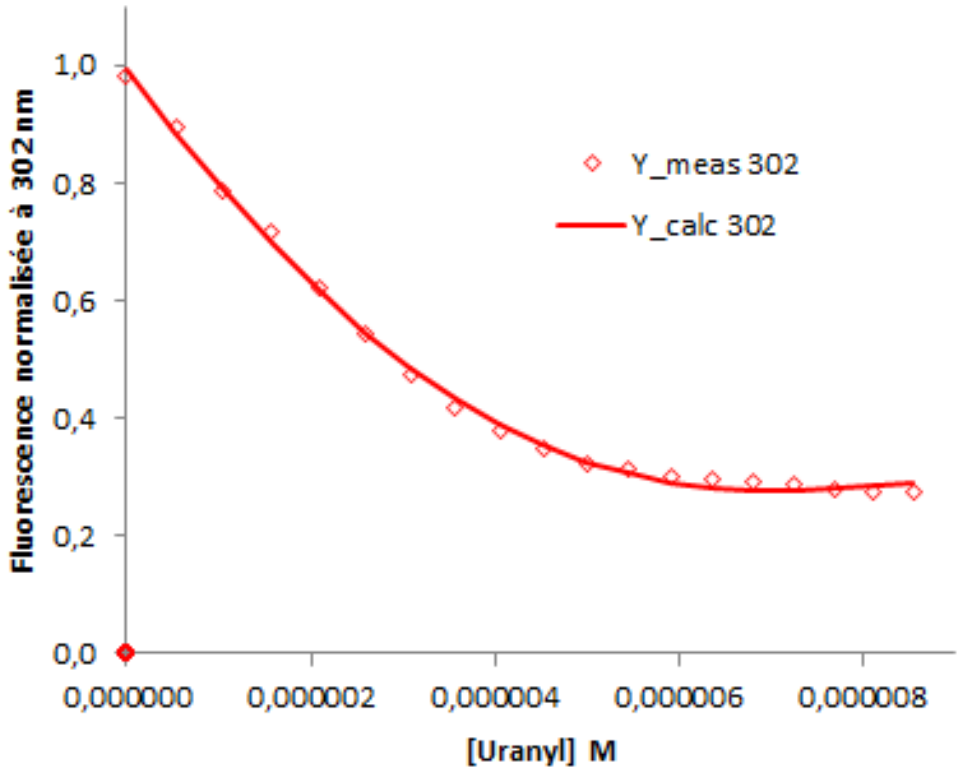


Figure 69 : *Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm de la CaMΔ$_{I-II}$ en fonction de la concentration en uranyle. Le traitement mathématique de ces données permet de calculer les Kds de la protéine pour l'uranyle.*

Nous avons analysé les 15 mutants validés en spectrométrie de masse (**Tableau 28**). La $CaM\Delta_{I-II}$ a été utilisée comme contrôle pour pouvoir comparer ses Kd à ceux des mutants. Les valeurs des Kd_1 et Kd_2 des mutants sont rassemblés et dans le **Tableau 29**. Il est à noter que 4 mutants (DAYG, DEEG, DGDG et DGEG) ne sont pas représentés, car leur analyse n'a pas permis le calcul des constantes d'affinité, malgré des courbes de baisse de fluorescence satisfaisantes.

Mutants analysés par fluorescence en cuve	
DAxG	DADG, DAHG, DANG, DAQG, DAYG
DDxD	DDDG, DDQG
DExD	DEDG, DEEG, DEQG
DGxG	DGDG, DGEG, DGKG, DGQG, DGYG
DVxD	/

Tableau 28 : *Liste des mutants analysés par fluorescence en cuve*

Mutant	**Kd_1 (nM)**	**Kd_2 (nM)**	**Réplicats**
DGNG ($CaM\Delta_{I-II}$)	5,54 ± 2,5	36,2 ± 4.8	3
DADG	**2,71**	**11,6**	1
DAHG	**1,96** ± 0.7	41,9 ± 7.6	3
DANG	**1,20** ± 0.3	38,6 ± 17.4	3
DAQG	**2,15** ± 2	56,7 ± 21.5	5
DDDG	5,72 ± 3.8	**5,68** ± 5.1	3
DDQG	**2,06**	46,8	1
DEDG	3,75	**7,72**	1
DEQG	**2,63** ± 2.4	22,7 ± 16.7	5
DGKG	7,65 ± 2.2	37,2 ± 6.9	3
DGQG	3,39 ± 1.2	38,2 ± 2.5	3
DGYG	**1,67** ± 1.4	60,1 ± 23.1	2

Tableau 29 : *Valeurs de Kd_1 et Kd_2 obtenues lors de l'analyse de la $CaM\Delta_{I-II}$ et de 11 mutants. Les améliorations notables sont indiquées en gras.*

La comparaison des valeurs de Kd_1 et Kd_2 obtenues a permis d'observer chez certains mutants une amélioration de l'affinité de la protéine pour l'uranyle soit pour le Kd_1, soit pour let Kd_2, soit pour les deux Kd. Nous avons considéré qu'un Kd différent de celui de la $CaM\Delta_{I-II}$ d'un facteur supérieur à 2 représentait une amélioration significative du Kd. Par exemple le Kd_1 de DGQG n'a pas été considéré comme meilleur par rapport à celui calculé pour la $CaM\Delta_{I-II}$ (3,39 nM et 5,54 nM respectivement).

Au total, 9 des 11 mutants analysés possèdent au moins un Kd amélioré par rapport à la $CaM\Delta_{I-II}$ (**Tableau 30**). Le Kd_1 est amélioré chez les mutants DADG, DAHG, DANG, DAQG, DDQG, DEQG, et DGYG. Le Kd_2 est amélioré chez les mutants DADG, DDDG et DEDG. Parmi ces mutants, la séquence DADG semble améliorer les deux constantes de dissociation. Des tests supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer ces résultats, dans la mesure ou un seul réplicat a été obtenu pour ce mutant. A l'issue de ces travaux, nous avons identifié DADG, DANG, DDDG et DEQG comme étant les plus affins parmi ceux analysés par fluorescence en cuve.

Kd_1 amélioré	**Kd_2 amélioré**	**Kd_1 et Kd_2 améliorés**
DAHG, DANG, DAQG, DDQG, DEQG, DGYG	DDDG, DEDG	DADG

Tableau 30 : *Amélioration des Kds chez certains mutants analysés par fluorescence en cuve*

Afin de savoir si l'amélioration de l'affinité des peptides pour l'uranyle est retrouvée chez le biosenseur, certains des mutants les plus affins (DANG, DDDG, DEQG) ont été assemblés aux protéines fluorescentes eCFP et citrine pour former les biosenseurs SF3, SF4, SF5 et leur affinité pour l'uranyle a été mesurée (Travaux de Sandrine Sauge-Merle réalisés après ma thèse). Leur analyse a permis d'observer une augmentation de la gamme de réponse et une diminution de la concentration d'uranyle nécessaire pour saturer la réponse des biosenseurs. Il y a donc une amélioration nette de l'affinité pour l'uranyle des trois variants SF3, SF4 et SF5 par comparaison avec le biosenseur SF1 (**Tableau 31**). L'amélioration la plus forte est observée chez le variant SF5. La sensibilité de ce biosenseur à l'uranyle est maximale à des concentrations apparentes en uranyle 2,5 fois plus faibles que celles nécessaires pour saturer le biosenseur SF1. De plus, la mutation affecte de façon positive le repliement de la protéine lors de la fixation de l'uranyle et conduit à un transfert de fluorescence optimisé, ce qui se traduit par un rapport $\Delta R/R$ fortement amélioré, d'un facteur 3,2, par rapport au biosenseur SF1 (Cf. **Annexe 5**).

Biosenseur	**Séquence du site II**	**$\Delta R/R$ (%)**	**Concentration d'uranyle à saturation (µM)**
SF1	DGNGTIDFPE	81,4 ± 8,7	18-20
SF3	DANGTIDFPE	199,8 ± 8,4	15
SF4	DDDGTIDFPE	110,9 ± 7	10
SF5	DEQGTIDFPE	261,4 ± 7	8

Tableau 31 : *Gammes de réponse et concentrations d'uranyle à saturation du biosenseur SF1 et des variants SF3, SF4 et SF5.*

Conclusions / Discussion

Au cours des travaux présentés dans ce chapitre, nous avons cherché à identifier un mutant du site II plus affin pour l'uranyle par comparaison avec la CaMΔ$_{I-II}$. Nous avons pu obtenir les constantes de dissociation Kd$_1$ et Kd$_2$ pour 11 mutants de la CaMΔ$_{I-II}$ (**Tableau 29**), 8 présentant une amélioration du Kd$_1$ ou du Kd$_2$ par rapport à la CaMΔ$_{I-II}$, et 1 séquence améliorant les deux Kd : DADG (**Tableau 30**). L'analyse des constantes de dissociation pour l'uranyle des mutants testés permet d'observer plusieurs tendances :

Tous les mutants testés possédant un résidu Ala en position 2 présentent un Kd$_1$ inférieur à celui de la CaMΔ$_{I-II}$, avec une amélioration d'un facteur 4,6 pour DANG. Ce mutant diffère de la CaMΔ$_{I-II}$ uniquement par un résidu Ala, et possède un Kd$_2$ proche de cette dernière. Cela semble indiquer que l'introduction du résidu Ala offre une nette amélioration du Kd$_1$. Ce dernier est également amélioré par la présence d'un résidu Gln (Q) en position 3 du site II avec 3 mutants DxQg. Cette baisse du Kd$_1$ est associée à une augmentation du Kd$_2$ chez DAQG et DDQG, deux mutants qui améliorent le Kd$_1$ d'un facteur 2. En particulier DAQG présente un des meilleurs Kd$_1$ et un des moins bons Kd$_2$ parmi les mutants testés. Gln est un résidu de grande taille non chargé, et il est possible que de par la coopérativité des sites, l'encombrement du site II par le résidu Gln favorise la fixation du métal dans le site I. Etonnement, DGQG semble nettement plus affin que la protéine de départ DGNG, tandis que DAQG semble nettement moins affin que DANG. Des tests supplémentaires seraient nécessaires pour connaître l'influence de ce résidu sur le Kd global de la protéine.

Le Kd$_2$ est amélioré chez tous les mutants possédant un résidu Asp (D) en position 3 (DADG, DEDG et DGDG), avec une amélioration d'un facteur 6 pour DDDG. Cette observation était attendue au vu du rôle connu du résidu Asp dans la fixation de cations, mais également des travaux d'amélioration du site I réalisés à l'IPM. Cette influence du résidu Asp a également été confirmée par l'amélioration d'un facteur 2 du Kd$_2$ chez DDDG par rapport à DADG. Les valeurs de Kd de DDDG semblent également indiquer que la présence d'un résidu Asp en position 2 améliore l'affinité du peptide pour l'uranyle. Cependant la plupart des mutants DDxG n'ont pas été identifiés, et leur caractérisation serait nécessaire pour conclure quant à l'influence d'un résidu Asp en position 2.

L'influence d'un résidu Glu est difficile à caractériser en se basant sur les résultats obtenus. Les valeurs de Kd des mutants DEDG et DEQG semblent indiquer un rôle positif d'un résidu Glu en position 2, notamment sur le Kd$_2$ En revanche, aucun des 5 autres mutants DExG n'a été identifié à l'étape de criblage. La présence d'un Glu en position 2 n'est donc pas suffisante pour permettre une amélioration significative de l'affinité du peptide pour l'uranyle. Il est cependant à noter que les Kd des mutants DAEG, DDEG, DEEG et DGEG n'ont pas pu être mesurés. Tous sont pertinents de par leur capacité à être comparés avec les mutants DADG, DDDG et avec la CaMΔ$_{I-II}$, et leur analyse permettrait de mieux décrire l'influence d'un résidu Glu en position 3.

Le mutant DGYG est peu comparable aux autres séquences présentées. En effet l'introduction d'un résidu Tyr dans le site II double l'intensité de fluorescence émise, et influence drastiquement la mesure des Kd. Ainsi DGYG a montré une baisse de fluorescence plus importante par comparaison aux autres mutants, qui semble incompatible avec les valeurs de Kd mesurées. Cela est supporté par une forte proportion d'analyses de mutants DxYG n'ayant pas permis le calcul de Kds malgré des courbes de fluorescence exploitables. Il est cependant à noter que l'introduction d'un résidu Tyr dans le site II pourrait comme celui du site I être utilisé comme outil de mesure de fixation de cation et ainsi permettre de mieux étudier l'interaction du site II avec les métaux.

Les valeurs de Kd_1 et Kd_2 mesurées pour les différents mutants pourraient permettre en utilisant les formules indiquées en **Figure 15** de calculer la constante d'affinité intrinsèques du site II des différents mutants en faisant l'hypothèse que la présence du site II n'impacte pas l'affinité du site I pour le métal, et en utilisant la valeur k_I du peptide $CaMYI\Delta_{2\text{-}3}$. Cependant, la constante k_I observée pour ce peptide possédant uniquement le site I seul (Beccia et al., 2022) est nettement supérieure à constante macroscopique K_1 de la $CaM\Delta_{I\text{-}II}$ mesurée dans cette thèse. Cela suggère que la modification des positions 2 et 3 du site II influencent l'interaction du site I avec le métal.

Le protocole de criblage ici présenté est fonctionnel et pourrait être appliqué à un plus grand nombre d'échantillons. Il peut cependant être amélioré à différents niveaux :

- La mutagenèse a permis de générer la majorité des séquences visées. Cependant plusieurs mutants de séquence DDxD n'ont pas été observés, suggérant une hybridation et une amplification moindres lors de l'étape de PCR. Le nombre de séquences composant la banque et le nombre d'échantillons manipulés rendent cependant coûteuse la vérification de l'obtention de la totalité des séquences. Les conditions de mutagenèse semi-dirigée seraient par conséquent à optimiser, soit par la modification des conditions de PCR, soit par la révision des amorces dégénérées.

- Un protocole de criblage amélioré associé à une sélection plus stricte des mutants après criblage pourrait permettre le traitement d'une banque contenant nettement plus de mutants. Une banque de plus grande taille permettrait d'augmenter la diversité des résidus aux positions testées, et ainsi de mieux étudier des motifs d'intérêt tels que DDxG ou DxDG. Une telle approche permettrait également de s'intéresser à la modification d'un nombre plus large de positions du site II, mais resterait tout de même moins performante que le criblage sur cultures de bactéries.

L'affinité améliorée des biosenseurs SF3, SF4 et SF5 par rapport à SF1 démontre qu'une amélioration de l'affinité du site II de la $CaM\Delta_{I\text{-}II}$ est présente chez les biosenseurs, indiquant que notre stratégie d'amélioration du site II est pertinente. Pour mieux comprendre la relation entre les propriétés des peptides 2 sites optimisés et celles des biosenseurs associés, il serait pertinent d'analyser d'une part un biosenseur basé sur le mutant DADG, et d'autre part, d'analyser les données de fluorescence des biosenseurs en utilisant la même stratégie que celle utilisée pour les protéines mutées. Finalement, il serait intéressant de modéliser les différents variants obtenus par des approches de dynamique moléculaire pour établir des relations entre structure et propriété des sites de fixation de l'uranyle.

L'amélioration observée chez les biosenseurs SF3, SF4 et SF5 suggère qu'il devrait être possible de poursuivre l'optimisation de la sensibilité de détection de ces biosenseurs en criblant une plus grande gamme de mutants. Pour cela, il serait intéressant de cribler directement des mutants du biosenseur plutôt que de la $CaM\Delta_{I\text{-}II}$. Cette observation associée à des perspectives de criblage d'une banque plus large suggère fortement l'utilisation d'une approche de criblage sur cultures de bactéries basée sur les travaux présentés en **Chapitre II**.

Conclusions générales et perspectives

L'objectif de cette thèse était le développement d'un biosenseur fluorescent pour la détection d'uranyle en ligne dans l'eau, dans le but de créer un outil capable de participer aux opérations de surveillance environnementale du CEA et plus particulièrement de la Direction des Applications Militaires (DAM). Les travaux réalisés ont permis d'explorer deux axes de recherche : d'une part l'expression du biosenseur SF1 chez le poisson zèbre *Danio rerio*, et d'autre part l'amélioration de l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle, en ciblant l'amélioration du site II, beaucoup moins affin que le site I dans les différents variants disponibles dans l'équipe. Pour ce deuxième axe, deux approches distinctes ont été mises en place pour générer et/ou cribler des mutants du biosenseur. D'une part, l'expression du biosenseur SF1 à la membrane externe d'*E. coli* a été étudiée, dans le but de développer une méthode de criblage de mutants à haut débit directement sur des cultures de bactérie, sans purification des protéines, et d'autre part une approche de mutagénèse ciblée sur la partie N-terminale du site II par un criblage de mutants sur protéines purifiées.

En collaboration avec la plateforme TEFOR, nous avons tenté par l'utilisation de CRISPR-Cas9 d'éditer le génome du poisson zèbre pour y insérer un ADN codant le biosenseur SF1. Nous avons ciblé plusieurs gènes pour l'insertion : *atp1b1b*, *foxi3b* et *krt8*. Malgré l'expression réussie d'une protéine fluorescente après insertion du gène correspondant dans *atp1b1b*, l'insertion du gène codant le biosenseur SF1 a conduit à un phénotype létal pour chacune des positions d'insertions testées. Ces travaux ont permis de mieux connaître les paramètres influençant le succès de l'édition et le développement des individus.

Afin d'exprimer le biosenseur SF1 au niveau de la membrane externe d'*E. coli*, nous avons utilisé le système SpyCatcher/SpyTag (SC/ST) en association avec les protéines carriers AIDA-I, Lpp-OmpA et PgsA. Nous avons développé 3 souches bactériennes exprimant un complexe carrier-SF1, et avons validé la production et la localisation membranaire de ce dernier. L'exposition des cellules exprimant le complexe AIDA-SF1 à l'uranyle a permis d'observer une réponse en fluorescence pour des concentrations en métal de l'ordre du micromolaire, pour une gamme dynamique légèrement plus faible que celle du biosenseur SF1 *in vitro*. Si cette réponse démontre la fonctionnalité d'un tel système, des travaux supplémentaires sont nécessaires avant de pouvoir considérer son utilisation dans un contexte de criblage. Par exemple, la production du complexe carrier-SF1 et la réponse des cellules à l'uranyle varient dans des conditions expérimentales supposées identiques, suggérant que d'autres aspects de la manipulation sont à explorer. Une fois optimisé, ce système pourrait constituer un outil de criblage particulièrement intéressant, qui permettrait par comparaison au criblage sur protéines purifiées de traiter un nombre largement plus élevé de mutants, avec un coût et un temps de travail réduits.

Dans le but d'améliorer l'affinité du biosenseur SF1 pour l'uranyle, nous avons choisi de modifier les positions 2 et 3 du site II de la $CaM\Delta_{I\text{-}II}$. Nous avons conçu, créé et criblé une banque de 35 mutants. La mesure des constantes de dissociation (Kd) pour l'uranyle des mutants identifiés au criblage a montré une amélioration de l'affinité du peptide pour le métal chez 9 des séquences testées. Parmi ces dernières, le Kd_1 (Kd du 1er évènement de fixation d'ion uranyle) est amélioré le plus fortement chez DANG et le Kd_2 (Kd du 2e évènement de fixation d'ion uranyle) chez DDDG, soit un

facteur 4,5 et 7 respectivement par rapport à la CaMΔ_{I-II}. Les séquences identifiées comme les plus affines (DANG, DDDG, DEQG) ont été utilisées pour la conception de variants du biosenseur SF1. L'analyse de ces derniers a permis d'observer une amélioration très significative de la gamme de réponse ($\Delta R/R$) des biosenseurs ainsi qu'une baisse de la concentration d'uranyle de saturation, par comparaison à SF1, correspondant à une meilleure affinité des biosenseurs, qu'il reste à caractériser plus précisément. Notamment, le biosenseur basé sur le mutant DEQG a montré un $\Delta R/R$ de 261,4 %, soit une amélioration d'un facteur 3,2 par rapport à SF1, et une saturation à 8 µM d'uranyle, contre 18-20 µM pour le biosenseur SF1. Ces résultats confirment un rôle important du site II pour les propriétés du biosenseur et valident une démarche d'optimisation du site II de la calmoduline pour développer des biosenseurs affins pour l'uranyle.

Perspectives

Les travaux effectués sur l'édition du génome du poisson zèbre ont montré un rôle important des gènes ciblés dans la toxicité liée à l'insertion. Le choix de nouvelles positions d'édition (de nouveaux gènes cibles) pourrait conduire à l'identification d'une position permettant l'insertion du gène codant le biosenseur sans apparition d'un phénotype létal. Dans le cas contraire, des méthodes alternatives telles que l'insertion du gène associé à un promoteur dans une région moins impactante du génome ou encore l'utilisation de techniques de transgenèse sont envisageables. Il sera ainsi possible de développer une lignée stable de poissons zèbres exprimant le biosenseur SF1. Les individus composant cette lignée pourront être caractérisés et ainsi constituer le premier outil de détection d'uranium biodisponible dans l'eau. Un tel outil pourra participer à la compréhension des phénomènes de biodisponibilité et de toxicité chimique associés à la présence d'uranium dans l'eau.

Une amélioration des propriétés du biosenseur a été constatée pour certains des mutants obtenus lors de cette thèse, aussi bien sur la gamme dynamique de réponse que sur la sensibilité de détection de l'uranium. Ces résultats très encourageants suggèrent qu'il pourrait être encore possible d'améliorer le site II de la CaM par la mutation d'autres positions du site, ainsi qu'en augmentant la diversité des acides aminés introduits. Cela permettrait de développer des outils de détection d'uranyle plus affins, et apporterait de nombreuses informations quant à l'interaction de l'uranyle avec la CaM, mais aussi plus largement avec les motifs EF-Hand et les protéines en contenant. Une telle approche implique la création et le criblage d'une banque de mutants nettement plus large que celle présentée dans cette thèse. Une telle banque pourrait être criblée sur culture de bactéries exprimant un mutant du biosenseur au moyen du système SpyCatcher/SpyTag (SC/ST).

L'expression extracellulaire du biosenseur par le système SC/ST, en permettant un criblage sans purification de la protéine ouvrirait la possibilité d'un criblage à haut débit et plus généralement, au criblage d'interactions entre protéines et analytes incapables de pénétrer les cellules. Un biosenseur amélioré pourra par la suite être utilisé pour de nouvelles séries d'édition du génome de *D. rerio*, pour obtenir un biosenseur de la fraction biodisponible d'uranium.

Références bibliographiques

Ahmed, M. U., Zourob, M., & Tamiya, E. (Éds.). (2019). *Immunosensors*. The Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781788016162

Alberti, G., Pesavento, M., De Maria, L., Cennamo, N., Zeni, L., & Merli, D. (2022). An Optical Fiber Sensor for Uranium Detection in Water. *Biosensors*, *12*(8), 635. https://doi.org/10.3390/bios12080635

Alcorn, C. D., Cox, J. S., Applegarth, L. M. S. G. A., & Tremaine, P. R. (2019). Investigation of Uranyl Sulfate Complexation under Hydrothermal Conditions by Quantitative Raman Spectroscopy and Density Functional Theory. *The Journal of Physical Chemistry B*, *123*(34), 7385-7409. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b01544

Alexandratos, S. D., & Zhu, X. (2007). High-affinity ion-complexing polymer-supported reagents : Immobilized phosphate ligands and their affinity for the uranyl ion. *Reactive and Functional Polymers*, *67*(5), 375-382. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.01.013

Amelung, S., Nerlich, A., Rohde, M., Spellerberg, B., Cole, J. N., Nizet, V., Chhatwal, G. S., & Talay, S. R. (2011). The FbaB-type fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes promotes specific invasion into endothelial cells : Mechanism of S. pyogenes endothelial cell invasion. *Cellular Microbiology*, *13*(8), 1200-1211. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01610.x

Averseng, O., Hagège, A., Taran, F., & Vidaud, C. (2010). Surface Plasmon Resonance for Rapid Screening of Uranyl Affine Proteins. *Analytical Chemistry*, *82*(23), 9797-9802. https://doi.org/10.1021/ac102578y

Bai, Y., Xu, L., Chai, H., Zhou, L., Jiang, G., & Zhang, G. (2022). Recent Advances on DNAzyme-Based Biosensors for Detection of Uranyl. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 882250. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.882250

Balaram, V., Rani, A., & Rathore, D. P. S. (2022). Uranium in groundwater in parts of India and world : A comprehensive review of sources, impact to the environment and human health, analytical techniques, and mitigation technologies. *Geosystems and Geoenvironment*, *1*(2), 100043. https://doi.org/10.1016/j.geogeo.2022.100043

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? *Chemical Research in Toxicology*, *26*(5), 645-653. https://doi.org/10.1021/tx400048u

Bazhenov, S. V., Novoyatlova, U. S., Scheglova, E. S., Prazdnova, E. V., Mazanko, M. S., Kessenikh, A. G., Kononchuk, O. V., Gnuchikh, E. Y., Liu, Y., Al Ebrahim, R., Zavilgelsky, G. B., Chistyakov, V. A., & Manukhov, I. V. (2023). Bacterial lux-biosensors : Constructing, applications, and prospects. *Biosensors and Bioelectronics: X*, *13*, 100323. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100323

Beaulier, C., Dannay, M., Devime, F., Galeone, A., Baggio, C., El Sakkout, N., Raillon, C., Courson, O., Bourguignon, J., Alban, C., & Ravanel, S. (2024). Characterization of a uranium-tolerant green microalga of the genus Coelastrella with high potential for the remediation of metal-polluted waters. *Science of The Total Environment*, *908*, 168195. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168195

Beccia, M. R., Sauge-Merle, S., Brémond, N., Lemaire, D., Henri, P., Battesti, C., Guilbaud, P., Crouzy, S., & Berthomieu, C. (2022). Inter-Site Cooperativity of Calmodulin N-Terminal Domain and Phosphorylation Synergistically Improve the Affinity and Selectivity for Uranyl. *Biomolecules*, *12*(11), 1703. https://doi.org/10.3390/biom12111703

Beccia, M. R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Brémond, N., Pardoux, R., Blangy, S., Guilbaud, P., & Berthomieu, C. (2015). Thermodynamics of Calcium binding to the Calmodulin N-terminal domain to evaluate site-specific affinity constants and cooperativity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *20*(5), 905-919. https://doi.org/10.1007/s00775-015-1275-1

Beghi, S., Furmanik, M., Jaminon, A., Veltrop, R., Rapp, N., Wichapong, K., Bidar, E., Buschini, A., & Schurgers, L. J. (2022). Calcium Signalling in Heart and Vessels : Role of Calmodulin and Downstream Calmodulin-Dependent Protein Kinases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 16139. https://doi.org/10.3390/ijms232416139

Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., & Strickler, J. E. (2013). To fuse or not to fuse : What is your purpose? *Protein Science*, *22*(11), 1466-1477. https://doi.org/10.1002/pro.2356

Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., & Kanki, J. P. (2005). Making Waves in Cancer Research : New Models in the Zebrafish. *BioTechniques*, *39*(2), 227-237. https://doi.org/10.2144/05392RV02

Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V., & Nitsche, H. (1998). Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *Journal of Alloys and Compounds*, *271-273*, 201-205. https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00054-1

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1-8. https://doi.org/10.1042/EBC20150001

Bjørklund, G., Christophersen, O. A., Chirumbolo, S., Selinus, O., & Aaseth, J. (2017). Recent aspects of uranium toxicology in medical geology. *Environmental Research*, *156*, 526-533. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.010

Blake, D. A., Ban, B., Li, X., Blake, R. C., Jairo, G. A., & Sun, Y. (2015). Re-Engineering Antibodies for Optimum Performance in Uranium Sensors. In B. J. Merkel & A. Arab (Éds.), *Uranium—Past and Future Challenges* (p. 529-536). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11059-2_60

Blake, D. A., Jones, R. M., Blake, R. C., Pavlov, A. R., Darwish, I. A., & Yu, H. (2001). Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(9-12), 799-809. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00223-8

Blake, R. C., Pavlov, A. R., Khosraviani, M., Ensley, H. E., Kiefer, G. E., Yu, H., Li, X., & Blake, D. A. (2004). Novel Monoclonal Antibodies with Specificity for Chelated Uranium(VI) : Isolation and Binding Properties. *Bioconjugate Chemistry*, *15*(5), 1125-1136. https://doi.org/10.1021/bc049889p

Bleise, A., Danesi, P. R., & Burkart, W. (2003). Properties, use and health effects of depleted uranium (DU) : A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, *64*(2-3), 93-112. https://doi.org/10.1016/S0265-931X(02)00041-3

Bousse, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *34*(1-3), 270-275. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(96)01906-5

Brina, Rossella., & Miller, A. G. (1992). Direct detection of trace levels of uranium by laser-induced kinetic phosphorimetry. *Analytical Chemistry*, *64*(13), 1413-1418. https://doi.org/10.1021/ac00037a020

Brulfert, F. (2016). *Mécanisme d'interaction des actinides avec une proteine : La calmoduline.*

Brutesco C., Prévéral S., Escoffier C., Descamps E., Prudent E., Cayron J., Dumas L., Ricquebourg M., Adryanczyk-Perrier G., de Groot A., Garcia D., Rodrigue A., Pignol D., Ginet N. Bacterial host and reporter gene optimization for genetically encoded whole cell biosensors. *Environ*

Sci Pollut Res Int. 2017 Jan;24(1):52-65. doi: 10.1007/s11356-016-6952-2. Epub 2016 May 27. PMID: 27234828.

Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., & O'Kennedy, R. (2009). Antibody-Based Sensors : Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. *Sensors*, *9*(6), 4407-4445. https://doi.org/10.3390/s90604407

Cali, K., Tuccori, E., & Persaud, K. C. (2020). Gravimetric biosensors. In *Methods in Enzymology* (Vol. 642, p. 435-468). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.05.010

Cao, R.-G., Zhu, B., Li, J., & Xu, D. (2009). Oligonucleotides-based biosensors with high sensitivity and selectivity for mercury using electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochemistry Communications*, *11*(9), 1815-1818. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.07.029

Carugo, O. (2018). Structural features of uranium-protein complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *189*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.08.014

Cha, W., Kim, H.-K., Cho, H., Cho, H.-R., Jung, E. C., & Lee, S. Y. (2020). Studies of aqueous U(IV) equilibrium and nanoparticle formation kinetics using spectrophotometric reaction modeling analysis. *RSC Advances*, *10*(60), 36723-36733. https://doi.org/10.1039/D0RA05352J

Chai, F., Cheng, D., Nasu, Y., Terai, T., & Campbell, R. E. (2023). Maximizing the performance of protein-based fluorescent biosensors. *Biochemical Society Transactions*, *51*(4), 1585-1595. https://doi.org/10.1042/BST20221413

Chang, A., Chau, V., Landas, J., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods*, 22-25.

Chang, X., Huo, Y., Zhao, C., Sun, W., Song, Z., Qi, Z., Wang, J., Jia, C., & Guo, X. (2023). Single-Molecule Electronic Biosensors : Principles and Applications. *Advanced Sensor Research*, *2*(5), 2200084. https://doi.org/10.1002/adsr.202200084

Charles, A. L., Markich, S. J., Stauber, J. L., & De Filippis, L. F. (2002). The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (Chlorella sp.). *Aquatic Toxicology*, *60*(1-2), 61-73. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00260-0

Charpentier, E., & Marraffini, L. A. (2014). Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Current Opinion in Microbiology*, *19*, 114-119. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.07.001

Chauhan, S., Dahiya, D., Sharma, V., Khan, N., Chaurasia, D., Nadda, A. K., Varjani, S., Pandey, A., & Bhargava, P. C. (2022). Advances from conventional to real time detection of heavy metal(loid)s for water monitoring : An overview of biosensing applications. *Chemosphere*, *307*, 136124. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136124

Chen, Y., Guo, Y., Liu, Y., Xiang, Y., Liu, G., Zhang, Q., Yin, Y., Cai, Y., & Jiang, G. (2023). Advances in bacterial whole-cell biosensors for the detection of bioavailable mercury : A review. *Science of The Total Environment*, *868*, 161709. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161709

Cheung, W. Y. (1980). Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. *Science*, *207*(4426), 19-27. https://doi.org/10.1126/science.6243188

Choi, O., Deng, K. K., Kim, N.-J., Ross, L., Surampalli, R. Y., & Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, *42*(12), 3066-3074. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.021

Chou, J. J., Li, S., Klee, C. B., & Bax, A. (2001). Solution structure of Ca2+–calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nature Structural Biology*, *8*(11), 990-997. https://doi.org/10.1038/nsb1101-990

Cinelli, G., Tondeur, F., Dehandschutter, B., Bossew, P., Tollefsen, T., & De Cort, M. (2017). Mapping uranium concentration in soil : Belgian experience towards a European map. *Journal of Environmental Radioactivity*, *166*, 220-234. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.04.026

Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *102*(1), 29-45. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

Conroy, D. J. R., Millner, P. A., Stewart, D. I., & Pollmann, K. (2010). Biosensing for the Environment and Defence : Aqueous Uranyl Detection Using Bacterial Surface Layer Proteins. *Sensors*, *10*(5), 4739-4755. https://doi.org/10.3390/s100504739

Coppola, A., Lombari, P., Mazzella, E., Capolongo, G., Simeoni, M., Perna, A. F., Ingrosso, D., & Borriello, M. (2023). Zebrafish as a Model of Cardiac Pathology and Toxicity : Spotlight on Uremic Toxins. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5656. https://doi.org/10.3390/ijms24065656

Craft, E. S., Abu-Qare, A. W., Flaherty, M. M., Garofolo, M. C., Rincavage, H. L., & Abou-Donia, M. B. (2004). Depleted and natural uranium : chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, *7*(4), 297-317. https://doi.org/10.1080/10937400490452714

Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 91-100. https://doi.org/10.1042/EBC20150010

Das, P., Das, M., Chinnadayyala, S. R., Singha, I. M., & Goswami, P. (2016). Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 386-397. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.055

deNeufville, J. P., Kasdan, A., & Chimenti, R. J. L. (1981). Selective detection of uranium by laser-induced fluorescence : A potential remote-sensing technique 1: Optical characteristics of uranyl geologic targets. *Applied Optics*, *20*(8), 1279. https://doi.org/10.1364/AO.20.001279

Dong, W., & Brooks, S. C. (2008). Formation of Aqueous $MgUO_2(CO_3)_3^{2-}$ Complex and Uranium Anion Exchange Mechanism onto an Exchange Resin. *Environmental Science & Technology*, *42*(6), 1979-1983. https://doi.org/10.1021/es0711563

Dooley, K. (2000). Zebrafish : A model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, *10*(3), 252-256. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. https://doi.org/10.1126/science.1258096

Duan, Y. F., Ning, Y., Song, Y., & Deng, L. (2014). Fluorescent aptasensor for the determination of Salmonella typhimurium based on a graphene oxide platform. *Microchimica Acta*, *181*(5-6), 647-653. https://doi.org/10.1007/s00604-014-1170-4

Duff, M. R., & Kumar, C. V. (2006). Site-Selective Photocleavage of Proteins by Uranyl Ions. *Angewandte Chemie International Edition*, *45*(1), 137-139. https://doi.org/10.1002/anie.200502344

Duhan, S. S., Khyalia, P., Solanki, P., & Laura, J. S. (2023). Uranium Sources, Uptake, Translocation in the soil-plant System and Its Toxicity in Plants and Humans : A Critical Review. *Oriental Journal Of Chemistry*, *39*(2), 303-319. https://doi.org/10.13005/ojc/390210

Ebbs, S. D., Brady, D. J., & Kochian, L. V. (1998). Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *Journal of Experimental Botany*, *49*(324), 1183-1190. https://doi.org/10.1093/jxb/49.324.1183

Economou, A., Karapetis, S. K., Nikoleli, G., Nikolelis, D. P., Bratakou, S., & Varzakas, T. H. (2017). Enzyme-based Sensors. In F. Toldrá & L. M. L. Nollet (Éds.), *Advances in Food Diagnostics* (1re éd., p. 231-250). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119105916.ch9

El Hayek, E., Torres, C., Rodriguez-Freire, L., Blake, J. M., De Vore, C. L., Brearley, A. J., Spilde, M. N., Cabaniss, S., Ali, A.-M. S., & Cerrato, J. M. (2018). Effect of Calcium on the Bioavailability of Dissolved Uranium(VI) in Plant Roots under Circumneutral pH. *Environmental Science & Technology*, *52*(22), 13089-13098. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02724

Esaki, M., Hoshijima, K., Nakamura, N., Munakata, K., Tanaka, M., Ookata, K., Asakawa, K., Kawakami, K., Wang, W., Weinberg, E. S., & Hirose, S. (2009). Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H+-ATPase in the skin of zebrafish larvae. *Developmental Biology*, *329*(1), 116-129. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.02.026

Fan, Y.-F., Guo, Z.-B., & Ge, G.-B. (2023). Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. *Biosensors*, *13*(4), 476. https://doi.org/10.3390/bios13040476

Farzin, L., Shamsipur, M., Samandari, L., & Sheibani, S. (2020). HIV biosensors for early diagnosis of infection : The intertwine of nanotechnology with sensing strategies. *Talanta*, *206*, 120201. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120201

Feng, H., Beck, J., Nassal, M., & Hu, K. (2011). A SELEX-Screened Aptamer of Human Hepatitis B Virus RNA Encapsidation Signal Suppresses Viral Replication. *PLoS ONE*, *6*(11), e27862. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027862

Fernández, H., Arévalo, F. J., Granero, A. M., Robledo, S. N., Nieto, C. H. D., Riberi, W. I., & Zon, M. A. (2017). Electrochemical Biosensors for the Determination of Toxic Substances Related to Food Safety Developed in South America : Mycotoxins and Herbicides. *Chemosensors*, *5*(3), 23. https://doi.org/10.3390/chemosensors5030023

Fogel, R., Limson, J., & Seshia, A. A. (2016). Acoustic biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 101-110. https://doi.org/10.1042/EBC20150011

Gad, S., & Ayakar, S. (2021). Protein scaffolds : A tool for multi-enzyme assembly. *Biotechnology Reports*, *32*, e00670. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00670

Gallus, S., Mittmann, E., & Rabe, K. S. (2022). A Modular System for the Rapid Comparison of Different Membrane Anchors for Surface Display on *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, *23*(2), e202100472. https://doi.org/10.1002/cbic.202100472

Gallus, S., Peschke, T., Paulsen, M., Burgahn, T., Niemeyer, C. M., & Rabe, K. S. (2020). Surface Display of Complex Enzymes by *in Situ* SpyCatcher-SpyTag Interaction. *ChemBioChem*, *21*(15), 2126-2131. https://doi.org/10.1002/cbic.202000102

Greene, B., Henzl, M. T., Hosea, J. M., & Darnall, D. W. (1986). Elimination of bicarbonate interference in the binding of U(VI) in mill-waters to freeze-dried chlorella vulgaris. *Biotechnology and Bioengineering*, *28*(5), 764-767. https://doi.org/10.1002/bit.260280519

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors—Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, *8*(3), 1400-1458. https://doi.org/10.3390/s80314000

Guéguen, Y., & Frerejacques, M. (2022). Review of Knowledge of Uranium-Induced Kidney Toxicity for the Development of an Adverse Outcome Pathway to Renal Impairment. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(8), 4397. https://doi.org/10.3390/ijms23084397

Gui, Q., Lawson, T., Shan, S., Yan, L., & Liu, Y. (2017). The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors*, *17*(7), 1623. https://doi.org/10.3390/s17071623

Habermann, E., Crowell, K., & Janicki, P. (1983). Lead and other metals can substitute for Ca2+ in calmodulin. *Archives of Toxicology*, *54*(1), 61-70. https://doi.org/10.1007/BF00277816

Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M., & Virta, M. (2002). Reporter Genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors. *Analytical Biochemistry*, *301*(2), 235-242. https://doi.org/10.1006/abio.2001.5517

Halling, D. B., Liebeskind, B. J., Hall, A. W., & Aldrich, R. W. (2016). Conserved properties of individual Ca $^{2+}$ -binding sites in calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(9). https://doi.org/10.1073/pnas.1600385113

Hasan, M. T., Friedrich, R. W., Euler, T., Larkum, M. E., Giese, G., Both, M., Duebel, J., Waters, J., Bujard, H., Griesbeck, O., Tsien, R. Y., Nagai, T., Miyawaki, A., & Denk, W. (2004). Functional Fluorescent Ca2+ Indicator Proteins in Transgenic Mice under TET Control. *PLoS Biology*, *2*(6), e163. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020163

He, M.-Y., Lin, Y.-J., Kao, Y.-L., Kuo, P., Grauffel, C., Lim, C., Cheng, Y.-S., & Chou, H.-H. D. (2021). Sensitive and Specific Cadmium Biosensor Developed by Reconfiguring Metal Transport and Leveraging Natural Gene Repositories. *ACS Sensors*, *6*(3), 995-1002. https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02204

He, X., Wang, S., Liu, Y., & Wang, X. (2019). Ultra-sensitive detection of uranyl ions with a specially designed high-efficiency SERS-based microfluidic device. *Science China Chemistry*, *62*(8), 1064-1071. https://doi.org/10.1007/s11426-019-9468-x

Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J. E., Bienkowski, P. R., White, D. C., & Sayler, G. S. (1994). Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(5), 1487-1494. https://doi.org/10.1128/aem.60.5.1487-1494.1994

Helassa, N., Zhang, X., Conte, I., Scaringi, J., Esposito, E., Bradley, J., Carter, T., Ogden, D., Morad, M., & Török, K. (2015). Fast-Response Calmodulin-Based Fluorescent Indicators Reveal Rapid Intracellular Calcium Dynamics. *Scientific Reports*, *5*(1), 15978. https://doi.org/10.1038/srep15978

Hidalgo, A., Schließmann, A., Molina, R., Hermoso, J., & Bornscheuer, U. T. (2008). A one-pot, simple methodology for cassette randomisation and recombination for focused directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection*, *21*(9), 567-576. https://doi.org/10.1093/protein/gzn034

Higashijima, S., Masino, M. A., Mandel, G., & Fetcho, J. R. (2003). Imaging Neuronal Activity During Zebrafish Behavior With a Genetically Encoded Calcium Indicator. *Journal of Neurophysiology*, *90*(6), 3986-3997. https://doi.org/10.1152/jn.00576.2003

Hillson, N. J., Hu, P., Andersen, G. L., & Shapiro, L. (2007). *Caulobacter crescentus* as a Whole-Cell Uranium Biosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(23), 7615-7621. https://doi.org/10.1128/AEM.01566-07

Himri, M. E., Pastor, A., & De La Guardia, M. (2000). Determination of uranium in tap water by ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *367*(2), 151-156. https://doi.org/10.1007/s002160051616

Hirose, K., & Sugimara, Y. (1981). Concentration of Uranium and the Activity'Ratio of 234U/238U in Surface Air：Effect of Atmospheric Burn-up of Cosmos・954. 317－322.

Hochreiter, B., Pardo-Garcia, A., & Schmid, J. (2015). Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors*, *15*(10), 26281-26314. https://doi.org/10.3390/s151026281

Hogan, A., Vandam, R., Markich, S., & Camilleri, C. (2005). Chronic toxicity of uranium to a tropical green alga (sp.) in natural waters and the influence of dissolved organic carbon. *Aquatic Toxicology*, *75*(4), 343-353. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.07.012

Holzinger, M., Le Goff, A., & Cosnier, S. (2014). Nanomaterials for biosensing applications : A review. *Frontiers in Chemistry*, *2*. https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00063

Homma-Takeda, Numako, Kitahara, Yoshida, Oikawa, Terada, Kokubo, & Shimada. (2019). Phosphorus Localization and Its Involvement in the Formation of Concentrated Uranium in the Renal Proximal Tubules of Rats Exposed to Uranyl Acetate. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19), 4677. https://doi.org/10.3390/ijms20194677

Houpert, P., Frelon, S., Monleau, M., Bussy, C., Chazel, V., & Paquet, F. (2007). Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiation Protection Dosimetry*, *127*(1-4), 86-89. https://doi.org/10.1093/rpd/ncm255

Hu, Q., Zheng, J., Xu, X. N., Gu, C., & Li, W. (2022). Uranium induces kidney cells apoptosis via reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and inhibition of PI3K / AKT / mTOR signaling in culture. *Environmental Toxicology*, *37*(4), 899-909. https://doi.org/10.1002/tox.23453

Huang, G. L., & Clubb, R. T. (2017). Progress Towards Engineering Microbial Surfaces to Degrade Biomass. In J. S. Tumuluru (Éd.), *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*. InTech. https://doi.org/10.5772/65509

Huynh, T.-N. S., Vidaud, C., & Hagège, A. (2016). Investigation of uranium interactions with calcium phosphate-binding proteins using ICP/MS and CE-ICP/MS. *Metallomics*, *8*(11), 1185-1192. https://doi.org/10.1039/C6MT00147E

Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *21*(1), 14-17. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(06)80021-6

Imani, M., Mohajeri, N., Rastegar, M., & Zarghami, N. (2021). Recent advances in FRET-Based biosensors for biomedical applications. *Analytical Biochemistry*, *630*, 114323. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114323

Jia, G., Belli, M., Sansone, U., Rosamilia, S., Ocone, R., & Gaudino, S. (2002). Determination of uranium isotopes in environmental samples by alpha-spectrometry. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *253*(3), 395-406. https://doi.org/10.1023/A:1020413302019

Jin, K., Imada, T., Nakamura, S., Izuta, Y., Oonishi, E., Shibuya, M., Sakaguchi, H., Adachi, T., & Tsubota, K. (2018). Intravital Two-photon Imaging of Ca2+ signaling in Secretory Organs of Yellow Cameleon Transgenic Mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 15880. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34347-1

John, P., Vasa, N. J., & Zam, A. (2023). Optical Biosensors for the Diagnosis of COVID-19 and Other Viruses—A Review. *Diagnostics*, *13*(14), 2418. https://doi.org/10.3390/diagnostics13142418

Jurado, L. A., Chockalingam, P. S., & Jarrett, H. W. (1999). Apocalmodulin. *Physiological Reviews*, *79*(3), 661-682. https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.661

Kajiwara, K., Aoki, W., Koike, N., & Ueda, M. (2021). Development of a yeast cell surface display method using the SpyTag/SpyCatcher system. *Scientific Reports*, *11*(1), 11059. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90593-w

Kalintsev, A., Guan, Q., Brugger, J., Migdisov, A., Etschmann, B., Ram, R., Liu, W., Mei, Y., Testemale, D., & Xu, H. (2023). Nature and coordination geometry of geologically relevant aqueous Uranium(VI) complexes up to 400 ºC : A review and new data. *Journal of Hazardous Materials*, *452*, 131309. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131309

Kanchiswamy, C., Malnoy, M., Occhipinti, A., & Maffei, M. (2014). Calcium Imaging Perspectives in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(3), 3842-3859. https://doi.org/10.3390/ijms15033842

Kawasaki, H., & Kretsinger, R. H. (2017). Structural and functional diversity of EF-hand proteins : Evolutionary perspectives. *Protein Science*, *26*(10), 1898-1920. https://doi.org/10.1002/pro.3233

Keith, L. S., Faroon, O. M., & Fowler, B. A. (2015). Uranium∗. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (p. 1307-1345). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00059-7

Keith, S., Faroon, O., & Roney, M. (2013). Toxicological Profile for Uranium. In *Toxicological Profile for Uranium: Vol. Health effects*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158798/

Kim, E. D., Kim, C. D., Chaney, J., & Kim, S. (2021). Protein Function | Allostery in Proteins : Canonical Models and New Insights. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (p. 27-43). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00259-0

Koban, A., & Bernhard, G. (2007). Uranium(VI) complexes with phospholipid model compounds – A laser spectroscopic study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *101*(5), 750-757. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.01.001

Konietzka, R. (2015). Gastrointestinal absorption of uranium compounds – A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *71*(1), 125-133. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.08.012

Korun, M., & Kovačič, K. (2011). Determination of 238U in ground-water samples using gamma-ray spectrometry. *Applied Radiation and Isotopes*, *69*(3), 636-640. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2010.12.010

Krampa, F. D., Aniweh, Y., Kanyong, P., & Awandare, G. A. (2020). Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis. *Sensors*, *20*(3), 799. https://doi.org/10.3390/s20030799

Krot, A., Vlasova, I., Trigub, A., Averin, A., Yapaskurt, V., & Kalmykov, S. (2022). From EXAFS of reference compounds to U(VI) speciation in contaminated environments. *Journal of Synchrotron Radiation*, *29*(2), 303-314. https://doi.org/10.1107/S1600577521013473

Kumar, A., Malinee, M., Dhiman, A., Kumar, A., & Sharma, T. K. (2019). Aptamer Technology for the Detection of Foodborne Pathogens and Toxins. In *Advanced Biosensors for Health Care Applications* (p. 45-69). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815743-5.00002-0

Kursula, P., & Majava, V. (2007). A structural insight into lead neurotoxicity and calmodulin activation by heavy metals. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and*

Crystallization Communications, *63*(8), 653-656. https://doi.org/10.1107/S1744309107034525

Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Mäkeläinen, I., Väisänen, S. B., Penttilä, I. M., & Komulainen, H. (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, *110*(4), 337-342. https://doi.org/10.1289/ehp.02110337

Lai, M., Brun, D., Edelstein, S. J., & Le Novère, N. (2015). Modulation of Calmodulin Lobes by Different Targets : An Allosteric Model with Hemiconcerted Conformational Transitions. *PLOS Computational Biology*, *11*(1), e1004063. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004063

Laporte, F., Stark, M., Lebrun, C., Oros, S., Sisommay, N., Gathu, V., Lorenzo Solari, P., Creff, G., Roques, J., Den Auwer, C., Vidaud, C., & Delangle, P. (2019). Uranyl-chelating peptides to help understanding uranium toxicity at a molecular level. *BIO Web of Conferences*, *14*, 06005. https://doi.org/10.1051/bioconf/20191406005

Le Clainche, L., & Vita, C. (2006). Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide. *Environmental Chemistry Letters*, *4*(1), 45-49. https://doi.org/10.1007/s10311-005-0033-y

Lee, S. Y., Choi, J. H., & Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, *21*(1), 45-52. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00006-9

Lewit-Bentley, A., & Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*(6), 637-643. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00142-1

Li, R., Ibeanusi, V., Hoyle-Gardner, J., Crandall, C., Jagoe, C., Seaman, J., Anandhi, A., & Chen, G. (2019). Bacterial-facilitated uranium transport in the presence of phytate at Savannah River Site. *Chemosphere*, *223*, 351-357. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.064

Lin, Y.-W. (2020). Uranyl Binding to Proteins and Structural-Functional Impacts. *Biomolecules*, *10*(3), 457. https://doi.org/10.3390/biom10030457

Linse, S., Helmersson, A., & Forsén, S. (1991). Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(13), 8050-8054. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92938-8

Liu, J., Brown, A. K., Meng, X., Cropek, D. M., Istok, J. D., Watson, D. B., & Lu, Y. (2007). A catalytic beacon sensor for uranium with parts-per-trillion sensitivity and millionfold selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(7), 2056-2061. https://doi.org/10.1073/pnas.0607875104

Ma, M., Wang, R., Xu, L., Xu, M., & Liu, S. (2020). Emerging health risks and underlying toxicological mechanisms of uranium contamination : Lessons from the past two decades. *Environment International*, *145*, 106107. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106107

Malhotra, B. D., & Ali, Md. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors. In *Nanomaterials for Biosensors* (p. 1-74). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7

Markich, S. (2000). Valve movement responses of Velesunio angasi (Bivalvia : Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology*, *51*(2), 155-175. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00114-4

Markich, S. J. (2002). Uranium Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems : An Overview. *The Scientific World JOURNAL*, *2*, 707-729. https://doi.org/10.1100/tsw.2002.130

Martínez-Rodríguez, P., Sánchez-Castro, I., Ojeda, J. J., Abad, M. M., Descostes, M., & Merroun, M. L. (2023). Effect of different phosphate sources on uranium biomineralization by the

Microbacterium sp. Be9 strain : A multidisciplinary approach study. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1092184. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092184

Martinkova, P., Kostelnik, A., Valek, T., & Pohanka, M. (2017). >Main streams in the Construction of Biosensors and Their Applications. *International Journal of Electrochemical Science*, *12*(8), 7386-7403. https://doi.org/10.20964/2017.08.02

Maurer, J., Jose, J., & Meyer, T. F. (1997). Autodisplay : One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *179*(3), 794-804. https://doi.org/10.1128/jb.179.3.794-804.1997

Means, A. R., & Dedman, J. R. (1980). Calmodulin—An intracellular calcium receptor. *Nature*, *285*(5760), 73-77. https://doi.org/10.1038/285073a0

Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *6*(2), 153-159. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002

Meinrath, G. (1997). Uranium(VI) speciation by spectroscopy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *224*(1-2), 119-126. https://doi.org/10.1007/BF02034623

Meinrath, G., & Kimura, T. (1993). Carbonate complexation of the uranyl(VI) ion. *Journal of Alloys and Compounds*, *202*(1-2), 89-93. https://doi.org/10.1016/0925-8388(93)90523-P

Merroun, M. L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., & Selenska-Pobell, S. (2005). Complexation of Uranium by Cells and S-Layer Sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5532-5543. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5532-5543.2005

Miao, X., Ling, L., & Shuai, X. (2011). Ultrasensitive detection of lead(ii) with DNAzyme and gold nanoparticles probes by using a dynamic light scattering technique. *Chemical Communications*, *47*(14), 4192. https://doi.org/10.1039/c0cc05344a

Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., & Tsien, R. Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca $^{2+}$ measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(5), 2135-2140. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2135

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca2+based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, *388*(6645), 882-887. https://doi.org/10.1038/42264

Morales, M. A., & Halpern, J. M. (2018). Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjugate Chemistry*, *29*(10), 3231-3239. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592

Moraskie, M., Roshid, M. H. O., O'Connor, G., Dikici, E., Zingg, J.-M., Deo, S., & Daunert, S. (2021). Microbial whole-cell biosensors : Current applications, challenges, and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, *191*, 113359. https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113359

Mühr-Ebert, E. L., Wagner, F., & Walther, C. (2019). Speciation of uranium : Compilation of a thermodynamic database and its experimental evaluation using different analytical techniques. *Applied Geochemistry*, *100*, 213-222. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.10.006

Nair, M. P., Teo, A. J. T., & Li, K. H. H. (2021). Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium : Principles and Applications. *Micromachines*, *13*(1), 24. https://doi.org/10.3390/mi13010024

Nakajima, A., Horikoshi, T., & Sakaguchi, T. (1979). Ion Effects on the Uptake of Uranium by *Chlorella regularis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *43*(3), 625-629. https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863503

Nam, K. H. (2023). Fluorescent Protein-Based Metal Biosensors. *Chemosensors*, *11*(4), 216. https://doi.org/10.3390/chemosensors11040216

Naresh, Varnakavi., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, *21*(4), 1109. https://doi.org/10.3390/s21041109

NCRP. (1999). *Biological Effects and Exposure Limits for "Hot Particles"*. https://ncrponline.org/shop/reports/report-no-130-biological-effects-and-exposure-limits-for-hot-particles-1999/

Nelson, M., & Chazin, W. (1998). Calmodulin as a calcium sensor. In *Calmodulin and Signal Transduction* (p. 17-64). Academic Press.

Nicchi, S., Giuliani, M., Giusti, F., Pancotto, L., Maione, D., Delany, I., Galeotti, C. L., & Brettoni, C. (2021). Decorating the surface of *Escherichia coli* with bacterial lipoproteins : A comparative analysis of different display systems. *Microbial Cell Factories*, *20*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01528-z

Ning, Y., Li, W., Duan, Y., Yang, M., & Deng, L. (2014). High Specific DNAzyme-Aptamer Sensor for Salmonella paratyphi A Using Single-Walled Nanotubes–Based Dual Fluorescence-Spectrophotometric Methods. *SLAS Discovery*, *19*(7), 1099-1106. https://doi.org/10.1177/1087057114528538

Novotnik, B., Chen, W., & Evans, R. D. (2018). Uranium bearing dissolved organic matter in the porewaters of uranium contaminated lake sediments. *Applied Geochemistry*, *91*, 36-44. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.01.009

Nriagu, J., Nam, D.-H., Ayanwola, T. A., Dinh, H., Erdenechimeg, E., Ochir, C., & Bolormaa, T.-A. (2012). High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia. *Science of The Total Environment*, *414*, 722-726. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.037

Orano. (s. d.). *Uranium : Ce qu'il faut retenir.* https://www.orano.group/fr/decodage/tout-savoir-sur-l-uranium/.

Ouyang, H., & Vogel, H. J. (1998). Metal ion binding to calmodulin : NMR and fluorescence studies. *BioMetals*, *11*(3), 213-222. https://doi.org/10.1023/A:1009226215543

Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Bremond, N., Beccia, M. R., Lemaire, D., Battesti, C., Delangle, P., Solari, P. L., Guilbaud, P., & Berthomieu, C. (2022). Optimized Coordination of Uranyl in Engineered Calmodulin Site 1 Provides a Subnanomolar Affinity for Uranyl and a Strong Uranyl versus Calcium Selectivity. *Inorganic Chemistry*, *61*(50), 20480-20492. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c03185

Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Beccia, M. R., Bremond, N., & Berthomieu, C. (2014). *New Uranium-Chelating Peptides Derived from EF-Hand Calcium-Binding Motif Useful for Uranium Biodetection and Biodecontamination.* (Brevet WO2014155356 A8).

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*(8), e41922. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041922

Park, D. M., & Taffet, M. J. (2019). Combinatorial Sensor Design in *Caulobacter crescentus* for Selective Environmental Uranium Detection. *ACS Synthetic Biology*, *8*(4), 807-817. https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00484

Park, H. Y., Kim, S. A., Korlach, J., Rhoades, E., Kwok, L. W., Zipfel, W. R., Waxham, M. N., Webb, W. W., & Pollack, L. (2008). Conformational changes of calmodulin upon Ca $^{2+}$ binding studied with a microfluidic mixer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(2), 542-547. https://doi.org/10.1073/pnas.0710810105

Park, M. (2020). Surface Display Technology for Biosensor Applications : A Review. *Sensors*, *20*(10), 2775. https://doi.org/10.3390/s20102775

Pearson, R. G. (1963). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*, *85*(22), 3533-3539. https://doi.org/10.1021/ja00905a001

Pellmar, T. (1999). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological Sciences*, *49*(1), 29-39. https://doi.org/10.1093/toxsci/49.1.29

Peschke, T., Rabe, K. S., & Niemeyer, C. M. (2017). Orthogonal Surface Tags for Whole-Cell Biocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, *56*(8), 2183-2186. https://doi.org/10.1002/anie.201609590

Pólya, G. Eine Wahrscheinlichkeitsaufgabe in der Kundenwerbung. *Zamm-zeitschrift Fur Angewandte Mathematik Und Mechanik, 10*, 96-97. https://doi.org/10.1002/zamm.19300100113

Prat, O., Vercouter, T., Ansoborlo, E., Fichet, P., Perret, P., Kurttio, P., & Salonen, L. (2009). Uranium Speciation in Drinking Water from Drilled Wells in Southern Finland and Its Potential Links to Health Effects. *Environmental Science & Technology*, *43*(10), 3941-3946. https://doi.org/10.1021/es803658e

Presnova, G., Presnov, D., Krupenin, V., Grigorenko, V., Trifonov, A., Andreeva, I., Ignatenko, O., Egorov, A., & Rubtsova, M. (2017). Biosensor based on a silicon nanowire field-effect transistor functionalized by gold nanoparticles for the highly sensitive determination of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, *88*, 283-289. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.054

Pullano, S. A., Greco, M., Bianco, M. G., Foti, D., Brunetti, A., & Fiorillo, A. S. (2022). Glucose biosensors in clinical practice : Principles, limits and perspectives of currently used devices. *Theranostics*, *12*(2), 493-511. https://doi.org/10.7150/thno.64035

Qi, L., Basset, C., Averseng, O., Quéméneur, E., Hagège, A., & Vidaud, C. (2014). Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein : Insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics*, *6*(1), 166-176. https://doi.org/10.1039/C3MT00269A

Quijano-Rubio, A., Yeh, H.-W., Park, J., Lee, H., Langan, R. A., Boyken, S. E., Lajoie, M. J., Cao, L., Chow, C. M., Miranda, M. C., Wi, J., Hong, H. J., Stewart, L., Oh, B.-H., & Baker, D. (2021). De novo design of modular and tunable protein biosensors. *Nature*, *591*(7850), 482-487. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03258-z

Ramanathan, K. (1999). The development and applications of thermal biosensors for bioprocess monitoring. *Trends in Biotechnology*, *17*(12), 499-505. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01378-5

Ramanathan, K., & Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(6), 417-423. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5

Rani, A., Mehra, R., Duggal, V., & Balaram, V. (2013). Analysis of Uranium Concentration in Drinking Water Samples Using ICPMS. *Health Physics*, *104*(3), 251-255. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e318279ba05

Rathore, D. P. S., Tarafder, P. K., Balaram, V., Mishra, M., Pari, J., Bhujle, A. G., & Bhawalkar, D. D. (2023). Application of a differential technique in laser-induced fluorimetry/pulsed LED-fluorimetry : Simple and reliable analysis of uranium raw materials in the nuclear fuel cycle – a mini-review. *Environmental Science: Advances*, *2*(10), 1340-1350. https://doi.org/10.1039/D3VA00134B

Raut, N., O'Connor, G., Pasini, P., & Daunert, S. (2012). Engineered cells as biosensing systems in biomedical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(10), 3147-3159. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5756-6

Reddington, S. C., & Howarth, M. (2015). Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology : SpyTag and SpyCatcher. *Current Opinion in Chemical Biology*, *29*, 94-99. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.002

Reuven, N., Adler, J., Myers, N., & Shaul, Y. (2021). CRISPR Co-Editing Strategy for Scarless Homology-Directed Genome Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3741. https://doi.org/10.3390/ijms22073741

Richter, C., Müller, K., Drobot, B., Steudtner, R., Großmann, K., Stockmann, M., & Brendler, V. (2016). Macroscopic and spectroscopic characterization of uranium(VI) sorption onto orthoclase and muscovite and the influence of competing Ca2+. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *189*, 143-157. https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.05.045

Ripp, S. (2009). Bacteriophage-Based Pathogen Detection. In S. Belkin & M. B. Gu (Éds.), *Whole Cell Sensing System II* (p. 65-83). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2009_7

Rocha, D. L., Maringolo, V., Araújo, A. N., Amorim, C. M. P. G., & Montenegro, M. D. C. B. S. M. (2021). An overview of Structured Biosensors for Metal Ions Determination. *Chemosensors*, *9*(11), 324. https://doi.org/10.3390/chemosensors9110324

Rodrigues, G., Arruda-Neto, J. D. T., Pereira, R. M. R., Kleeb, S. R., Geraldo, L. P., Primi, M. C., Takayama, L., Rodrigues, T. E., Cavalcante, G. T., Genofre, G. C., Semmler, R., Nogueira, G. P., & Fontes, E. M. (2013). Uranium deposition in bones of Wistar rats associated with skeleton development. *Applied Radiation and Isotopes*, *82*, 105-110. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2013.07.033

Ruan, C., Luo, W., Wang, W., & Gu, B. (2007). Surface-enhanced Raman spectroscopy for uranium detection and analysis in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, *605*(1), 80-86. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.024

SaatÇİ, E., Nistor, M., Gáspár, S., Csöregi, E., & İşcan, M. (2007). Comparison of two glutathione ***S*** -transferases used in capacitive biosensors for detection of heavy metals. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *87*(10-11), 745-754. https://doi.org/10.1080/03067310701409309

Sachan, A., Ilgu, M., Kempema, A., Kraus, G. A., & Nilsen-Hamilton, M. (2016). Specificity and Ligand Affinities of the Cocaine Aptamer : Impact of Structural Features and Physiological NaCl. *Analytical Chemistry*, *88*(15), 7715-7723. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01633

Sahoo, S. K., Mohapatra, S., Chakrabarty, A., Sumesh, C. G., Jha, V. N., Tripathi, R. M., & Puranik, V. D. (2010). Determination of uranium at ultra trace level in packaged drinking water by laser fluorimeter and consequent ingestion dose. *Radioprotection*, *45*(1), 55-66. https://doi.org/10.1051/radiopro/2009030

Santos-Francés, F., Gil Pacheco, E., Martínez-Graña, A., Alonso Rojo, P., Ávila Zarza, C., & García Sánchez, A. (2018). Concentration of uranium in the soils of the west of Spain. *Environmental Pollution*, *236*, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.038

Sarthou, M. C. M., Devime, F., Baggio, C., Figuet, S., Alban, C., Bourguignon, J., & Ravanel, S. (2022). Calcium-permeable cation channels are involved in uranium uptake in Arabidopsis thaliana. *Journal of Hazardous Materials*, *424*, 127436. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127436

Satoh, I. (1991). An apoenzyme thermistor microanalysis for zinc(II) ions with use of an immobilized alkaline phosphatase reactor in a flow system. *Biosensors and Bioelectronics*, *6*(4), 375-379. https://doi.org/10.1016/0956-5663(91)85025-R

Satyanarayanan, M., Balaram, V., Sawant, S., Subramanyam, K., Krishna, G., & Manikyamba, C. (2018). *Rapid determination of REEs, PGEs, and other trace elements in geological and environmental materials by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry.* 1-15.

Sauge-Merle, S., Recuerda, M., Beccia, M. R., Lemaire, D., Cherif, R., Bremond, N., Merola, F., Bousmah, Y., & Berthomieu, C. (2023). Development of an Efficient FRET-Based Ratiometric Uranium Biosensor. *Biosensors*, *13*(5), 561. https://doi.org/10.3390/bios13050561

Scapolan, S., Ansorborlo, E., Moulin, C., & Madic, C. (1998). Uranium (VI)-Transferrin System Studied by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Radiation Protection Dosimetry*, *79*(1), 505-508. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a032462

Scheller, F. W., Schubert, F., Neumann, B., Pfeiffer, D., Hintsche, R., Dransfeld, I., Wollenberger, U., Renneberg, R., Warsinke, A., Johansson, G., Skoog, M., Yang, X., Bogdanovskaya, V., Bückmann, A., & Zaitsev, S. Yu. (1991). Second generation biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *6*(3), 245-253. https://doi.org/10.1016/0956-5663(91)80010-U

Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., & Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, *15*(5), 394-404. https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z

Seo, M.-H., Park, J., Kim, E., Hohng, S., & Kim, H.-S. (2014). Protein conformational dynamics dictate the binding affinity for a ligand. *Nature Communications*, *5*(1), 3724. https://doi.org/10.1038/ncomms4724

Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllősi, J. (2015). Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 6718-6756. https://doi.org/10.3390/ijms16046718

Simon, O., Gagnaire, B., Sommard, V., Pierrisnard, S., Camilleri, V., Carasco, L., Gilbin, R., & Frelon, S. (2019). Uranium transfer and accumulation in organs of *Danio rerio* after waterborne exposure alone or combined with diet-borne exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *38*(1), 90-98. https://doi.org/10.1002/etc.4283

Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2023). Uranium in natural waters and the environment : Distribution, speciation and impact. *Applied Geochemistry*, *148*, 105534. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2022.105534

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76-85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7

Song, Y., Salbu, B., Teien, H.-C., Sørlie Heier, L., Rosseland, B., Høgåsen, T., & Tollefsen, K. (2014). Hepatic transcriptomic profiling reveals early toxicological mechanisms of uranium in Atlantic salmon (Salmo salar). *BMC Genomics*, *15*(1), 694. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-694

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, *83*(1), 13-34. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

Sutton, M., & Burastero, S. R. (2004). Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids. *Chemical Research in Toxicology*, *17*(11), 1468-1480. https://doi.org/10.1021/tx049878k

Tannenbaum, A., Silverstone, H., & Koziol, J. (1948). *Tracer studies on the distribution and excretion of uranium in mice, rats and dogs*. US Atomic Energy Commission. https://www.osti.gov/biblio/4435882

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, *9*(3), 68-77. https://doi.org/10.1093/af/vfz020

Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., & Gouget, B. (2007). Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells. *Toxicological Sciences*, *98*(2), 479-487. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm130

Thisse, B., Pflumio, S., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Steffan, T., Thisse, C., & Charbonnier, X. (2001). *Expression of the zebrafish genome during embryogenesis*.

Tian, Q., Wang, P., Huang, Y., Zhang, B., & Jiao, W. (2022). The Stability of U(VI) and As(V) under the Influence of pH and Inorganic Ligands. *Sustainability*, *14*(20), 12967. https://doi.org/10.3390/su142012967

Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*(12), 2424-2434. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.006

Tracy, B. L., & Meyerhof, D. P. (1987). Uranium concentrations in air near a canadian uranium refinery. *Atmospheric Environment (1967)*, *21*(1), 165-172. https://doi.org/10.1016/0004-6981(87)90281-2

Tripathi, S., & Portman, J. J. (2008). Inherent flexibility and protein function : The open/closed conformational transition in the N-terminal domain of calmodulin. *The Journal of Chemical Physics*, *128*(20), 205104. https://doi.org/10.1063/1.2928634

Turdean, G. L. (2011). Design and Development of Biosensors for the Detection of Heavy Metal Toxicity. *International Journal of Electrochemistry*, *2011*, 1-15. https://doi.org/10.4061/2011/343125

Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The Enzyme Electrode. *Nature*, *214*(5092), 986-988. https://doi.org/10.1038/214986a0

Van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H., & Fraaije, M. W. (2011). Decorating microbes : Surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, *29*(2), 79-86. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.003

Velusamy, K., Periyasamy, S., Kumar, P. S., Rangasamy, G., Nisha Pauline, J. M., Ramaraju, P., Mohanasundaram, S., & Nguyen Vo, D.-V. (2022). Biosensor for heavy metals detection in wastewater : A review. *Food and Chemical Toxicology*, *168*, 113307. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113307

Verma, A. K., Noumani, A., Yadav, A. K., & Solanki, P. R. (2023). FRET Based Biosensor : Principle Applications Recent Advances and Challenges. *Diagnostics*, *13*(8), 1375. https://doi.org/10.3390/diagnostics13081375

Vidaud, C., Bourgeois, D., & Meyer, D. (2012). Bone as Target Organ for Metals : The Case of f-Elements. *Chemical Research in Toxicology*, *25*(6), 1161-1175. https://doi.org/10.1021/tx300064m

Vodyanitskii, Yu. N. (2011). Chemical aspects of uranium behavior in soils : A review. *Eurasian Soil Science*, *44*(8), 862-873. https://doi.org/10.1134/S1064229311080163

Vukovic, S., Hay, B. P., & Bryantsev, V. S. (2015). Predicting Stability Constants for Uranyl Complexes Using Density Functional Theory. *Inorganic Chemistry*, *54*(8), 3995-4001. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00264

Wachter, R. M., & James Remington, S. (1999). Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Current Biology*, *9*(17), R628-R629. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80408-4

Wade-Gueye, N. M., Delissen, O., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., & Souidi, M. (2012). Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(7), 1121-1127. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.04.019

Wang, C. A., Aquaron, R. R., Leavis, P. C., & Gergely, J. (1982). Metal-Binding Properties of Calmodulin. *European Journal of Biochemistry*, *124*(1), 7-12. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05900.x

Wang, P.-C., Deng, H., Xu, R., Du, J.-L., Tao, R. (2024). Improvement in Tol2 transposon for efficient large-cargo capacity transgene applications in cultured cells and zebrafish (*Danio rerio*). *Zoological Research*, *45*(3), 567-574. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2024.026

Wang, X., & Marchisio, M. A. (2021). Synthetic polycistronic sequences in eukaryotes. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *6*(4), 254-261. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.003

Wang, X., Shi, Z., Kinniburgh, D. G., Zhao, L., Ni, S., Wang, R., Hou, Y., Cheng, K., & Zhu, B. (2019). Effect of thermodynamic database selection on the estimated aqueous uranium speciation. *Journal of Geochemical Exploration*, *204*, 33-42. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.05.001

Wei, H., Ze-Ling, S., Le-Le, C. *et al.* Specific detection of bioavailable phenanthrene and mercury by bacterium reporters in the red soil. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 685–694 (2014). https://doi.org/10.1007/s13762-013-0216-1

White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., Stemple, D. L., Murphy, D. N., Billis, K., Hourlier, T., Füllgrabe, A., Davis, M. P., Enright, A. J., & Busch-Nentwich, E. M. (2017). A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *eLife*, *6*, e30860. https://doi.org/10.7554/eLife.30860

WHO Guidelines for drinking-water quality, 4th edition. (2017, avril 24). World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950

Yang, C.-F., & Tsai, W.-C. (2022). Calmodulin : The switch button of calcium signaling. *Tzu Chi Medical Journal*, *34*(1), 15. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_285_20

Yang, Y., Dai, C., Chen, X., Zhang, B., Li, X., Yang, W., Wang, J., & Feng, J. (2024). Role of uranium toxicity and uranium-induced oxidative stress in advancing kidney injury and endothelial inflammation in rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *25*(1), 14. https://doi.org/10.1186/s40360-024-00734-w

Yi, Q., Dai, X., Park, B. M., Gu, J., Luo, J., Wang, R., Yu, C., Kou, S., Huang, J., Lakerveld, R., & Sun, F. (2022). Directed assembly of genetically engineered eukaryotic cells into living functional materials via ultrahigh-affinity protein interactions. *Science Advances*, *8*(44), eade0073. https://doi.org/10.1126/sciadv.ade0073

Yin, K., Wu, Y., Wang, S., & Chen, L. (2016). A sensitive fluorescent biosensor for the detection of copper ion inspired by biological recognition element pyoverdine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *232*, 257-263. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.128

Yu, L., Li, W., Chu, J., Chen, C., Li, X., Tang, W., Xia, B., & Xiong, Z. (2021). Uranium inhibits mammalian mitochondrial cytochrome c oxidase and ATP synthase. *Environmental Pollution*, *271*, 116377. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116377

Yue, Y.-C., Li, M.-H., Wang, H.-B., Zhang, B.-L., & He, W. (2018). The toxicological mechanisms and detoxification of depleted uranium exposure. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *23*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s12199-018-0706-3

Yuksel, M., Luo, W., McCloy, B., Mills, J., Kayaharman, M., & Yeow, J. T. W. (2023). A precise and rapid early pregnancy test : Development of a novel and fully automated electrochemical point-of-care biosensor for human urine samples. *Talanta*, *254*, 124156. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124156

Yun, W., Wu, H., Yang, Z., Wang, R., Wang, C., Yang, L., & Tang, Y. (2019). A dynamic, ultra-sensitive and "turn-on" strategy for fluorescent detection of uranyl based on DNAzyme and entropy-driven amplification initiated circular cleavage amplification. *Analytica Chimica Acta*, *1068*, 104-110. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.018

Zakeri, B., Fierer, J. O., Celik, E., Chittock, E. C., Schwarz-Linek, U., Moy, V. T., & Howarth, M. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(12). https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109

Zanonato, P. L., Di Bernardo, P., Vallet, V., Szabó, Z., & Grenthe, I. (2015). Alkali-metal ion coordination in uranyl(VI) poly-peroxide complexes in solution. Part 1 : The Li^+, Na^+ and K^+ – peroxide–hydroxide systems. *Dalton Transactions*, *44*(4), 1549-1556. https://doi.org/10.1039/C4DT02104E

Zhang, X., Li, B., Schillereff, D. N., Chiverrell, R. C., Tefsen, B., & Wells, M. (2022). Whole-cell biosensors for determination of bioavailable pollutants in soils and sediments : Theory and practice. *Science of The Total Environment*, *811*, 152178. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152178

Zhou, Y., Tang, L., Zeng, G., Zhu, J., Dong, H., Zhang, Y., Xie, X., Wang, J., & Deng, Y. (2015). A novel biosensor for silver(I) ion detection based on nanoporous gold and duplex-like DNA

scaffolds with anionic intercalator. *RSC Advances*, *5*(85), 69738-69744. https://doi.org/10.1039/C5RA10686A

Annexes

Annexe 1

Séquence nucléotidique du gène codant le biosenseur SF1 utilisé pour l'édition de *atp1b1b*. Les brins d'homologie sont indiqués en rouge, la CaMΔ_{I-II} est indiquée en vert, eCFP est indiquée en bleu, citrine est indiquée en jaune, le peptide T2A est indiqué en violet, les espaceurs sont indiqués en noir.

GGGAGGCGTTCGGGCCACAGCGGATAGCTTTTTAATTGCTGCCTTTTTACGCAGAATCAAAATGA
CAGCCTGCAGTGGTACAGTAGGTTAATTGCACTGTGTGCGCTATTTAGAAAGTAATTAGTAAAGA
AGAAACCGACTTACAGTAATAGAATAAATGAAATGGAAAATACTGTTAAAGCAAGATGATGAAAT
CTGTAAAGGCACGCAGACATATGTTCATCCATCTGTCTAAATATAACCTGAGAATCCTAAAAACAG
CTTTTTTTTTCCGCCGTCGGGCATCCTCGATCCTTCTCCCCGGTTCTACGGCTCTTGCGTCACGCG
TTTTTACATCACTCTCTTCACCCTGTCCTTTTCTCGCAGAGGCTTTTACGTCTCTTTACGCAACAC
TATTGTAAAGTGATTCCCACCCTGATTTCGCGAGCTGCACGACTTTGCTACGTGTTTGGAGGCTCT
GCTTTTGATTGGCGCCGCGCGGCGCTGGGCGGGATTCGGCCCCGCCGCTGGATATATTACGCGGG
GCACCTTGGAGAGAGCCGGGTACGGCTCCATGTCAAGGTGGGCTTAGTGCTCCGGGAAGGGGT
GTAGTTTTACAAAGGAGGCAAGAAAGGACACGCGAGGGAATTCGCTGCTCAAGTGGACAAACA
AAACCTTACAGTACACCATGGTGAGCAAGGGAGAGGAGCTGTTCACAGGAGTGGTGCCTATCCT
GGTGGAGCTGGACGGAGACGTGAACGGACACAGATTCAGCGTGAGCGGAGAGGGAGAGGGAG
ACGCTACATACGGAAAGCTGACACTGAAGTTCATCTGTACAACAGGAAAGCTGCCTGTGCCTTG
GCCTACACTGGTGACAACACTGACATGGGGAGTGCAGTGTTTCAGCAGATACCCTGACCACATG
AAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCTATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGAACAATCTTCT
TCAAGGACGACGGAAACTACAAGACAAGAGCTGAGGTGAAGTTCGAGGGAGACACACTGGTG
AACAGAATCGAGCTGAAGGGAATCGACTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTGGGACACAAGCTG
GAGTACAACTACATCAGCCACAACGTGTACATCACAGCTGACAAGCAGAAGAACGGAATCAAG
GCTCACTTCAAGATCAGACACAACATCGAGGACGGAAGCGTGCAGCTGGCTGACCACTACCAG
CAGAACACACCTATCGGAGACGGACCTGTGCTGCTGCCTGACAACCACTACCTGAGCACACAGA
GCGCTCTGAGCAAGGACCCTAACGAGAAGAGAGACCACATGGTGCTGCTGGAGTTCGTGACAG
CTGCTGAGCTCCCTATGGCTGACCAGCTGACAGACGACCAGATCAGCGAGTTCAAGGAGGCTTT
CAGCCTGTTCGACGGAGACGGATGTATCACAACAAAGGAGCTGGGAACAGTGATGAGAAGCCT
GGGACAGAACCCTACAGAGGCTGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTGGACGGAAACGGAAC
AATCGACTTCCCTGAGTTCCTGAACCTGATGGCTAGAAAGCCTGTCGACATGGTGAGCAAGGGA
GAGGAGCTGTTCACAGGAGTGGTGCCTATCCTGGTGGAGCTGGACGGAGACGTGAACGGACAC
AAGTTCAGCGTGAGCGGAGAGGGAGAGGGAGACGCTACATACGGAAAGCTGACACTGAAGTTC
ATCTGTACAACAGGAAAGCTGCCTGTGCCTTGGCCTACACTGGTGACAACATTCGGATACGGACT
GATGTGTTTCGCTAGATACCCTGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCTATGCCTG
AGGGATACGTGCAGGAGAGAACAATCTTCTTCAAGGACGACGGAAACTACAAGACAAGAGCTG
AGGTGAAGTTCGAGGGAGACACACTGGTGAACAGAATCGAGCTGAAGGGAATCGACTTCAAGG
AGGACGGAAACATCCTGGGACACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTGTACATCAT
GGCTGACAAGCAGAAGAACGGAATCAAGGTGAACTTCAAGATCAGACACAACATCGAGGACGG
AAGCGTGCAGCTGGCTGACCACTACCAGCAGAACACACCTATCGGAGACGGACCTGTGCTGCTG
CCTGACAACCACTACCTGAGCTACCAGAGCGCTCTGAGCAAGGACCCTAACGAGAAGAGAGAC
CACATGGTGCTGCTGGAGTTCGTGACAGCTGCTGGAATCACACTGGGAATGGACGAGCTGTACA
AGAAGCTTGGCTCCGGCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATC
CCGGCCCAATGCCCGCTCAAAATAAAGACGACGGAGGATGGAAGAAGTTTGTATGGAATTCGGA
GAAGAAGGAATTTCTAGGACGTACCGGCGGGAGTTGGGGTGAGTATACCGTACAGATGTAAAAT
CGCTCGATTTCAGCACGTCGGACAGCGCAGTGATGCCTGTCACCGCCGTTTCTATAGCAGCGGGT
ACCCACAGTCTGCCAGTCTGGTCACGATGCAACCTGTATGATTTGACTTTGCAGCAAATGTCTCG
CGGACTTTCATATGTCG

Annexe 2

Calcul du nombre de mutants à analyser pour pouvoir considérer que la totalité de la banque a été observée :

Il s'agit d'un calcul de probabilité décrit par le problème du collectionneur de coupons (J.-P. Delahaye (2023) Pour La Science 547, 80-85)

En faisant l'hypothèse que la probabilité d'obtention est identique pour chaque mutant de la banque, il est possible d'estimer le nombre d'échantillons à analyser garantissant l'obtention de chaque séquence, et ce pour un intervalle de confiance donné.

En moyenne, le nombre de tests à faire pour obtenir les N mutants est :

$T_N = N(1+1/2+1/3+\ldots+1/N)$

Il existe une formule approchée de cette équation qui est :

$T_N \approx N\ln(N)+\gamma N$ où γ est la constante d'Euler Mascheroni dont la valeur est ≈ 0,5772156649

Pour N = 35, nous avons $T_{35} \approx 35*(\ln(35)+0,5772)$

$T_{35} \approx 145$

Donc, le test de 145 échantillons devrait permettre d'obtenir les 35 mutants différents. Cependant, pour avoir une certitude quasi absolue (par exemple, 99% de chance), il est recommandé de multiplier ce nombre par un facteur de sécurité. Un facteur couramment utilisé est le logarithme naturel du nombre de mutations. Dans ce cas, le nombre final d'échantillons est ≈ 145*ln(35) ≈ 515. Ainsi, pour être pratiquement certain d'avoir analysé les 35 mutants différents, il serait nécessaire de tester environ 515 échantillons issus de la banque de mutants dans le crible.

Annexe 3

Formules utilisées pour le calcul des Kds

Un peptide 1 site (P) capable de fixer un équivalent de métal (M), forme un complexe MP selon la réaction (1) :

$$M + P \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} MP \quad (1)$$

L'isotherme de fixation peut être déterminé par fluorescence, grâce au modèle déterminé par la réaction (2) :

$$\Delta F/C_P = \Delta\Phi\, K_1\, [M]/(1 + K_1\, [M]) \quad (2)$$

Avec ΔF la différence d'intensité de fluorescence observée au cours de la manipulation, C_P la concentration totale en protéine, $\Delta\Phi$ l'amplitude de l'isotherme de fixation, K_1 la constante conditionnelle d'équilibre de la réaction et [M] la concentration en métal libre.
Pour les peptides deux sites, le complexe M_2P est formé en deux étapes décrites par les réactions (1) et (3) :

$$M + MP \underset{}{\overset{K_2}{\rightleftarrows}} M_2P \quad (3)$$

Les constantes d'équilibre K_1 and K_2, sont reliées à la différence d'intensité de fluorescence et à la concentration en uranyle libre [M], selon l'équation (4) :

$$\Delta F/C_P = (\Delta\Phi_1\, K_1\, [M] + \Delta\Phi_2\, K_1\, K_2\, [M]^2)/(1 + K_1\, [M] + K_1\, K_2\, [M]^2) \quad (4)$$

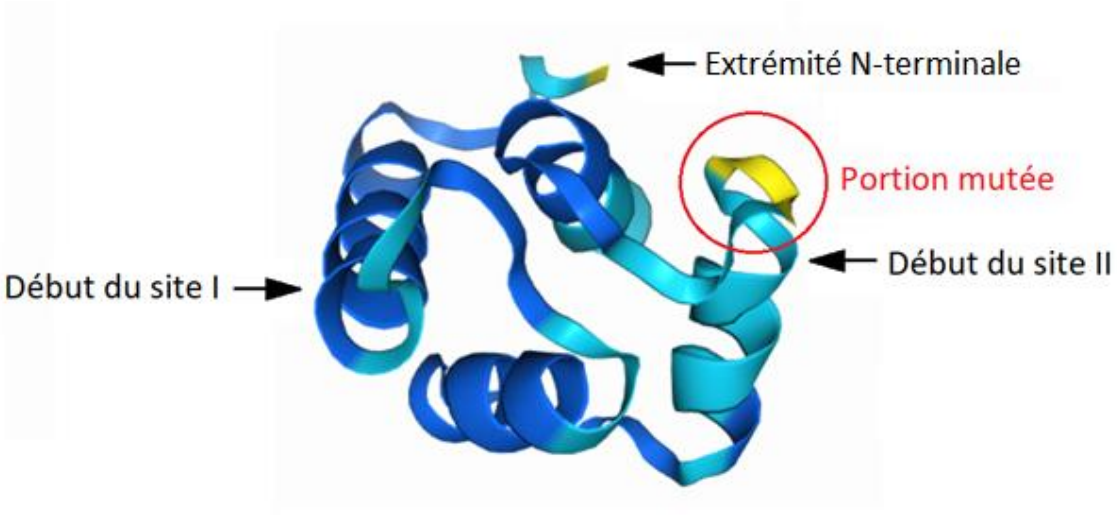
En présence d'IDA, la concentration en métal libre dépend également des constantes d'équilibres entre uranyle et IDA. Dans ces conditions, il n'est pas possible de déterminer simplement les valeurs de K_1 et K_2. Elles ont été calculées grâce au logiciel ReactLab (Jplus Consulting Pty Ltd), qui utilise une approche itérative fondée sur une adaptation de l'algorithme Marquardt-Levenberg, en prenant en compte les réactions ci-dessous.

Nous avons utilisé les pKA de l'IDA et les constantes d'équilibre avec l'uranyle données pour 25°C et une force ionique de 0,1M par Jian et al. 2003 Inorg. Chem. 42, 1233−1240

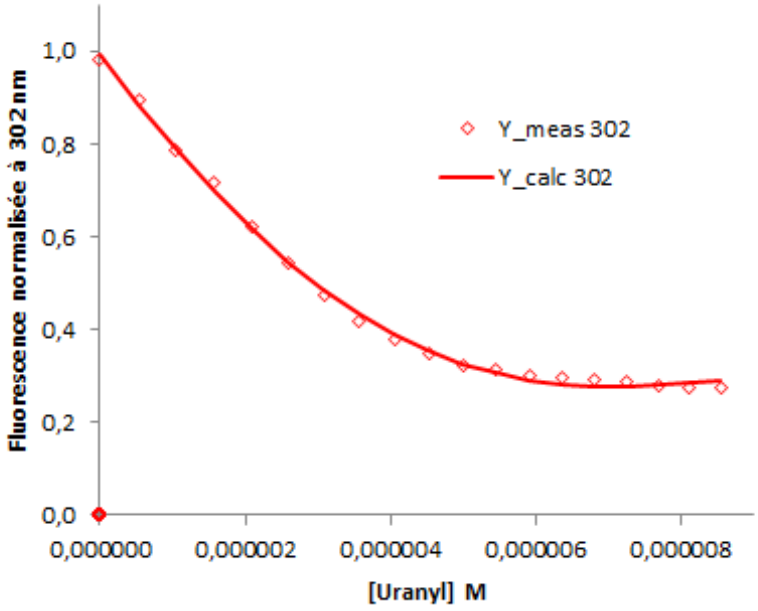
$UO_2^{2+} + IDA^{2-} \rightleftarrows UIDA$	$\log(ß_{11}) = 9,9$
$UO_2^{2+} + 2IDA^{2-} \rightleftarrows U(IDA)_2^{2-}$	$\log(ß_{12}) = 16,42$
$2\,UO_2^{2+} + 2IDA^{2-} + 2OH^- \rightleftarrows (UO_2)_2(IDA)_2(OH)_2^{2-}$	$\log(ß_{22}) = 10,8$
$H^+ + IDA^{2-} \rightleftarrows HIDA$	$\log(ß) = 9,52$
$2H^+ + IDA^{2-} \rightleftarrows H_2IDA$	$\log(ß) = 12,06$
$3H^+ + IDA^{2-} \rightleftarrows H_3IDA^+$	$\log(ß) = 13,73$

Annexe 4

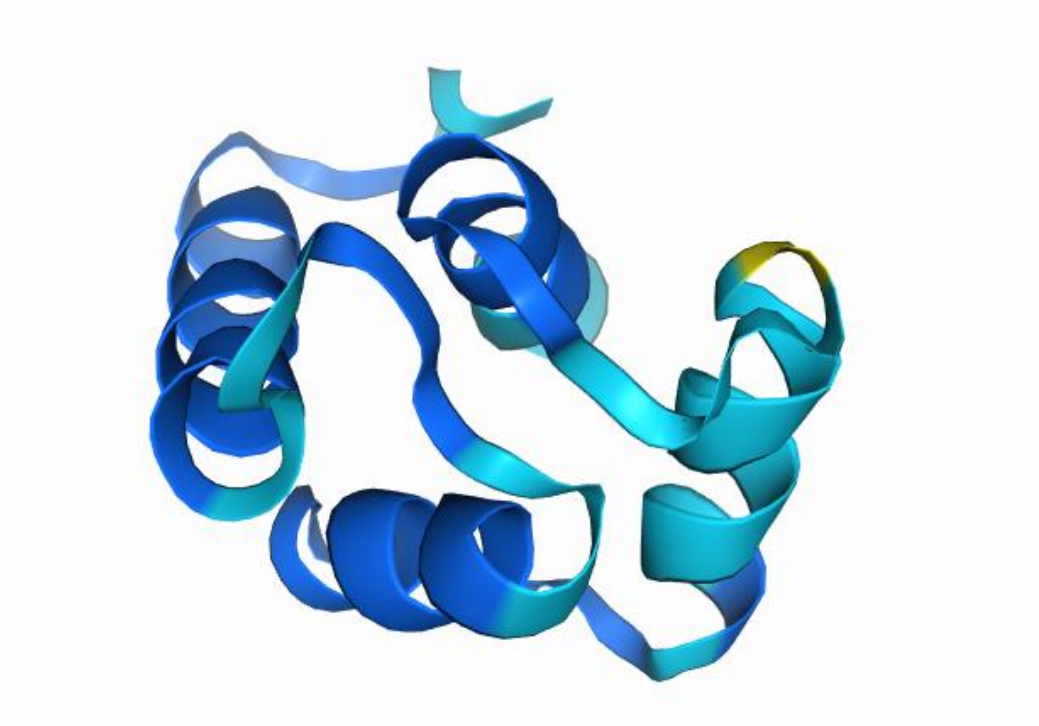
Prédictions structurales et courbes de diminution de l'intensité de fluorescence de la CaMΔI-II et de certains mutants



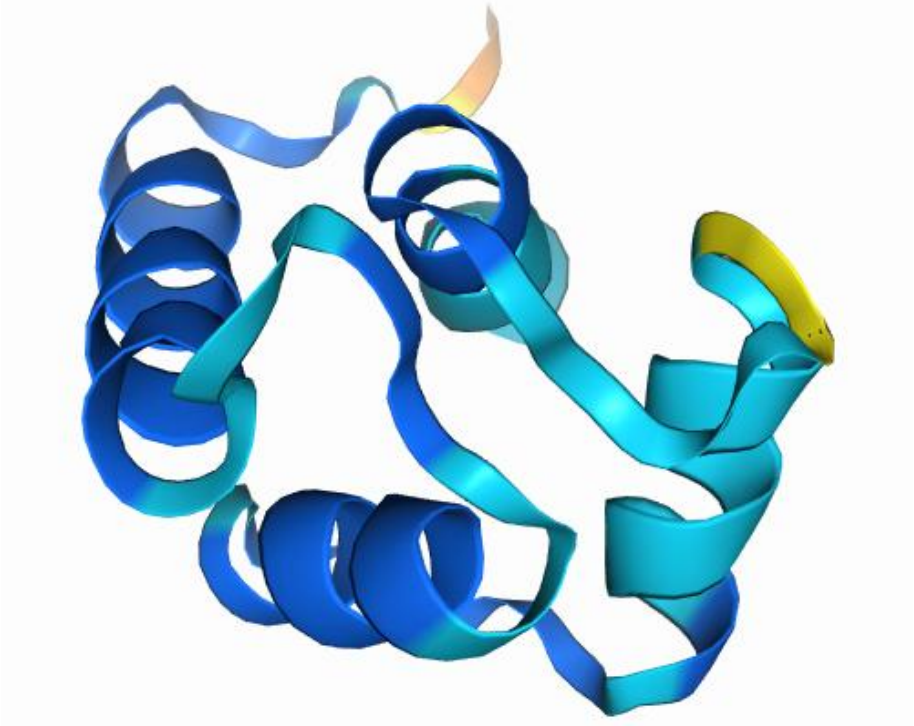
Prédiction structurale de la CaMΔI-II (DGNG) en utilisant AlphaFold



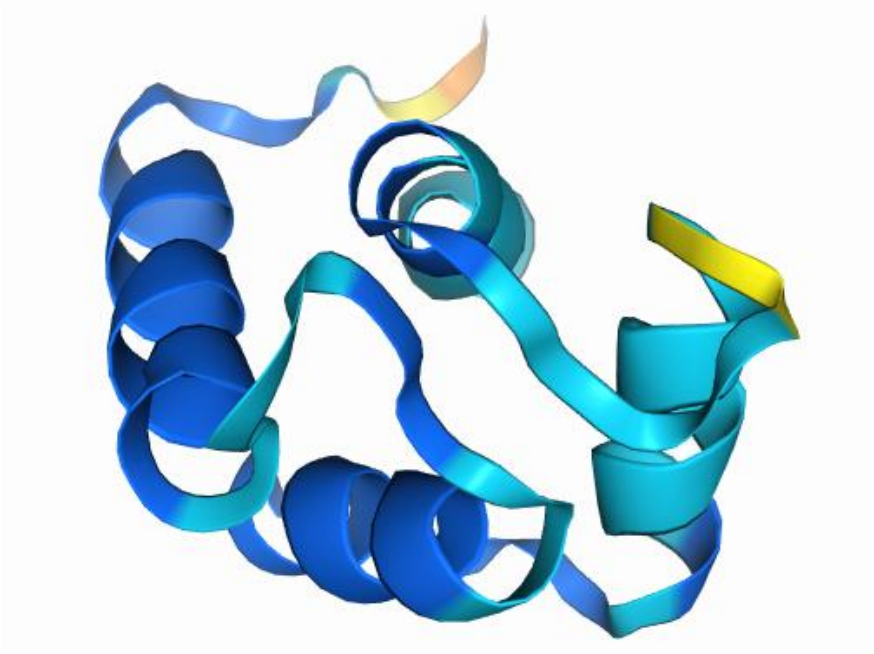
Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm de la CaMΔI-II en fonction de la concentration en uranyle.



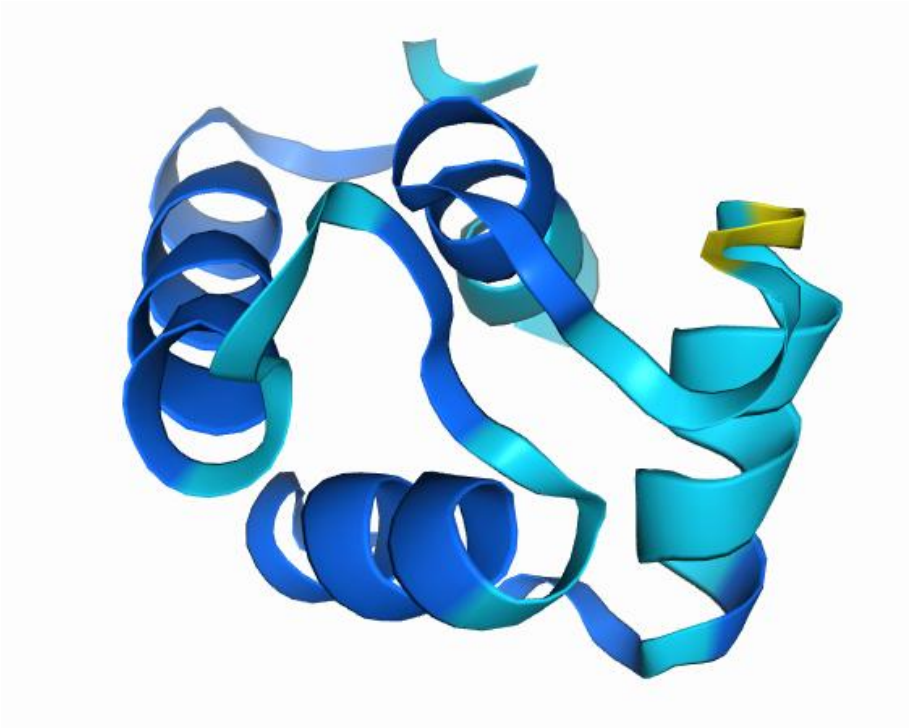
Prédiction structurale du mutant DGKG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



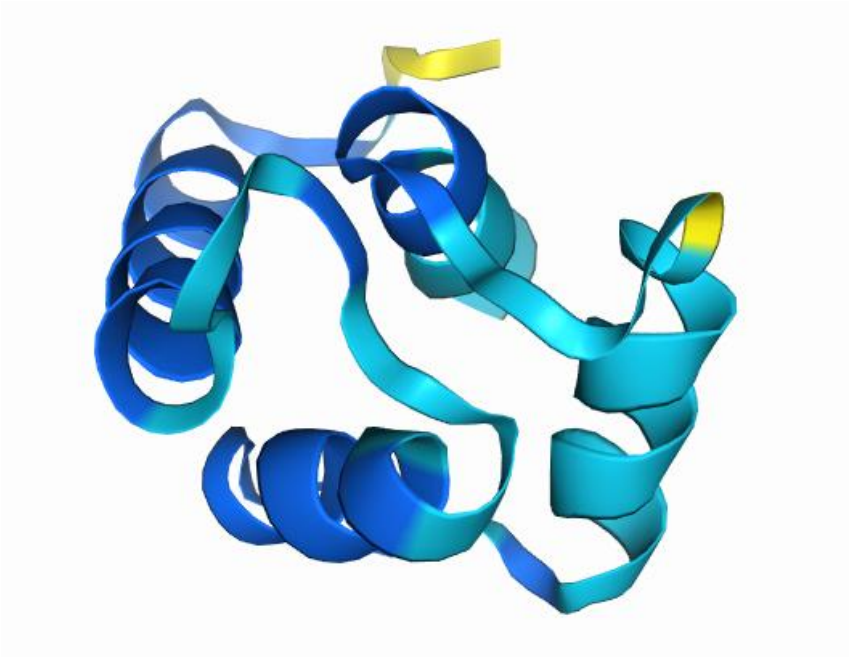
Prédiction structurale du mutant DGQG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



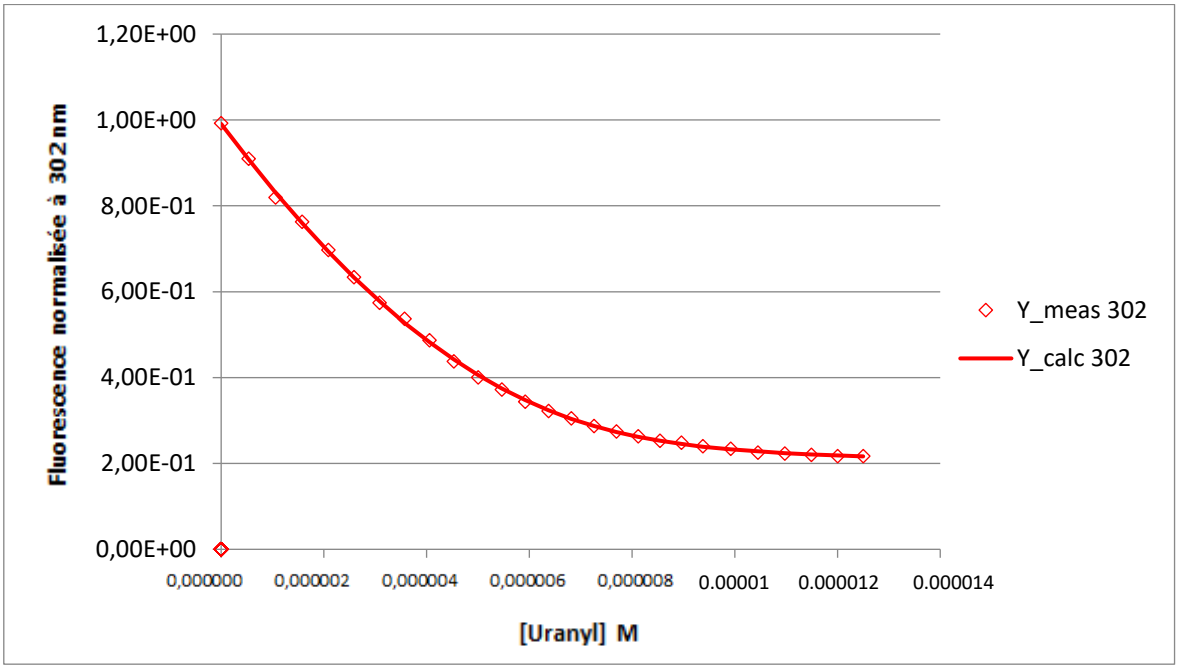
Prédiction structurale du mutant DGYG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold



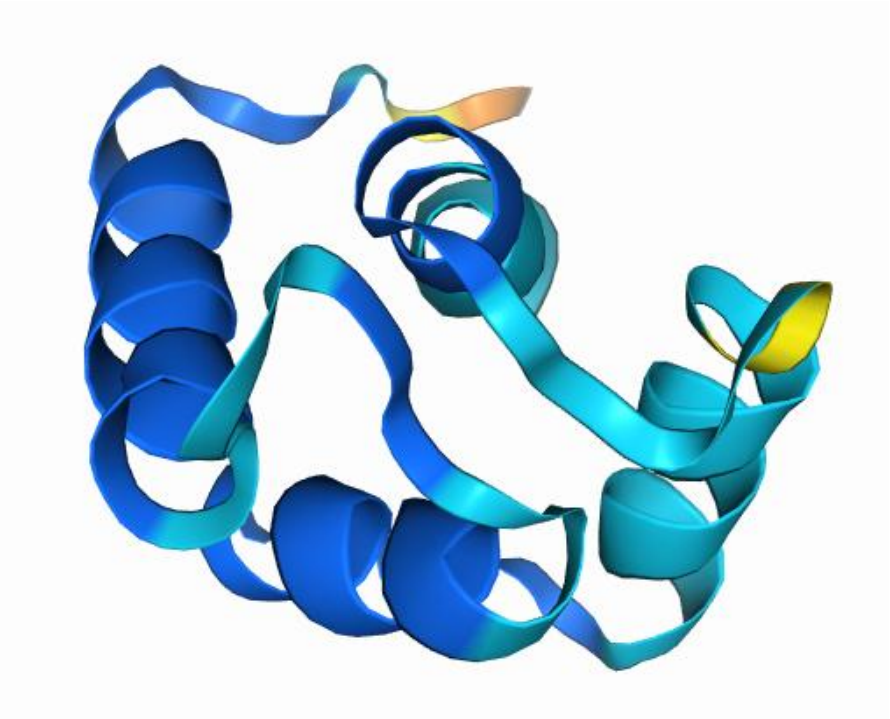
Prédiction structurale du mutant DAHG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



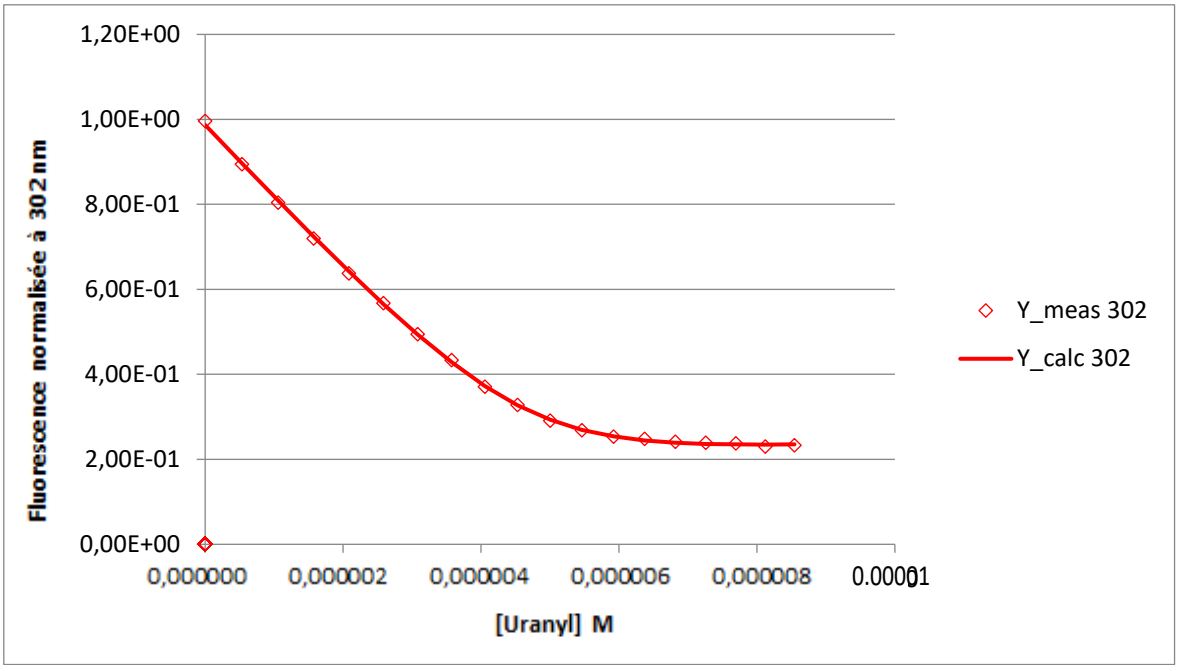
Prédiction structurale du mutant DADG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



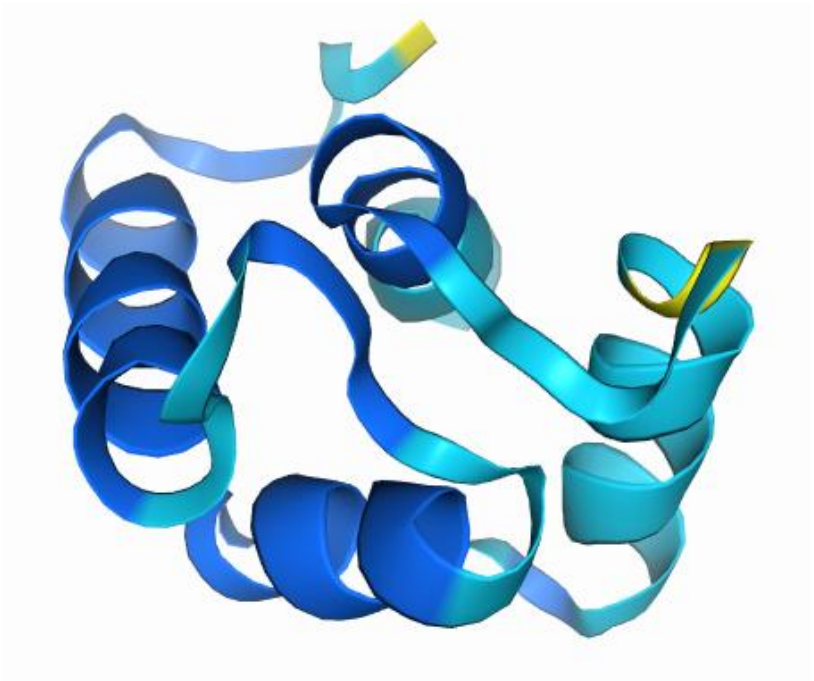
Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm du mutant DADG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en fonction de la concentration en uranyle.



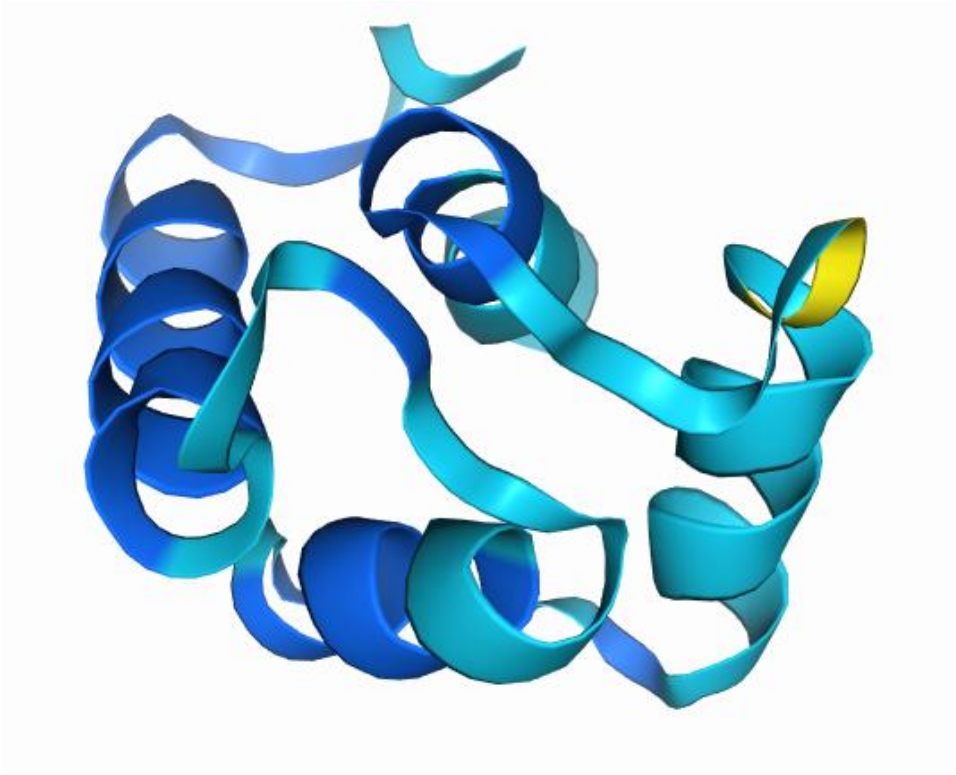
Prédiction structurale du mutant DANG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



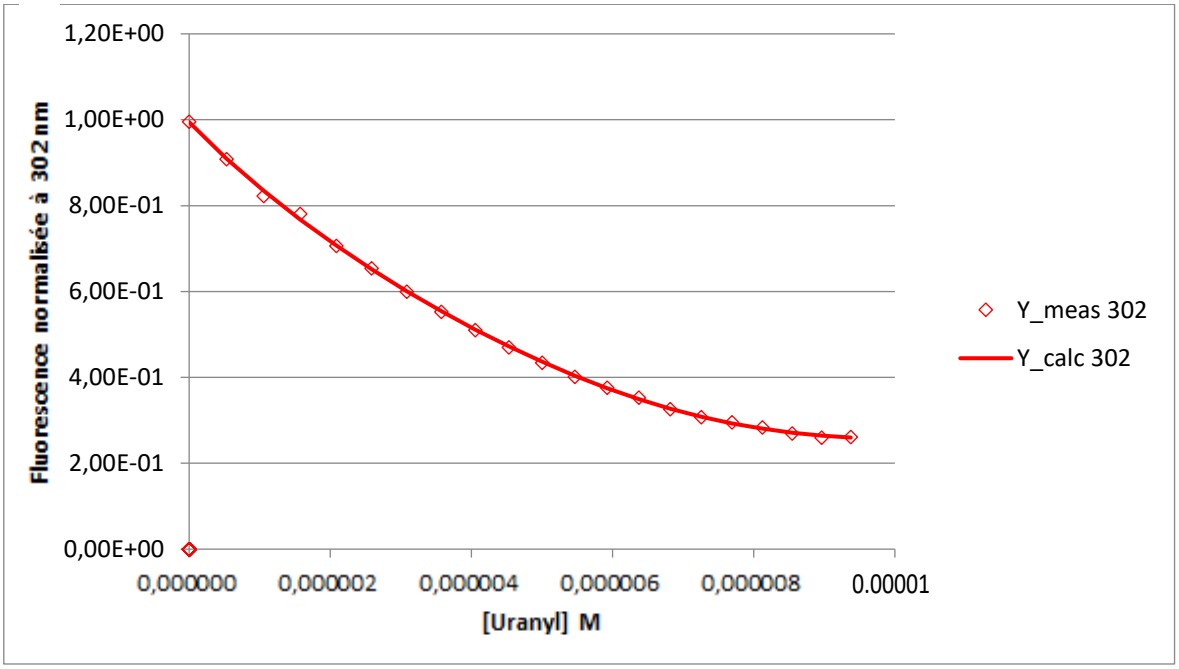
Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm du mutant DANG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en fonction de la concentration en uranyle.



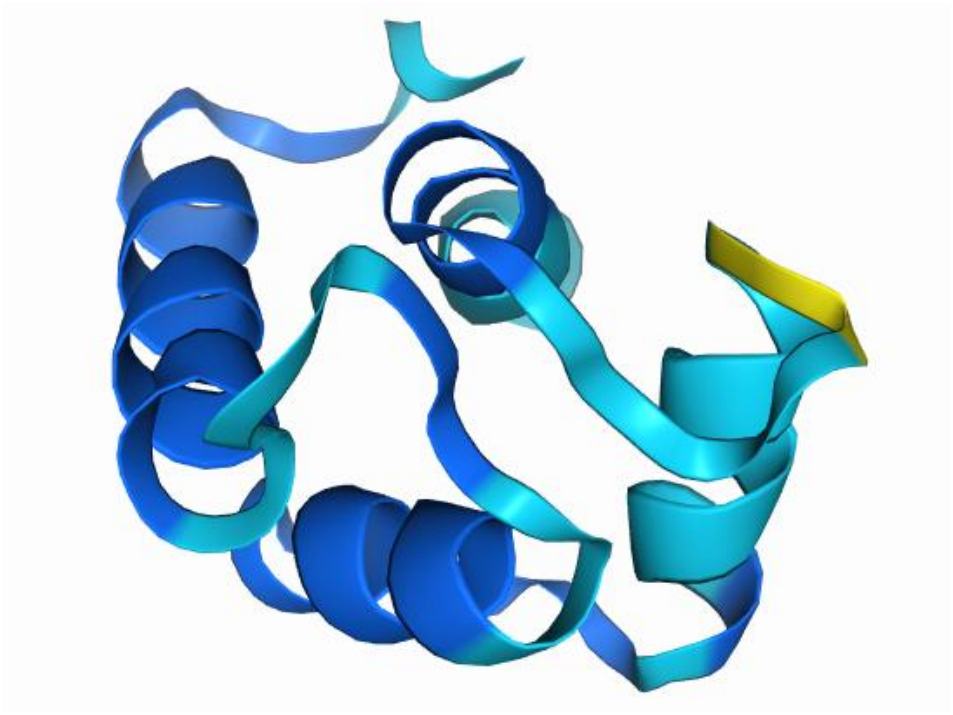
Prédiction structurale du mutant DAQG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



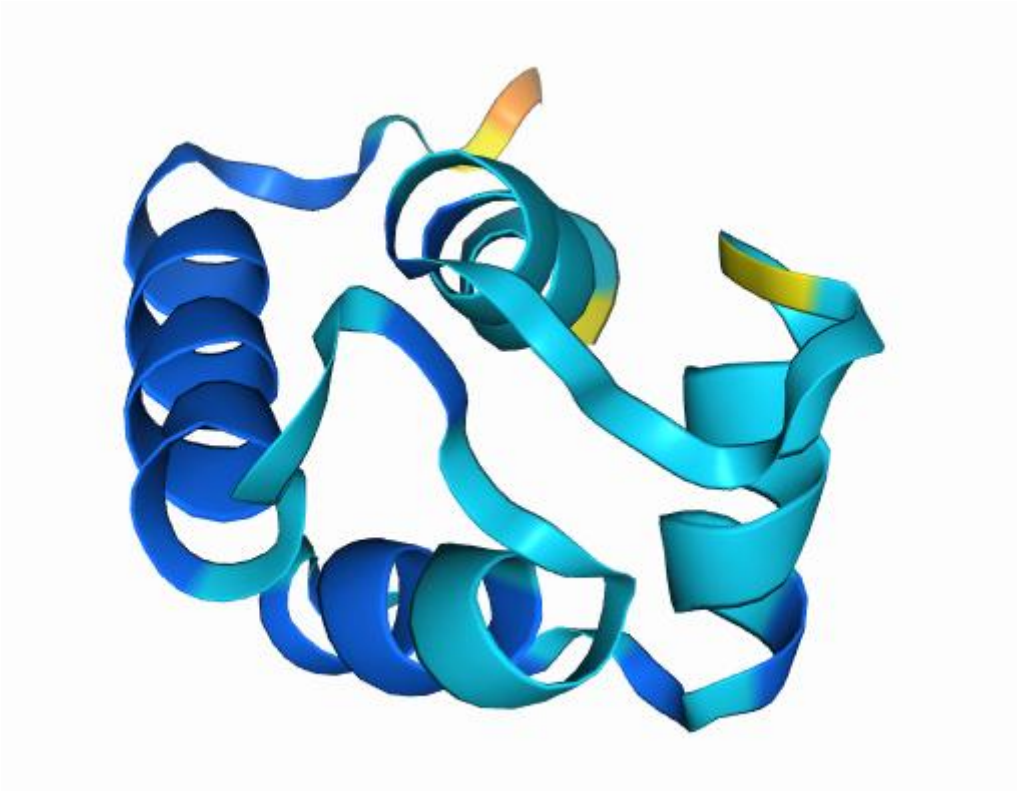
Prédiction structurale du mutant DDDG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



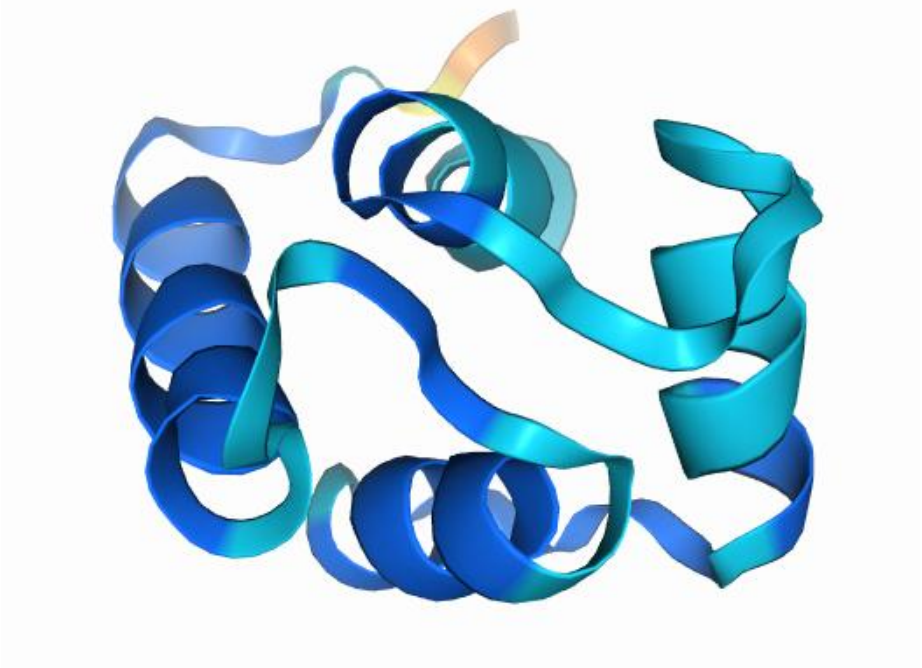
Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm du mutant DDDG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en fonction de la concentration en uranyle.



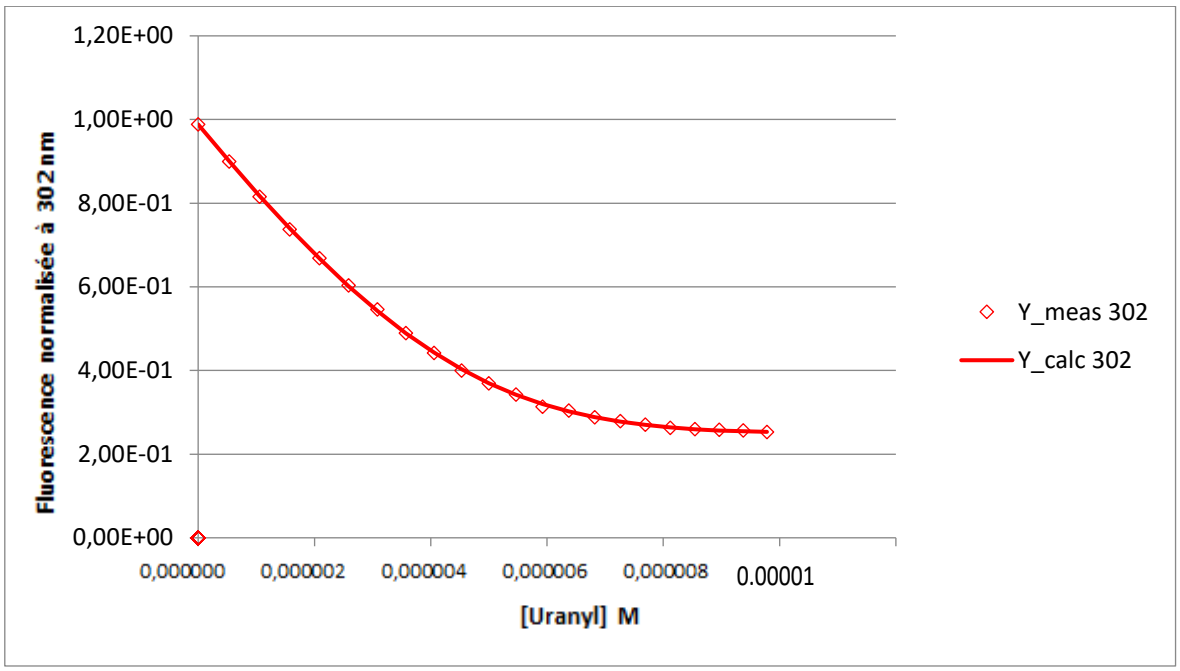
Prédiction structurale du mutant DDQG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



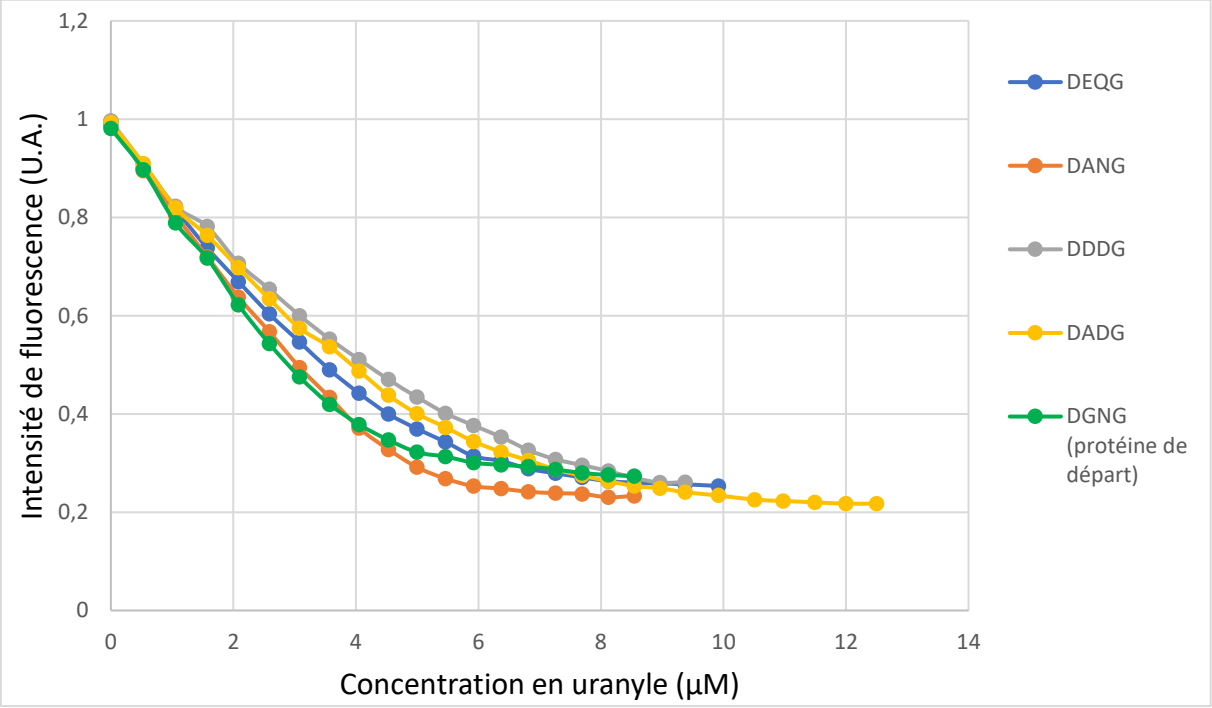
Prédiction structurale du mutant DEDG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



Prédiction structurale du mutant DEQG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en utilisant AlphaFold 3



Diminution de l'intensité de fluorescence à 302 nm du mutant DEQG issu de la CaMΔ$_{I-II}$ en fonction de la concentration en uranyle.



Comparaison des diminutions de l'intensité de fluorescence à 302 nm en fonction de la concentration en uranyle de la CaMΔ$_{I-II}$ et des 4 mutants sélectionnés après analyse par fluorescence en cuve.

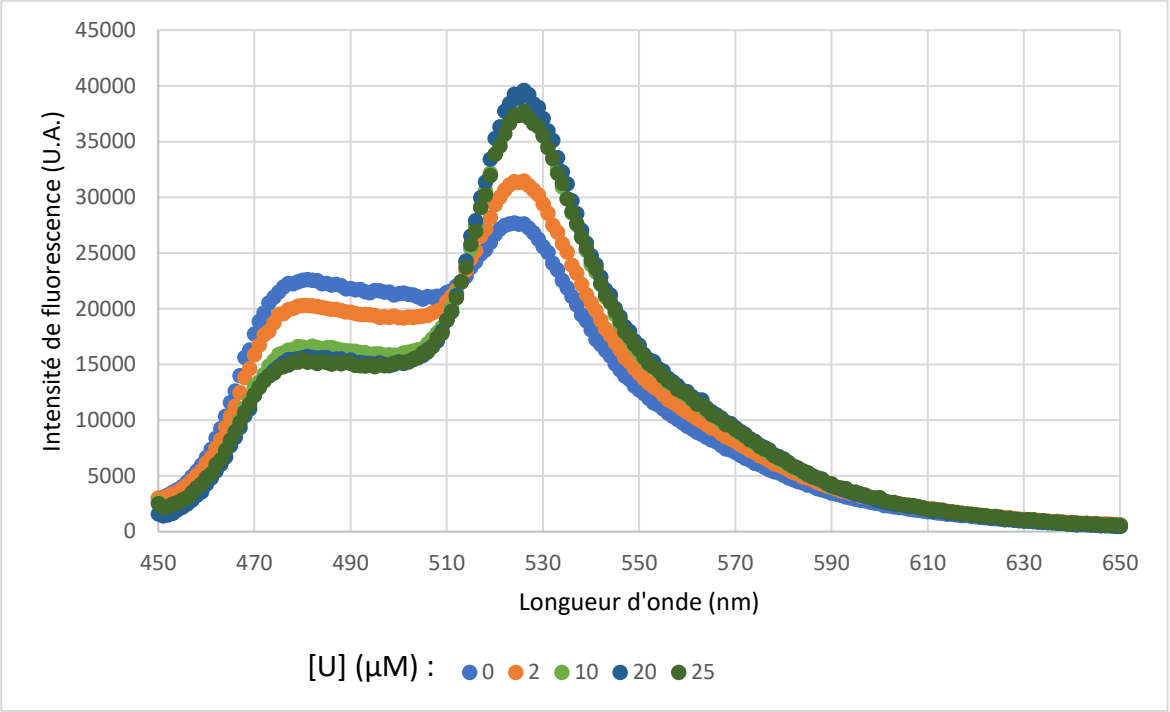
Annexe 5

Analyse des biosenseurs SF1, SF3, SF4 et SF5

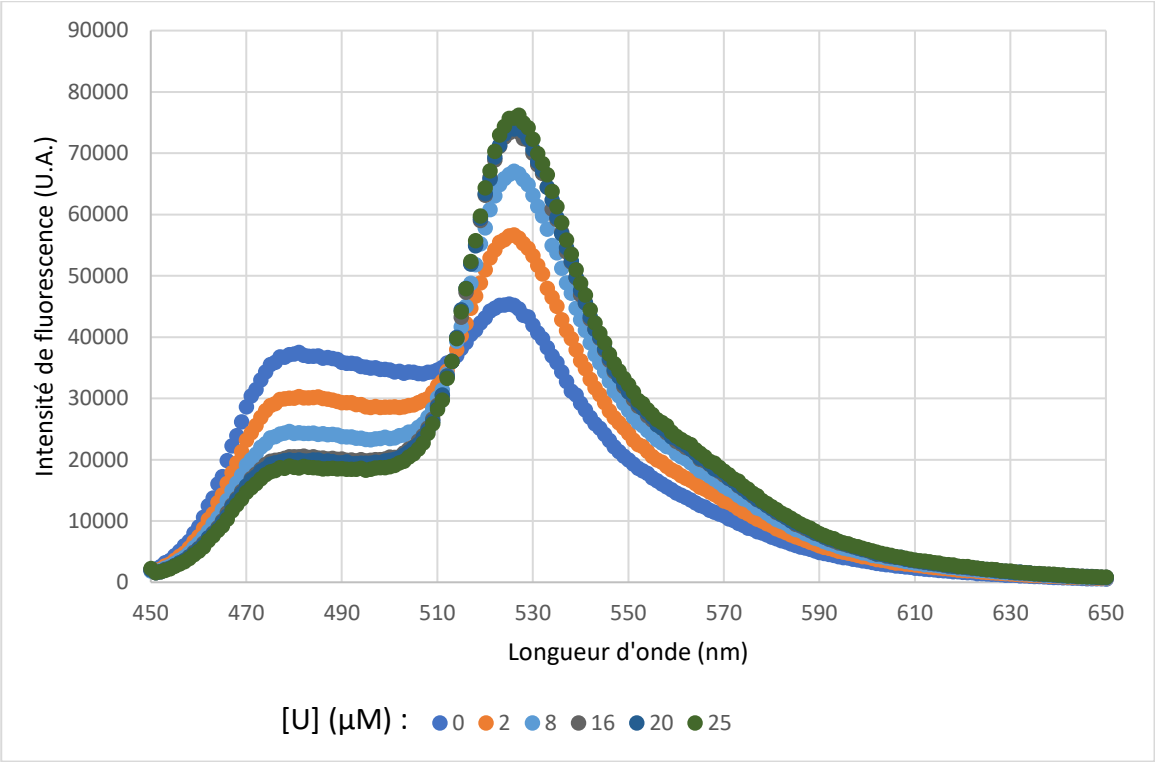
En faisant l'hypothèse que seule la fixation des deux uranyles donnera une modification du signal de FRET, nous avons considéré l'équation :

$$P + 2U \rightleftarrows PU_2$$

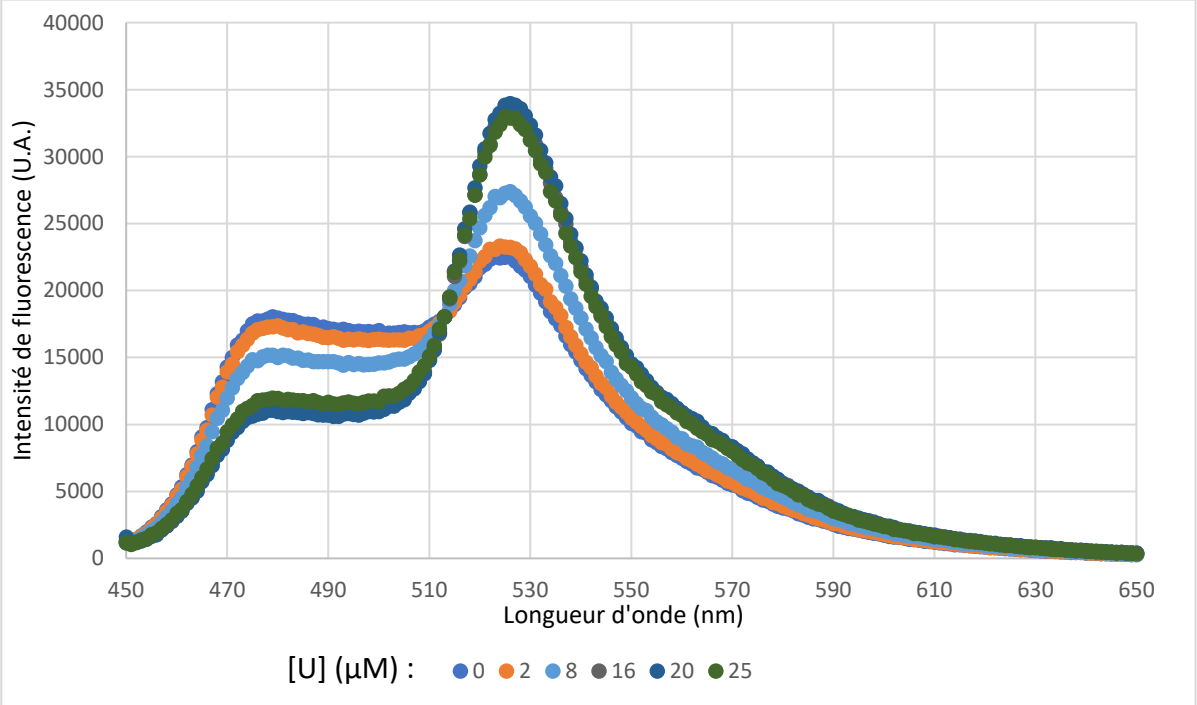
qui permet d'obtenir le $\log\beta_{12}$. Des constantes de dissociation moyenne par site ont ensuite été calculées. Les données correspondent à une moyenne sur trois échantillons. Ce sont des premières données en cours de confirmation.



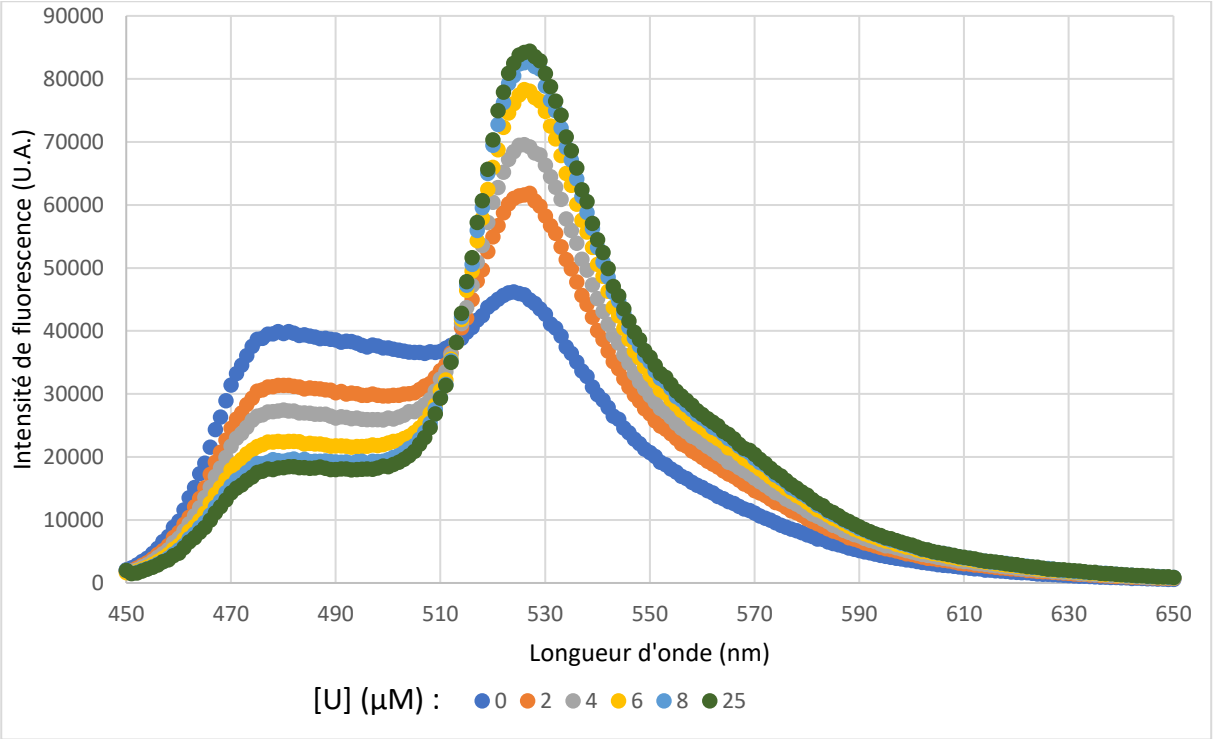
Profils de fluorescence du biosenseur SF1 (les 4 premiers acides aminés du site II ont pour séquence DGNG) à différentes concentrations d'uranyle



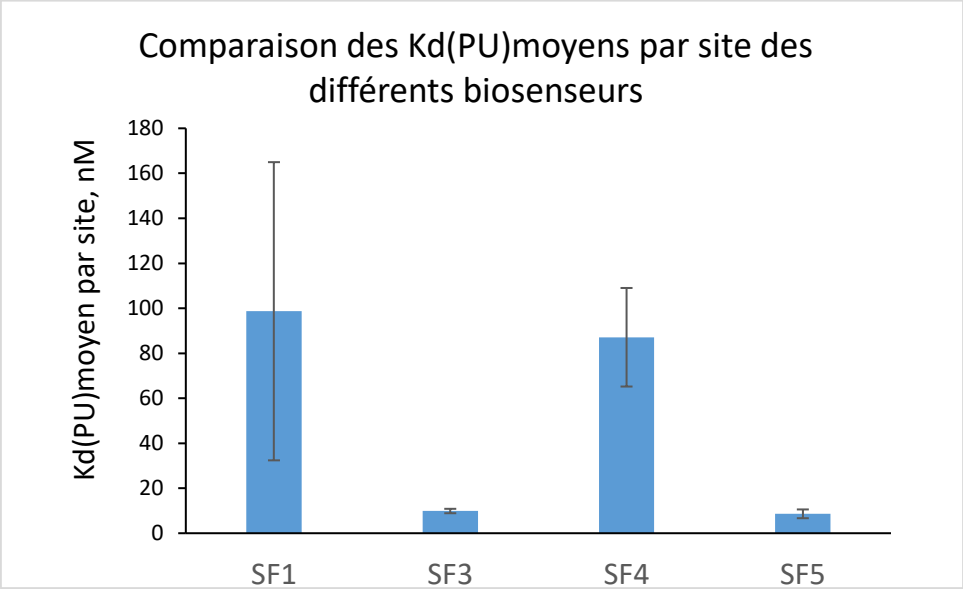
Profils de fluorescence du biosenseur SF3 (les 4 premiers acides aminés du site II ont pour DANG) à différentes concentrations d'uranyle



Profils de fluorescence du biosenseur SF4 (les 4 premiers acides aminés du site II ont pour DDDG) à différentes concentrations d'uranyle



Profils de fluorescence du biosenseur SF5 (les 4 premiers acides aminés du site II ont pour DEQG) à différentes concentrations d'uranyle



Comparaison des constantes de dissociation moyennes pour les 4 biosenseurs

Annexe 6

Contrôle du taux de coupure de ARNg :

Des amorces (sens et antisens) sont conçues de manière à s'hybrider environ 100 nucléotides du site de coupure. Ces amorces sont utilisées pour amplifier par PCR la région entourant le site de coupure visé chez 10 larves à 120 hpf issues de la lignée ciblée, et l'amplicon est séquencé. Ces données ainsi que les séquences des guides à tester sont renseignées dans le logiciel ICE Synthego. Le traitement des données permet de calculer un taux d'indel (taux d'insertion et/ou de délétion) et de décalage du cadre de lecture par guide et par larve, qui permettent de calculer l'efficacité moyenne de coupure pour chaque guide.

Protocole d'édition génétique de *D. rerio :*

La veille de la manipulation, un mâle et une femelle *D. rerio* sont placés dans un pondoir et séparés par une plaque transparente (28 °C, cycle jour/nuit 14/10). Le lendemain matin, la plaque est retirée pour initier la ponte. Les œufs sont collectés et déposés sur gel d'agarose et recouverts d'embryomédium. Le gel d'agarose est moulé de manière à présenter une tranchée permettant d'immobiliser les œufs. Une fois dans la tranchée, les œufs sont orientés afin que le vitellus soit orienté vers le haut.

L'injection des œufs est effectuée le plus rapidement possible après la ponte, afin que les œufs soient au stade 1 cellule. Les œufs sont injectés avec 2-4 nL d'une solution de composition : SpCas9-AUNIP : 6 µM ; ARNg : 8 µM ; Donneur double brins linéaire : 40 ng/µL ; Enhancer V2 (inhibiteur de la voie NHEJ) : 2 µM. Une fois injectés, les œufs sont placés dans une chambre de culture (28 °C, cycle jour/nuit 14/10) jusqu'à leur analyse. Le contrôle du succès de l'édition est ici réalisé par analyse de fluorescence par microscopie, en utilisant un filtre spécifique à la protéine fluorescente observée.

Composé	Concentration (g/L)
NaCl	0,8
NaH_2PO_4	0,004
$CaCl_2$	0,19
KCl	0,04
KH_2PO_4	0,006
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,246
HEPES	1,195

Composition de l'embryomédium E3 (pH 7.2 ; 60x)

Pour l'élevage des individus jusqu'à 24 h, on ajoute 100 µL de bleu de méthylène 1% à 1 L d'embryomédium (1x).