

Les actinides, leur interaction avec les processus biologiques : où en sommes-nous ?

Résumé Les éléments actinides, tous radioactifs, sont présents sur Terre pour une période supérieure de plusieurs ordres de grandeur au cycle de vie d'un être humain. Leur toxicologie est donc une question sociétale, même en l'absence d'événements nucléaires accidentels. Depuis les premières études menées pendant la Seconde Guerre mondiale, les toxicologues spécialistes des actinides ont étudié leurs taux de rétention et d'excrétion, leur impact physiologique en cas d'exposition et leurs principales cibles biologiques. Avec l'accès croissant aux outils spectroscopiques et analytiques non conventionnels et le rôle croissant de la modélisation et de la biologie structurale, la compréhension de l'impact des actinides sur les organismes vivants au niveau biomoléculaire s'est améliorée. Les modes d'interaction avec les métabolites et les protéines, tant d'un point de vue thermodynamique et structural que de leur activité biologique, ont été de mieux en mieux décrits. Cela signifie également comprendre les mécanismes de complexation et l'influence de la forme physico-chimique sur l'affinité, explorer leurs conséquences sur la fonction des protéines/enzymes pour certaines cibles. Cet article embrasse vingt ans de chimie dite « bioactinidique » avec une sélection d'exemples, illustrant ainsi la complémentarité des disciplines scientifiques impliquées.

Mots-clés Radiochimie, actinides, chimie bioactinidique, biochimie, toxicologie nucléaire.

Abstract Actinides and their interaction with biological processes: where do we stand?

Actinide elements, all radioactive, are present on Earth for a period of time that is several orders of magnitude longer than the life cycle of a human being. Their toxicology is therefore a societal issue, even in the absence of accidental nuclear events. Since early studies during the Second World War, actinide toxicologists have explored the retention and excretion rates of these elements, their physiological impact in the event of exposure and their main biological targets. With increasing availability of non-conventional spectroscopic and analytical tools, and increasing role of modelling and structural biology, understanding the impact of actinides on living organisms at the biomolecular level has improved. The modes of interaction with metabolites and proteins from both a thermodynamic and structural point of view, as well as from their biological activity have been better and better described. This also means understanding complexation mechanisms and the influence of physico-chemical form on affinity, exploring consequences on protein/enzyme function for some targets. This article covers twenty years of so-called "bioactinidic" chemistry with a selection of examples, illustrating the complementarity of scientific disciplines.

Keywords Radiochemistry, actinides, bioactinidic chemistry, biochemistry, nuclear toxicology.

Les complexes d'ions métalliques sont en général essentiels et omniprésents dans les systèmes biologiques et leur diversité est due à la multiplicité des ligands présumés. On désigne sous le vocable « métallome » l'ensemble de ces complexes. En règle générale, la plupart des métaux essentiels au métallome se trouvent dans la partie supérieure du tableau périodique – principalement la première ligne des métaux de transition –, bien qu'il y ait quelques exceptions.

La famille des éléments actinides (An) tient une place particulière dans le tableau de Mendeleïev. Elle est composée de quinze éléments correspondant au remplissage de la couche électronique 5f (de l'actinium, $Z = 89$, au lawrencium, $Z = 103$). Du point de vue de la chimie, ils ont une forte tendance à l'hydrolyse et présentent une large gamme de degrés d'oxydation (+III, IV, V et VI pour les plus communs) pour ce qui est de la première partie de la série, du thorium (Th) au curium (Cm). Appelés « acides durs », selon la classification de Pearson, ils ont une affinité particulière pour les bases dures : hydroxyde, carbonate, carboxylate, phosphate, etc. Ils présentent une certaine analogie chimique avec d'autres métaux de transition (affinité pour les bases dures) mais s'en distinguent par leur taille et donc leur coordinence. Du point de vue de la physique, ces éléments ne possèdent pas d'isotope stable – ce sont des radioéléments –, ce qui leur confère une toxicité

radiologique totalement indépendante de leurs propriétés chimiques [1].

Les recherches sur les effets sanitaires liés à la chimie et à l'exposition aux radioéléments ont été initiées en 1942 dès le début du projet Manhattan développé aux États-Unis pour la mise au point de l'arme nucléaire. En 1943, année de la construction du réacteur de production de plutonium (Pu) (réacteur Hanford B, WA, E.-U.), H.C. Hodge à l'Université de Rochester a été chargé d'évaluer les effets potentiellement délétères de l'utilisation de l'énergie atomique sur la santé humaine [2]. Ces premières études ont permis de décrire la rétention ainsi que les taux d'excrétion des actinides en fonction de l'élément, de son état redox et de son mode d'administration (injection, ingestion ou inhalation) [3]. Les principaux organes cibles de ces éléments ont été identifiés, et leur impact toxique a été évalué en fonction de l'exposition ou de la dose d'injection. La sensibilité de divers organismes vivants modèles a également été explorée : souris, rats, lapins, chiens et singes. Sur la base de ces données obtenues dès le début du projet Manhattan, des comités internationaux tels que l'ICRP (International Commission on Radiological Protection), créé en 1928, et l'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation), créé en 1955, apportent un éclairage constant sur les effets de l'exposition

aux radionucléides et à leur rayonnement et définissent les limites d'exposition aux rayonnements ionisants pour les travailleurs du nucléaire et le public.

Depuis les années 1990, les développements en sciences analytiques et en spectroscopie ont permis d'appréhender plus largement les effets des radionucléides au niveau moléculaire : approches protéomiques, avec en particulier l'essor de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'identification des protéines en très faibles concentrations et en mélanges complexes ; approches métallomiques, avec le développement des couplages analytiques et en particulier de la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP/MS) ; utilisation plus large des outils de biologie moléculaire, des spectroscopies avancées comme la spectroscopie d'absorption des rayons X ; possibilité d'étudier des rapports isotopiques qui permettent d'améliorer la connaissance des mécanismes liés à l'internalisation des métaux par les cellules ; et enfin modélisation, voire développement d'approches bio-informatiques dédiées.

L'essor de ces techniques a ainsi permis d'apporter de nouveaux éclairages sur les mécanismes d'action des actinides à l'échelle (bio)moléculaire sur le vivant.

Les actinides et le métabolome

Vous avez dit spéciation ?

Quatre milieux sont généralement pris en compte pour l'étude du transfert des actinides et leur spéciation chez l'humain [4] : le sérum sanguin, la salive, le « jus gastrique » et le milieu de culture. Ces quatre milieux ont des potentiels redox voisins (entre 200 et 300 mV/ENH) alors que le pH est bas pour le jus gastrique (de 1,5 à 5,5), intermédiaire pour la salive ($5,6 < \text{pH} < 7,6$) et neutre pour les deux autres (7,4). Les équilibres ionique et acido-basique des milieux biologiques sont assurés principalement par des cations comme par exemple le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium, des anions minéraux comme les chlorures, les sulfates, les phosphates, ou organiques comme le citrate, les bicarbonates, le lactate, l'oxalate, ainsi que des protéines très variées dépendantes du compartiment biologique considéré (organe, fluide, cellules etc.).

Établir la spéciation, à savoir la nature chimique des espèces métalliques présentes dans le milieu, nécessite une boîte à outils qui comprend les diagrammes de Latimer (détermination des degrés d'oxydation), la connaissance des constantes de complexation par différents ligands, l'élaboration de modèles structuraux et des modèles physico-chimiques de traitement de l'écart à l'idéalité. Compte tenu des valeurs de pH des milieux biologiques, le premier ligand à considérer est l'anion hydroxyde (hydrolyse). En première approche, avec un potentiel compris entre 200 et 300 mV/ENH, on peut déjà noter que les An sont à des degrés d'oxydation différents : pour Pu majoritairement +IV et dans une moindre mesure +III, avec probablement le degré d'oxydation +V (plutonyle) ; pour U essentiellement +VI (uranyle) ; pour Np, un équilibre entre +V (neptunyle) et +IV ; et pour Am et Cm +III. Il est possible de construire le diagramme de spéciation pour chaque degré d'oxydation lorsque les constantes de complexation sont connues. Si les bases de données sont bien renseignées pour les constantes des ligands inorganiques, ceci est moins vrai pour les petits ligands organiques, et encore moins pour les protéines. À titre d'exemple, dans le milieu sérum sanguin (pH 7,4), pour les deux degrés d'oxydation les plus élevés +IV

et +V, en ne considérant que les anions chlorure, carbonate, phosphate et citrate, on obtient :

- les An(IV) sous forme de complexes tri- ou tétra-hydrogénéphosphate ($\text{An}(\text{HPO}_4)_3$ ou $4^{2\text{ ou }4-}$) si on considère Th(IV) ou Np(IV), alors que Pu(IV) est sous forme insoluble $\text{Pu}(\text{OH})_4$ [5] ;
- les An(V) sous forme libre AnO_2^+ (environ 25 %), de complexes mono-carbonate $\text{AnO}_2(\text{CO}_3)^-$ (environ 60 %) [6-8], mono-citrato $\text{AnO}_2(\text{Cit})$ [2-9] et mono-hydrogénéphosphate $\text{AnO}_2(\text{HPO}_4^{2-})$ (environ 7 % chacun), et une très faible proportion de complexe di-carbonate.

Ces résultats montrent qu'il faut être extrêmement vigilant car ces calculs dépendent de la disponibilité des constantes de complexation et de leur précision, ainsi que de la connaissance des concentrations en constituants biologiques dans le milieu !

Modélisation de l'interaction

La modélisation de l'interaction est un outil de choix pour l'analyse de la structure moléculaire entre les An et les systèmes biologiques (protéine par exemple), soit à l'aide des méthodes statiques de la chimie théorique, soit à l'aide des techniques de dynamique (dynamique moléculaire quantique). Par rapport à un calcul statique, la dynamique moléculaire possède l'avantage de laisser naturellement évoluer un système au cours du temps dans un solvant (sur quelques dizaines de picosecondes). En général, la simulation dans son ensemble d'un complexe protéine-métal est impossible en raison de la taille importante de celle-ci (grand nombre d'atomes) et un modèle simplifié impliquant seulement les groupes fonctionnels principaux doit être envisagé. Il faut préciser que les An aux degrés d'oxydation +III et +IV ne présentent pas de contrainte stérique autre que la taille de l'ion solvaté, alors qu'aux degrés d'oxydation +V et +VI, la présence du motif trans-dioxo $\{\text{O}=\text{An}=\text{O}\}^{1,2+}$ impose une coordination uniquement dans le plan équatorial (le plan axial étant défini par la liaison trans-oxo). L'accès à la structure de la première sphère de coordination du cation est souvent rendu possible par des allers-retours entre les mesures de spectroscopie (spectroscopie d'absorption X ou vibrationnelle par exemple) et les simulations.

Métabolites

Les métabolites sont des petites molécules organiques issues des diverses voies du métabolisme cellulaire ; l'ensemble des métabolites constitue le métabolome. L'analyse de la variation en composition des métabolites permet d'étudier les conséquences d'un stress, d'une contamination par des métaux tels que les An, et d'identifier dans certains cas des biomarqueurs de contamination. Parmi les nombreux exemples d'interactions métabolites-actinides, on peut mentionner les sidérophores bactériens qui jouent un rôle clé dans le transport et la biodisponibilité du fer au niveau des sols et des interactions sol-plantes, et qui peuvent interagir avec les An(IV) et An(VI), comme la desferrioxamine B [10]. Des analyses métabolomiques, associées ou non à d'autres approches « omiques », menées sur des rats ont montré qu'au cours d'une exposition chronique à une faible dose d'uranium, la cible principale de U dans les cellules rénales est le métabolisme du nicotinate/nicotinamide et des acides gras insaturés [11].

Chez les plantes, de nombreuses études montrent une forte interaction entre U(VI) et le métabolisme cellulaire. Par exemple, la présence de U(VI) provoque de nombreux phénomènes : une carence en phosphate qui se traduit par

une diminution considérable des pools des métabolites phosphorylés ; une perturbation des voies de signalisation et d'assimilation de Fe et une modification de sa distribution cellulaire ; ou encore une accumulation principalement au niveau de la paroi pectocellulosique qui semble perturber sa biosynthèse, provoquant par exemple l'accumulation de callose et de lignine qui empêche la propagation du métal toxique dans les racines. Les voies de biosynthèse et de signalisation de l'auxine, hormone impliquée dans de nombreux processus développementaux, sont également altérées, ce qui provoque d'importantes modifications de la croissance racinaire. Enfin, il est important de noter que l'interaction de U(VI) avec les acides organiques (citrate, lactate) dans l'environnement et dans la plante est un facteur majeur dans le contrôle de l'absorption et de la distribution de l'élément dans ses différents organes.

Peptides

Les peptides sont des outils chimiques performants pour étudier la coordination des métaux par les protéines naturelles, mais aussi pour développer des agents biocompatibles pour la chélation *in vivo* et la décorporation. En effet, ils sont constitués d'acides aminés, les briques élémentaires des protéines, et reproduisent donc de façon simplifiée les sites naturels connus ou prédits dans ces dernières pour lier les ions métalliques [12]. Les bases dures impliquent des donneurs oxygénés des groupes carbonyle du squelette peptidique ou des chaînes latérales des acides aminés : carboxylates des aspartates ou glutamates, C-ter de la chaîne peptidique, phénolate de la tyrosine et les groupes phosphate de la phosphosérine ou de la phosphothréonine. La coordination de l'atome d'azote du cycle imidazole de l'histidine peut également être observée, même si cet azote est un donneur intermédiaire.

Un autre paramètre important dans les interactions des peptides avec les actinides est l'adaptation de la structure tridimensionnelle du peptide à la géométrie de coordination des An, sphérique ou dans le plan équatorial suivant le degré d'oxydation. La sélection de courtes séquences peptidiques présentes dans les protéines liant les An permet de comprendre les interactions mises en jeu ainsi que la capacité du fragment à s'adapter à la géométrie de coordination de l'An. Les peptides linéaires ne présentent en général pas de structure définie ; ils sont dits « random coil » ou non structurés. Ils peuvent donc se replier librement autour de l'ion métallique. Une seconde approche vise à exploiter les contraintes structurales dans les séquences peptidiques pour préorienter les groupes coordonnants vers le cation métallique et ainsi mettre au point des peptides structurés avec des géométries préorganisées pour la chélation. Cette stratégie permet de minimiser la réorganisation structurale du squelette peptidique lors de la complexation et ainsi d'augmenter la stabilité des complexes peptide-actinide formés. Par exemple, les décapeptides cycliques possédant une structure en feuillet β parfaitement adaptée à la coordination de U(VI) dans son plan équatorial peuvent orienter quatre chaînes latérales d'acides aminés dans la même direction de l'espace. La cyclisation du décapeptide selon le schéma présenté *figure 1* a ainsi permis d'obtenir des complexes de U(VI) nettement plus stables que ceux observés avec les peptides linéaires de même séquence.

Le design rationnel de peptides structurés permet ainsi de maîtriser les contraintes géométriques introduites dans le

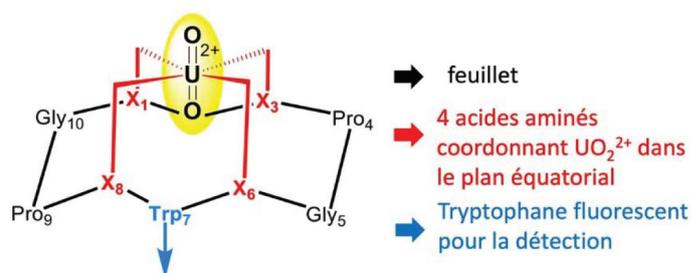


Figure 1 - Un cyclodécapeptide de structure adaptée à la coordination de U(VI) [12].

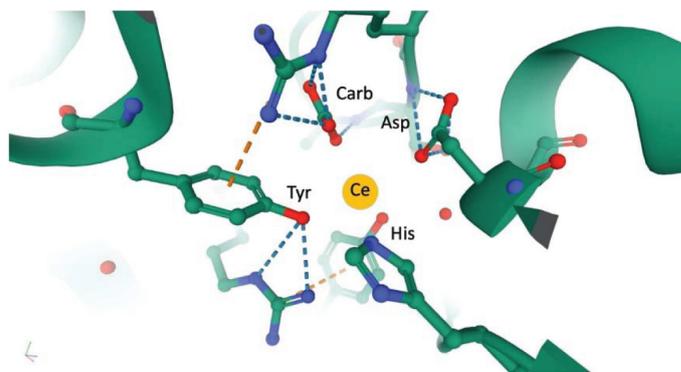


Figure 2 - Représentation du site de complexation du Ce(IV) dans le lobe N de la lactoferrine (d'après la référence PDB 1FCK [13]). Les fonctions complexantes sont un carbonate bidentate (Carb), une tyrosine (Tyr92), une aspartate (Asp60) et une histidine (His253). Notons que Ce(IV) (un lanthanide) est parfois considéré comme un analogue structural de Pu(IV).

squelette peptidique pour stabiliser les complexes métalliques. Cette approche biomimétique conduit donc à la mise au point de complexes actinide-peptide mimant la forme liée de l'An dans la protéine, et donc de proposer et identifier des sites de liaison inconnus des ions An dans leurs protéines cibles.

Les protéines sont-elles « actinophiles » ?

On estime qu'environ la moitié des protéines exprimées chez l'homme interagissent avec les métaux, constituant le « métalloprotéome ». L'excès comme la carence en métaux sont néfastes pour les cellules et sont à l'origine de dysfonctionnements physiologiques, voire de pathologies. L'homéostasie des métaux est donc finement régulée et met en jeu des systèmes complexes, grâce à des protéines qui les lient pour assurer leur transport et leur stockage éventuel, mais aussi leur approvisionnement pour les métalloprotéines. Certains métaux non physiologiques peuvent se substituer aux métaux essentiels, affectant ainsi la structure, la stabilité et la fonction des protéines, conduisant à des complexes aux structures inadéquates, de stabilité variable et aux propriétés altérées. C'est en particulier le cas des An qui n'ont aucune fonction biologique connue et qui de surcroît présentent une forte radiotoxicité.

Les premières études concernant les cibles protéiques des An se sont orientées vers les protéines sériques, en particulier la transferrine, la ferritine ou l'albumine. Elles ont confirmé la formation de complexes entre la transferrine et plusieurs An dont U(VI) et les An(III) et (IV). Bien qu'aucune structure n'ait été reportée avec les An, un exemple du site de complexation métallique de Ce(IV) avec la lactoferrine est présenté en *figure 2*.

L'albumine forme également des complexes avec Cm(III), qui pourrait se lier dans un site N-terminal. Des tentatives de

rationalisation du comportement des An ont été menées en se focalisant sur les analogies entre certains métaux essentiels et des An : Pu(IV) versus Fe(III), et U(VI) dans UO_2^{2+} versus Ca(II). L'interaction de Pu(IV) avec les sites à Fe(III) de la transferrine et celle de U(VI) avec les sites à Ca(II) de la calmoduline étayent ces analogies. Des approches *in silico* ont par ailleurs conduit au développement d'un algorithme qui permet la détermination des sites potentiels de liaison de U(VI) au sein des protéines. Différentes approches expérimentales sans a priori ont également été développées pour identifier les cibles des An. Des études de protéomique réalisées directement à partir de fluides biologiques comme le sérum, la salive ou d'extraits cellulaires ont permis d'identifier des protéines cibles potentielles originales de ces An et montré leur grande diversité. Elles ont pu être regroupées selon quelques critères, comme en particulier leurs capacités à lier un métal, à posséder des phosphorylations, etc.

Dans le cas des plantes, les recherches concernant les protéines cibles de U(VI) sont beaucoup moins avancées et aucune d'entre elles n'a encore été identifiée et caractérisée. Une approche métallogénomique est en cours de développement pour analyser la réponse des cellules d'*Arabidopsis* au stress U [14]. Il a été montré pour la première fois que des pools de protéines d'*Arabidopsis* sont des cibles potentielles de liaison de U(VI) *in vivo*. Les différentes approches biochimiques développées par la suite ont permis d'identifier un taux particulièrement élevé d'acides aminés carboxylés, des zones déstructurées, et/ou des sites multiples de phosphorylation.

En conclusion, les caractéristiques majeures des interactions de U(VI) dans les protéines sont la présence de clusters acides (carboxylates des aspartates et glutamates) et de phosphorylations dans des sites souvent de surface exposés aux solvants. Pour les autres An, la détermination de ces sites de liaison est moins bien renseignée à ce jour. Cependant, ils semblent mettre en jeu tout ou partie des ligands de Ca(II) ou de Fe(III), leur sphère de coordination étant complétée par des molécules d'eau.

Transferrine, fétuine et calmoduline : des cas particulièrement bien étudiés

La transferrine (Tf) est l'une des toutes premières protéines cibles identifiées et ses modes d'interaction avec les An restent les plus largement explorés à ce jour. Cette glycoprotéine d'environ 79 kDa peut complexer jusqu'à deux cations Fe(III) dans deux lobes différents, conduisant à leur fermeture, assurant ainsi la reconnaissance de la transferrine par son récepteur et son internalisation cellulaire. Cette protéine semble être une cible principale de Pu(IV) et plus généralement des An au degré d'oxydation +IV (Np, Pa et Th), identifiée dès 1965. L'affinité des An(III) (Am, Cm et Cf) est quant à elle plus faible, puisque seulement 30 % de Am(III) et de Cm(III) semblent être associés à la protéine [15]. Enfin, la transferrine ne présente qu'une affinité très limitée pour U(VI), ce dernier se liant à moins de 15 % [16]. Tout au long de ces cinquante dernières années, l'affinité de la transferrine pour les An aux différents degrés d'oxydation a ainsi été établie, les sites de complexation ont été précisés et des similarités avec le comportement du cation Fe(III) mises en évidence. En particulier, les différents travaux réalisés sur la base de mesures par spectroscopie d'absorption X, par spectrophotométrie ou encore par fluorescence ont confirmé un site de complexation commun pour Pu(IV), Np(IV) et Fe(III) – impliquant des

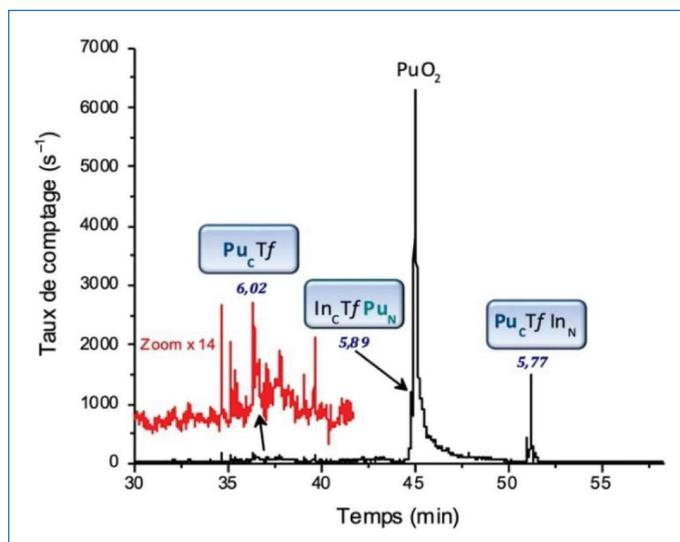


Figure 3 - Exemple de séparation de trois complexes Pu-transferrine par focalisation isoélectrique capillaire et couplage à un spectromètre de masse de type ICP/MS pour la détection spécifique du plutonium. En raison d'interférences isobariques entre le fer et le plasma, le fer a été remplacé par l'analogie In. Trois complexes se distinguent par un point isoélectrique différent (en bleu). L'atome de Pu est détecté, soit sur le lobe C, soit sur le lobe N, avec ou sans atome d'indium présent sur le second site libre [18].

groupements histidine, tyrosine et aspartate [17]. D'un point de vue thermodynamique, les constantes de complexation des An avec la Tf ont été définies, dans un premier temps, sur la base de mesures spectroscopiques, et beaucoup plus récemment en utilisant l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (EC-ICP/MS) [18] (figure 3).

Les auteurs ont montré en particulier que l'affinité de l'un des lobes de la protéine pour Pu(IV) est beaucoup plus élevée que pour Fe(III), alors qu'elle semble comparable entre ce dernier et Th(IV). Les constantes des An(III), quant à elles, sont sensiblement inférieures à celles des An(IV). Les conséquences de la liaison des An avec la transferrine sur son internalisation cellulaire, quoique moins largement explorée, ont toutefois fait l'objet de travaux de recherche. Ainsi récemment, la possible internalisation cellulaire d'un complexe avec Pu(IV) a été mise en évidence en combinant diffusion des rayons X et microscopie de fluorescence à rayons X [19].

La fétuine A, protéine sérique hyperglycosylée de 48 kDa, est à l'heure actuelle une des protéines présentant la plus forte affinité pour U(VI). Sécrétée par les hépatocytes, son rôle principal est de prévenir les dépôts ectopiques de phosphate de calcium auquel elle se lie et qu'elle transporte vers l'os où se termine son cycle de vie. Elle constitue un quart de la fraction des protéines non collagéniques du squelette. Elle possède trois sites de fixation de cet actinide, dont un site de forte affinité, inférieure au nM. Bien que ce site principal n'ait pas été clairement identifié, plusieurs indices convergent vers sa localisation dans le domaine cystatine 1, riche en clusters acides constitués d'acides aminés aspartate ou glutamate, prédisposés à la complexation d'acides durs. Dans le sang, la présence de carbonates conduit à la formation probable d'un complexe ternaire qui se traduit par une action encore renforcée de la fétuine [20]. Ainsi, malgré une concentration relativement faible dans le sérum en comparaison à celles de la transferrine ou de l'albumine, la fétuine complexe à elle seule plus de 80 % du U(VI) lié aux protéines sériques. Elle possède également une remarquable affinité pour Pu(IV) à pH

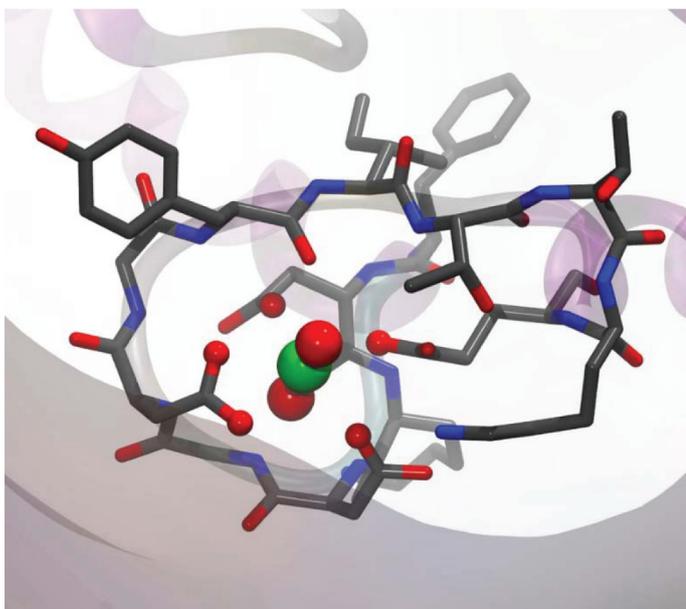


Figure 4 - Modèle structural de la coordination de U(VI) sur le site de fixation du calcium (site 1) de la calmoduline, obtenu par dynamique moléculaire. Une coordination par cinq ligands équatoriaux est soutenue par les données de XAS, tandis que les données de spectroscopie IRTF montrent bien l'implication de ligands carboxylate monodents et bidents [23].

physiologique, également établie en EC-ICP/MS, similaire à celle de la transferrine pour ce cation, ce qui pourrait expliquer sa biodistribution osseuse et hépatique.

Enfin, des approches de biochimie *in vitro* ont identifié des protéines ayant un cofacteur calcium parmi la majorité des cibles potentielles de Pu(IV) [21] et certaines de celles de U(VI) [22]. De plus, Pu(IV) mais aussi Np(V) ou U(VI) ainsi que des An trivalents comme Cm(III) se fixent sur le motif canonique des sites de fixation du calcium les plus répandus chez les eucaryotes, le motif hélice-boucle-hélice de la calmoduline, et cela avec une affinité en général plus forte que celle du calcium lui-même. Ce motif, qui fixe le calcium par une boucle contenant douze acides aminés, est présent chez tous les eucaryotes et joue notamment un rôle clé dans la signalisation calcique et la régulation de nombreuses protéines et fonctions cellulaires. C'est la fixation du calcium de façon coopérative sur quatre sites qui permet cette régulation en induisant un changement de conformation de la calmoduline en réponse à une concentration en calcium de l'ordre du micromolaire. Or U(VI) se fixe avec une affinité mille fois supérieure à celle du calcium sur le site 1 de la calmoduline (figure 4).

Cette coordination perturbe le repliement de la protéine et son interaction avec un partenaire modèle, la phosphodiesterase, ce qui indique une toxicité possible par perturbation de la signalisation calcique, comme cela a été observé avec certains lanthanides [24]. L'étude en cours des interactions entre Pu(IV) et des motifs de type hélice-boucle-hélice montre également une très forte affinité de Pu(IV) pour ces sites, comparable pour certains d'entre eux à l'affinité du Pu pour la transferrine [25].

Quid des protéines phosphorylées ?

Les groupements carboxylate sont largement impliqués dans les sites de complexation des An, identifiés au sein des protéines. Toutefois, en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques, les groupements phosphate sont également susceptibles d'intervenir dans l'interaction des protéines avec les An. Si l'on estime que près d'un tiers des protéines

Protéines et phosphorylations

La cellule doit constamment réagir à des stimulus internes et externes. Afin d'élargir rapidement le champ des fonctionnalités de son protéome, un mécanisme majeur de la régulation de la fonction des protéines consiste à les modifier chimiquement après leur synthèse. Ces modifications post-traductionnelles (MPT) peuvent être multiples pour une même protéine au cours de son cycle de vie. L'augmentation de cette combinatoire accroît la finesse de la régulation de l'homéostasie cellulaire.

Certaines MPT sont réversibles comme les phosphorylations/déphosphorylations, un des processus les plus fréquents (environ un tiers des protéines cellulaires est phosphorylé au cours de son cycle de vie) et les plus puissants de cette régulation. Ces processus sont réalisés par deux types d'enzymes : les kinases assurent l'addition d'un phosphate (PO_4^{3-}) issu d'un nucléotide triphosphate (comme l'ATP) à une sérine, une thréonine ou une tyrosine de la protéine ; les phosphatases restaurent l'état initial de la protéine en retirant ce groupement.

Ce processus d'addition/retrait induit des changements de conformation qui modifient l'activité et les capacités d'interactions des protéines avec ses partenaires. Le taux moyen de phosphorylation du pool d'une protéine cellulaire est généralement faible. Il existe cependant des protéines dites « hyperphosphorylées » particulièrement riches en acides aminés phosphorylables et qui possèdent naturellement un taux moyen de phosphorylation élevé. Ces protéines ont en particulier des propriétés de fixation des métaux (calcium, magnésium, fer...), comme l'ostéopontine du lait humain qui présente en moyenne 32 phosphorylations sur ses 36 sites possibles.

cellulaires sont phosphorylées (au moins de façon transitoire) afin de moduler des fonctions physiologiques spécifiques, et en considérant que l'interaction des groupements phosphate avec un métal lourd entraîne une détérioration directe de la fonction des protéines, l'étude de la complexation des An par ces groupements fonctionnels devient d'une grande importance (voir encadré). Récemment, plusieurs travaux de recherche ont été consacrés aux sites de complexation de protéines hyper-phosphorylées identifiées pour leur rôle possible dans les mécanismes associés à la toxicité des An, mais également comme modèles d'interaction entre les groupements phosphate et les An [26]. Dans une étude sur l'identification des protéines cibles de U(VI) au sein d'un organisme aquatique modèle (poisson zèbre, *Danio rerio*), les chercheurs ont pu souligner l'importance des phosphorylations dans la capacité des protéines à se lier au U(VI). Une autre étude a permis de mettre en évidence une diminution significative de la production de vitellogénine, l'une des protéines les plus phosphorylées du vivant, chez ce même organisme modèle, lors de l'exposition à U(VI) [27]. Des mesures de spectroscopie ont montré l'importance des groupements phosphate dans l'environnement proche de U(VI) complexé avec la phosvitine, un fragment de la vitellogénine, et très récemment l'interaction de la phosvitine avec U(VI) mais également avec Np(V) a été décrite par spectroscopie d'absorption X [28].

L'ostéopontine, une protéine hyperphosphorylée intrinsèquement désordonnée, est également une cible privilégiée de U(VI). Sécrétée par plusieurs organes, majoritairement les cellules osseuses et les reins, son rôle principal est lié au remodelage osseux. Le squelette étant l'un des organes cibles privilégiés pour l'ensemble des An quel que soit leur état d'oxydation, les propriétés de l'ostéopontine apparaissent

donc importantes dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la toxicité chimique des An dans l'os. L'interaction de l'ostéopontine avec U(VI) d'abord, puis avec Th(IV), a été décrite en détail. Dans le cas de U(VI), la présence des groupements phosphate dans la sphère de coordination de U(VI) est confirmée mais apparaît moins importante que dans le cas de Th(IV) qui intègre deux fois plus de ces groupements dans son environnement proche. Cette observation semble donc indiquer une affinité plus importante de Th(IV) – et plus largement des An(IV) – pour les groupements phosphate, en accord avec les études préliminaires qui portaient sur les taux de rétention des An dans le vivant, indiquant des taux d'accumulation des An(IV) pouvant atteindre 70 % au niveau de la matrice osseuse (taux de rétention de 70, 50 et 10-15 %, respectivement pour Th(IV), Pu(IV) et U(VI)). Il est à noter que dans les deux cas, le site de complexation de l'actinide apparaît différent de celui de Ca(II), qui n'implique que des fonctions carboxylate [29].

Une approche toxicologique à l'échelle cellulaire

Neurotoxicité de l'uranium, accumulation, impact et fractionnement isotopique

Au cours des dernières années, plusieurs études ont clairement souligné que le cerveau est une cible sensible pour la toxicité de l'uranium. Des modifications au niveau des neurotransmetteurs et de leurs métabolites impliqués dans les voies acétylcholine et dopaminergique ont été observées dans le cerveau des animaux après exposition à U(VI), mais les mécanismes ne sont pas entièrement connus. Des études visant à mieux comprendre ces effets au niveau cellulaire et moléculaire ont été conduites en exposant des cellules dopaminergiques humaines SH-SY5Y différenciées en neurones à des concentrations non toxiques et sub-toxiques de U(VI). Si l'accumulation intracytoplasmique de U est dépendante de sa concentration, l'homéostasie des éléments endogènes (Fe, Cu et Zn) est perturbée aux plus fortes concentrations seulement [30].

Par ailleurs, la mesure de la variation des rapports isotopiques de métaux dans les milieux biologiques par spectrométrie de masse peut apporter des informations sur leur complexation, les mécanismes réactionnels associés et sur leurs voies métaboliques. Ainsi, l'accumulation intracellulaire de U s'accompagne d'une incorporation préférentielle de ^{235}U par les cellules exposées à des concentrations non toxiques de U(VI), avec un fractionnement isotopique de 0,30-0,35 %, alors qu'aucun fractionnement isotopique significatif n'a été observé à plus fortes concentrations d'exposition [31]. Dans tous les cas, les signatures isotopiques du Cu et du Zn intracellulaires n'ont pas été modifiées. Ces résultats originaux, acquis par une méthodologie innovante, permettent de formuler l'hypothèse de deux voies d'incorporation de U(VI) : une voie spécifique via un transporteur protéique pour les faibles concentrations d'exposition, et une voie non spécifique telle que la diffusion aux concentrations supérieures.

Au niveau moléculaire, l'expression de gènes liés à la dopamine est modulée par U(VI), suggérant que l'inhibition du catabolisme de la dopamine, mais aussi celui d'autres substrats comme la monoamine oxydase B, pourraient constituer des effets sélectifs de la neurotoxicité de l'uranium. Enfin, des protéines intracellulaires liant U(VI) ont été identifiées par protéomique, mettant en évidence quatre voies métaboliques liées au système d'ubiquitination des protéines,

à la gluconéogenèse, à la glycolyse et aux protéines du cytosquelette de l'actine [32].

Mieux simuler la matrice osseuse

Tous les actinides, quel que soit leur degré d'oxydation, montrent une tendance forte à s'accumuler dans le squelette [33]. S'agit-il d'un processus naturel de défense de l'organisme, qui protège ainsi ses organes mous (foie, reins) plus sensibles, ou alors d'un processus chimique lié aux propriétés physico-chimiques caractéristiques de ces ions, ou finalement d'un processus biologique résultant d'une interférence avec les cellules osseuses ? L'os est en effet un organe bien plus complexe qu'il n'y paraît, hautement vascularisé et en perpétuel remodelage. La dynamique du tissu osseux dépend de l'activité de trois types cellulaires principaux : les ostéoblastes, en charge de la construction et de la minéralisation de la matrice extracellulaire, les ostéoclastes qui résorbent cette matrice osseuse, et les ostéocytes issus de la différenciation des ostéoblastes et qui contrôlent l'activité des deux autres types cellulaires.

L'interaction entre les An et les processus biologiques du remodelage osseux est donc extrêmement complexe à déchiffrer et nécessite la mise au point de modèles chimiques et biologiques, permettant d'appréhender chacune des facettes du problème.

D'un point de vue « chimie des matériaux », l'os est un matériau hybride, composé d'une matrice minérale à base de phosphate de calcium, l'hydroxyapatite carbonatée, non stœchiométrique et peu cristalline, et de protéines, principalement du collagène de type I. La communauté scientifique travaille énormément sur l'interaction entre ces deux composants, qui de manière générale explique la structure micro- et macroscopique de la plupart des organismes vivants. Ces résultats ont servi pour préparer, au laboratoire, des matériaux synthétiques mimés de l'os, afin d'étudier leur interaction avec les An, à commencer par U(VI). Ils présentent les mêmes caractéristiques physico-chimiques que la matrice osseuse et peuvent être préparés sous forme de poudre ou bien de lamelles, supports de culture cellulaire. Contrairement à ce qui était attendu, l'uranium ne s'accumulerait pas dans l'os simplement pour des raisons chimiques, en précipitant sous forme de phosphates ; il aurait plutôt un effet inhibiteur sur la minéralisation de l'apatite. Sa fixation serait donc gouvernée par un mécanisme de sorption, caractérisé par une réversibilité partielle. Une explication possible serait une évolution de la spéciation de U(VI), présent dans le plasma sanguin sous forme de complexes carbonato, puis dans le minéral sous forme de complexes phosphato, qui finiraient par diffuser et intégrer la matrice apatite.

Les modèles cellulaires osseux

Les échanges possibles de U(VI) entre la matrice osseuse et le milieu biologique impliquent plusieurs niveaux de complexité (figure 5). Au contact des ostéoblastes, U(VI) affecte la capacité de minéralisation, et ce même à des doses dépourvues de toxicité. Par ailleurs, il a été montré pour la première fois dans des cellules eucaryotes que U(VI) se trouve sous forme de méta-autunite (phosphate de U(VI)) après internalisation dans l'ostéoblaste. Il bloque l'autophagie, un processus de dégradation et recyclage du matériel cellulaire dans un but de survie, ce qui participe à sa toxicité [34].

Les ostéocytes, qui sont emmurés dans la matrice osseuse, possèdent une durée de vie de plusieurs années. Ce sont les

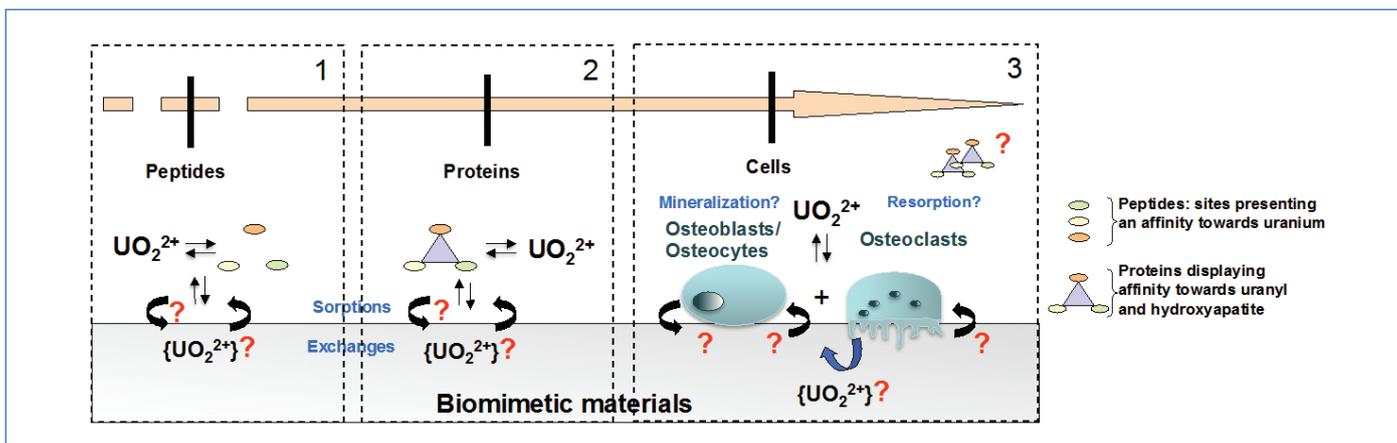


Figure 5 - Les échanges possibles de U(VI) entre la phase minérale osseuse et le milieu biologique aux niveaux moléculaire (1), biochimique (2) et cellulaire (3) [34].

cibles privilégiées lors d'une intoxication chronique à U(VI). Il est donc important de connaître l'effet d'une exposition chronique à de très faibles doses d'uranium lors du processus de minéralisation. Ces concentrations non toxiques affectent la minéralisation de lignées pré-ostéocytaires MLO-A5 dès 2 μM , la quantité de calcium diminuant au profit de U(VI). Par ailleurs, ces faibles concentrations affectent l'expression de certains gènes, suggérant une altération du processus de différenciation [35].

Les ostéoclastes sont de larges cellules multinucléées formées par la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique. Une exposition à 5 μM de U(VI) dans le milieu de culture est suffisante pour inhiber la formation ainsi que la fonction de résorption des ostéoclastes *in vitro*. La diminution des cellules précurseurs disponibles ainsi que la viabilité réduite des ostéoclastes matures semblent expliquer ces effets de U(VI). Concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu, une exposition à U(VI) induit une accumulation dose-dépendante de la protéine SQSTM1/p62 pendant la formation des ostéoclastes. SQSTM1/p62 étant un régulateur de la différenciation ostéoclastique, ces résultats suggèrent que son accumulation pourrait contribuer aux effets de U(VI) sur l'ostéoclastogénèse [36].

Les avancées dans les outils de décontamination

En cas de contamination accidentelle interne, la biodistribution des contaminants dépend de la nature du composé, de sa forme physico-chimique et de la voie d'entrée dans l'organisme. Un composé soluble en milieu physiologique quittera rapidement le site de contamination pour rejoindre le compartiment systémique d'où il sera éliminé dans les urines et/ou retenu dans les organes présentant une affinité pour ce composé. L'approche thérapeutique proposée, appelée décontamination, vise à diminuer la rétention du contaminant et/ou augmenter son excrétion par voie naturelle et utilise des ligands spécifiques des An. Il est admis que l'administration du décontaminant doit se faire le plus tôt possible après contamination, lorsque le contaminant est encore accessible. En effet, une fois internalisé dans des cellules ou fixé à des ligands biologiques, l'accessibilité du contaminant aux agents décontaminants diminue fortement. Deux objectifs peuvent être recherchés par l'utilisation d'un traitement décontaminant : une action au niveau du site de contamination pour éviter le transfert vers le compartiment systémique, ou une action au niveau systémique afin de

limiter la rétention au niveau des organes montrant une affinité pour le contaminant.

Depuis plus de soixante ans, le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) est utilisé comme traitement décontaminant de Pu(IV) et de Am(III). La forme galénique du DTPA disponible en France depuis 2008 (Pharmacie centrale des armées) est une solution injectable de Ca-DTPA. Toutefois, l'efficacité du DTPA demeure limitée, notamment après contamination par des formes peu solubles d'An. Par ailleurs, le DTPA demeure inefficace pour la décontamination de U(VI). Différentes pistes d'amélioration des décontaminants ont été explorées ou sont en cours. Elles visent à cibler les compartiments de rétention des An – par exemple les cellules du système réticulo-endoplasmique telles que les macrophages – et à augmenter le temps de résidence du décontaminant au niveau local.

Pour ce faire, deux approches complémentaires sont envisagées : améliorer l'efficacité de molécules existantes, comme le DTPA, par des modifications de protocoles d'administration, et/ou utiliser de nouvelles formes galéniques et rechercher de nouvelles molécules décontaminantes.

Le DTPA et ses nouvelles formulations

Des formulations telles que le Ca-DTPA en aérosols de poudre sèche, destinées à l'administration pulmonaire, ont été testées mais celles-ci n'ont révélé une réelle efficacité que sur les formes solubles de Pu déposées dans les poumons. Sur un modèle expérimental de rongeur, la nébulisation de la forme commercialisée a montré une efficacité non seulement sur le dépôt pulmonaire de Pu, mais également sur les dépôts systémiques et plus particulièrement hépatiques et squelettiques [37]. Pour compenser la courte demi-vie biologique du DTPA, des administrations répétées ont été réalisées, entraînant un gain d'efficacité, que ce soit après administration intraveineuse ou pulmonaire. Certaines formes lipophiles de DTPA, ayant des chaînes latérales alkyles de longueurs variables, ont été testées pour leur capacité de pénétration cellulaire accrue. Une autre formulation avancée est le NanoDTPA[®], une forme encapsulée du DTPA avec de l'acétate de zinc et d'autres activateurs, qui démontre une biodisponibilité orale similaire à celle du DTPA administré par voie intraveineuse chez les chiens pour la décontamination de Am-241. Enfin, des formes liposomales de DTPA ont été développées depuis le début des années 1970. L'utilisation de liposomes unilamellaires encapsulant le DTPA ont permis de décontaminer les organes systémiques après contamination par du Pu. L'inhibition des deux

tiers de la rétention hépatique suggère un accès aux cellules du système réticulo-endothélial du foie. Néanmoins, la voie d'administration intraveineuse entrave encore leur utilisation en tant que véritables candidats à une utilisation pratique.

Quelles sont les autres options ?

Récemment, une approche macromoléculaire a été développée pour la décontamination des An avec des analogues polymères du DTPA [38]. Le PEI-MC (polyéthylène imine-méthylcarboxylate) et le PEI-MP (polyéthylène imine-méthylphosphonate) basés sur un PEI branché commercial de 25 kDa ont clairement démontré leurs capacités à séquestrer à la fois U(VI) et les An(IV) (Pu et Th comme modèle de travail du Pu). Un polymère entièrement fonctionnalisé représente environ 194 analogues de DTPA mais les modes de complexation sont légèrement différents par effet de la chaîne polymère. L'avantage d'un polymère décorporant réside dans le ciblage indirect potentiel des compartiments de rétention biologique des actinides.

On peut également citer des analogues de sidérophores portant différentes sous-unités chélatantes telles que les catécholates (CAM), les hydroxamates, les hydroxypyridonates (HOPO). Le composé de la famille CAM le plus étudié est le 3,4,3-LI-CAM-C. Le préfixe 3,4,3 représente le nombre de méthylènes entre les atomes d'azote du squelette, LI représente une structure « linéaire » et le suffixe (C) indique une carboxylation de la sous-unité chélatante finale. Cette molécule a montré *in vitro* une excellente efficacité pour certaines formes de Pu(IV) et une affinité beaucoup plus élevée que le DTPA [39]. Cependant, les effets secondaires au niveau des reins, dus à la dissociation des complexes d'actinide et donc à la rétention rénale de l'activité, ont limité son développement clinique ultérieur. Dans la famille HOPO, les composés les plus actifs sont le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO). Le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) limite le dépôt osseux de Pu(IV), mais aussi de U(VI) dans les reins et le fémur des rongeurs après une injection intramusculaire.

De nouveaux outils pour de nouvelles perspectives

Les actinides sont présents sur Terre pour une période qui dépasse de plusieurs ordres de grandeur le cycle de vie d'un être humain. Leur toxicologie est donc une question sociétale, même en l'absence d'événements nucléaires accidentels. Depuis 1943, beaucoup a été entrepris pour comprendre les mécanismes biochimiques de transfert des An dans le vivant et pour le design de décorporants efficaces et ciblés. Mais beaucoup reste à faire pour élucider les mécanismes responsables de la toxicité de ces éléments non essentiels dont la spéciation en milieu biologique est complexe. De nouveaux outils spectroscopiques, d'imagerie – avec notamment l'utilisation du rayonnement synchrotron ou des faisceaux de particules – ou de modélisation sont venus compléter l'outillage des chercheurs. Grâce à ces nouveaux outils de la chimie biomimétique conduisant à l'élaboration de modèles simplifiés des biomolécules cibles, de la biologie cellulaire et de la biochimie structurale, et grâce à la combinaison des données de spectroscopie avec les outils de la modélisation, le rôle des actinides dans les processus biochimiques a pu être mieux perçu. Les mécanismes de complexation, l'influence de la forme physico-chimique sur l'affinité, les conséquences sur la fonction des protéines/enzymes ont été décrits pour certaines cibles, mais c'est en favorisant la synergie entre les techniques

que notre compréhension de la chimie « bioactinique » sera renforcée. Dans un autre domaine, cette compréhension pourrait d'ailleurs ouvrir les perspectives de la thérapie α , qui s'inscrit dans les mêmes besoins de compréhension des mécanismes biochimiques de transfert.

Les auteurs remercient le programme de Toxicologie nucléaire du CEA qui a contribué depuis les années 2000 à financer et fédérer la recherche dans ce domaine en France.

* Annexe téléchargeable librement sur le site www.lactualitechimique.org à partir de la page liée à cet article. La liste détaillée des références (avec leurs titres) est incluse dans l'annexe.

- [1] *Toxicologie nucléaire, environnementale et humaine*, M.-T. Ménager, J. Garnier Laplace, M. Goyffon (coord.), Lavoisier, **2009**.
- [2] P.E. Morrow *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **2000**, *53*, p. 157-58.
- [3] T. Albrecht-Schmitt, Actinides in animals and man, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, N. Edelstein, J.J. Katz, J. Fuger, L.R. Mors (eds), Springer, 4th ed., **2011**.
- [4] E. Ansoborlo *et al.*, *Biochimie*, **2006**, *88*, p. 1605-18.
- [5] J. Rothe *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, p. 4708-18.
- [6] C. Madic *et al.*, *Inorg. Chem.*, **1983**, *22*, p. 1494-503.
- [7] D.L. Clark *et al.*, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, p. 25-48.
- [8] J. Aupiais *et al.*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2020**, *2*, p. 216-25.
- [9] O.S. Pokrovsky, G.R. Choppin, *Radiochim. Acta*, **1997**, *79*, p. 167-71.
- [10] L. Mullen *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2007**, *273*, p. 683-88.
- [11] S. Grison *et al.*, *Int. J. Rad. Biol.*, **2019**, *95*, p. 737-52.
- [12] A. Garai, P. Delangle, *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *203*, 110936.
- [13] H.M. Baker *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, *5*, p. 692-98.
- [14] M. Sarthou *et al.*, *Metallomics*, **2020**, *12*, p. 1302-13.
- [15] J.R. Duffield *et al.*, *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **1986**, *12*, p. 483-87.
- [16] C. Basset *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, *26*, p. 645-53.
- [17] A. Jeanson *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, p. 1378-87.
- [18] F. Brulfert, J. Aupiais, *Dalton Trans.*, **2018**, *47*, p. 9994-10001.
- [19] M.P. Jensen *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, **2011**, *7*, p. 560-65.
- [20] T.N.S. Huynh *et al.*, *Electrophoresis*, **2015**, *36*, p. 1374-82.
- [21] B.P. Aryal *et al.*, *J. Proteomics*, **2012**, *75*, p. 1505-14.
- [22] A. Dedieu *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, p. 5365-76.
- [23] S. Sauge-Merle *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, p. 15505-17.
- [24] F. Brulfert *et al.*, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *172*, p. 46-54.
- [25] S. Sauge-Merle *et al.*, *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, p. 1389-96.
- [26] G. Creff *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, p. 29-36.
- [27] L. Qi *et al.*, *Metallomics*, **2014**, *6*, p. 166-76.
- [28] S. Kumar *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, p. 12332-41.
- [29] E. Klänning *et al.*, *Bone*, **2014**, *66*, p. 90-95.
- [30] E. Paredes *et al.*, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, p. 17163-73.
- [31] E. Paredes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, *113*, p. 14007-12.
- [32] C. Vidaud *et al.*, *Arch Toxicol.*, **2019**, *93*, p. 2141-54.
- [33] C. Vidaud *et al.*, *Chem. Res. Tox.*, **2012**, *25*, p. 1161-75.
- [34] V. Pierrefite-Carle *et al.*, *Arch. Toxicol.*, **2017**, *91*, p. 1903-14.
- [35] L. Hurault *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **2019**, *170*, p. 199-209.
- [36] T. Gritsaenko *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **2017**, *1861*, p. 715-26.
- [37] L. Miccoli *et al.*, *Radiat. Res.*, **2019**, *192*, p. 630-39.
- [38] F. Lahrouch *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*, p. 128-37.
- [39] J.R. Duffield *et al.*, *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **1986**, *12*, p. 483-87.

C. ALBAN, J. AUPIAIS, M.R. BECCIA, C. BERTHOMIEU, D. BOURGEOIS, J. BOURGUIGNON, C. BRESSON, G.F. CARLE, V. CHAPON, G. CREFF, P. DELANGLE, C. DEN AUWER (auteur correspondant*), C. DI GIORGIO, T. DUMAS, P. GUILBAUD, A. HAGÈGE, V. MALARD, P. MOISY, E. PAREDES, V. PIERREFITE-CARLE, S. RAVANEL, S. SANTUCCI-DARMANIN, S. SAUGE-MERLE, B. SIBERCHICOT, P.L. SOLARI, A. VANDER MEEREN et C. VIDAUD.

La liste détaillée des autrices et auteurs est donnée dans l'annexe*.

*Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, 06108 Nice, France.

Courriel : christophe.denauger@univ-cotedazur.fr

Compléments à l'article « Les actinides, leur interaction avec les processus biologiques : où en sommes-nous? », C. Den Auwer *et coll.* (*L'Act. Chim.*, 2021, 460-461, p. 68)

Liste des autrices et auteurs de l'article

Claude ALBAN¹, Jean AUPIAIS², Maria Rosa BECCIA³, Catherine BERTHOMIEU⁴, Damien BOURGEOIS⁵, Jacques BOURGUIGNON¹, Carole BRESSON⁶, Georges F. CARLE⁷, Virginie CHAPON⁴, Gaëlle CREFF³, Pascale DELANGLE⁸, Christophe DEN AUWER^{*3}, Christophe DI GIORGIO³, Thomas DUMAS⁹, Philippe GUILBAUD⁹, Agnès HAGÈGE¹⁰, Véronique MALARD⁴, Philippe MOISY⁹, Eduardo PAREDES⁶, Valérie PIERREFITE-CARLE⁷, Stéphane RAVANEL¹, Sabine SANTUCCI-DARMANIN⁷, Sandrine SAUGE-MERLE⁴, Bruno SIBERCHICOT², Pier Lorenzo SOLARI¹¹, Anne VANDER MEEREN¹² et Claude VIDAUD¹³.



* christophe.denauger@univ-cotedazur.fr

1 Université Grenoble Alpes, CEA, INRA, CNRS, IRIG, PCV, 38000, Grenoble.

2 CEA, DAM, DIF, 91297 Arpajon, France.

3 Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, 06108 Nice, France.

4 Aix-Marseille Université, CEA, CNRS, BIAM, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille, CEA-Cadarache, 13108 Saint Paul-lez-Durance, France.

5 ICSM, CNRS, CEA, 30207 Bagnols-sur-Cèze, France.

6 DES, Service d'Études Analytiques et de Réactivité des Surfaces SEARS, CEA, Université Paris-Saclay, 91191, Gif-sur-Yvette, France.

7 Université Côte d'Azur, CEA, Institut Joliot, TIRO-MATOS, 06107 Nice, France.

8 Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, 38000 Grenoble, France.

9 CEA, DES, ISEC, DMRC, Université de Montpellier, 30207 Marcoule, France.

10 Université de Lyon, CNRS, Université Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, 69100 Villeurbanne, France.

11 Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif-sur-Yvette, France.

12 CEA LRT, Université Paris-Saclay, 91297 Arpajon, France

13 BIAM, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille, CEA-Marcoule, 30207 Bagnols-sur-Cèze, France.

Références

[1] *Toxicologie nucléaire, environnementale et humaine*, M.-T. Ménager, J. Garnier Laplace, M. Goyffon (coord.), Lavoisier, 2009.

[2] P.E. Morrow, H. Witschi, M. Vore, P.E. Hakkinen, J. Mac Gregor, M.W. Anders, C. Willhite, Harold Carpenter Hodge (1904-1990), *Toxicol. Sci.*, 2000, 53, p. 157-58.

[3] T. Albrecht-Schmitt, Actinides in animals and man, in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, N. Edelstein, J.J. Katz, J. Fuger, L.R. Mors (eds), Springer, 4th ed., 2011.

[4] E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercoüter, C. Moulin, V. Moulin, Actinide speciation in relation to biological processes, *Biochimie*, 2006, 88, p. 1605-18.

[5] J. Rothe, C. Walther, M.A. Denecke, T. Fanghänel, XAFS and LIBD investigation of the formation and structure of colloidal Pu(IV) hydrolysis products, *Inorg. Chem.*, 2004, 43, p. 4708-18.

[6] C. Madić, D.E. Hobart, G.M. Begun, Raman spectrometric studies of actinide(V) and -(VI) complexes in aqueous sodium carbonate solution and of solid sodium actinide(V) carbonate compounds, *Inorg. Chem.*, 1983, 22, p. 1494-503.

[7] D.L. Clark, D.E. Hobart, M.P. Neu, Actinide carbonate complexes and their importance in actinide environmental chemistry, *Chem. Rev.*, 1995, 95, p. 25-48.

[8] J. Aupiais, J.-C. Alexandre, R. Sicre, B. Siberchicot, S. Topin, P. Moisy, N. Dacheux, The Np^V and Pu^V carbonate systems: thermodynamics and coordination chemistry, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2020, 2, p. 216-25.

- [9] O.S. Pokrovsky, G.R. Choppin, Neptunium(V) complexation by acetate, oxalate and citrate, *Radiochim. Acta*, **1997**, *79*, p. 167-71.
- [10] L. Mullen, C. Gong, K. Czerwinski, Complexation of uranium(VI) with the siderophore desferrioxamine B, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2007**, *273*, p. 683-88.
- [11] S. Grison, D. Kereselidze, D. Cohen, C. Gloaguen, C. Elie, P. Lestaevl, A. Legendre, L. Manens, B. Habchi, M. Amine Benadjaoud, G. Tarlet, F. Milliat, J.-C. Martin, J.-M. Lobaccaro, M. Souidi, Applying a multiscale systems biology approach to study the effect of chronic low-dose exposure to uranium in rat kidneys, *Int. J. Rad. Biol.*, **2019**, *95*, p. 737-52.
- [12] A. Garai, P. Delangle, Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptide, *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *203*, 110936.
- [13] H.M. Baker, C.J. Baker, C.A. Smith, E.N. Baker, Metal substitution in transferrins: specific binding of cerium(IV) revealed by the crystal structure of cerium-substituted human lactoferrin, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, *5*, p. 692-98.
- [14] M. Sarthou, B. Revel, F. Villiers, C. Alban, T. Bonnot, O. Gigarel, A.-M. Boisson, S. Ravanel, J. Bourguignon, Development of a metalloproteomic approach to analyse the response of *Arabidopsis* cells to uranium stress, *Metallomics*, **2020**, *12*, p. 1302-13.
- [15] J.R. Duffield, D.M. Taylor, S.A. Proctor, The binding of plutonium to transferrin in the presence of tri-n-butyl phosphate or nitrate and its release by diethylenetriamine penta-acetate and the tetrameric catecholamide ligand LICAMC(C), *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **1986**, *12*, p. 483-87.
- [16] C. Basset, O. Averseng, P.-J. Ferron, N. Richaud, A. Hagège, O. Pible, C. Vidaud, Revision of the biodistribution of uranyl in serum: is fetuin-A the major protein target?, *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, *26*, p. 645-53.
- [17] A. Jeanson, M. Ferrand, H. Funke, C. Henning, P. Moisy, P.-L. Solari, C. Vidaud, C. Den Auwer, Role of transferrin in actinide(IV) uptake: comparison with iron(III), *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, p. 1378-87.
- [18] F. Brulfert, J. Aupiais, Topological speciation of actinide-transferrin complexes by capillary isoelectric focusing coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry: evidence of the non-closure of the lobes, *Dalton Trans.*, **2018**, *47*, p. 9994-10001.
- [19] M.P. Jensen, D. Gormen-Lewis, B. Aryal, T. Paunesku, S. Vogt, P.G. Rickert, S. Seifert, B. Lai, G.E. Woloschak, L. Soderholm, An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium, *Nature Chem. Biol.*, **2011**, *7*, p. 560-65.
- [20] T.N.S. Huynh, D. Bourgeois, C. Basset, C. Vidaud, A. Hagège, Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions, *Electrophoresis*, **2015**, *36*, p. 1374-82.
- [21] B.P. Aryal, T. Paunesku, G.E. Woloschak, C. He, M.P. Jensen, A proteomic approach to identification of plutonium-binding proteins in mammalian cells, *J. Proteomics*, **2012**, *75*, p. 1505-14.
- [22] A. Dedieu, F. Berenguer, C. Basset, O. Prat, E. Quemeneur, O. Pible, C. Vidaud, Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, p. 5365-76.
- [23] S. Sauge-Merle, F. Brulfert, R. Pardoux, P.L. Solari, D. Lemaire, S. Safi, P. Guilbaud, E. Simoni, M.L. Merroun, C. Berthomieu, Structural analysis of uranyl complexation by the EF-hand motif of calmodulin: effect of phosphorylation, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, p. 15505-17.
- [24] F. Brulfert, S. Safi, A. Jeanson, H. Foerstendorf, S. Weiss, C. Berthomieu, S. Sauge-Merle, E. Simoni, Enzymatic activity of the CaM-PDE1 system upon addition of actinyl ions, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *172*, p. 46-54.
- [25] S. Sauge-Merle, D. Lemaire, R.W. Evans, C. Berthomieu, J. Aupiais, Revisiting binding of plutonium to transferrin by CE-ICP-MS, *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, p. 1389-96.
- [26] G. Creff, S. Safi, J. Roques, H. Michel, A. Jeanson, P.L. Solari, C. Basset, E. Simoni, C. Vidaud, C. Den Auwer, Actinide(IV) deposits on bone: potential role of the osteopontin-thorium complex, *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, p. 29-36.
- [27] L. Qi, C. Basset, O. Averseng, E. Quemeneur, A. Hagège, C. Vidaud, Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones, *Metallomics*, **2014**, *6*, p. 166-76.
- [28] S. Kumar, G. Creff, C. Hennig, A. Rossberg, R. Steudtner, J. Raff, C. Vidaud, F.R. Oberhaensli, M.-Y. Dechraoui Bottein, C. Den Auwer, How do actinyls interact with hyperphosphorylated yolk protein phosphovitin?, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, p. 12332-41.
- [29] E. Klänning, B. Christensen, E. Sørensen, T. Vorup-Jensen, J.K. Jensen, Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status, *Bone*, **2014**, *66*, p. 90-95.
- [30] E. Paredes, E. Avazeri, V. Malard, C. Vidaud, P.E. Reiller, R. Ortega, A. Nonell, H. Isnard, F. Chartier, C. Bresson, Impact of uranium uptake on isotopic fractionation and endogenous element homeostasis in human neuron-like cells, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, p. 17163-73.
- [31] E. Paredes, E. Avazeri, V. Malard, C. Vidaud, P.E. Reiller, R. Ortega, A. Nonell, H. Isnard, F. Chartier, C. Bresson, Evidence of isotopic fractionation of natural uranium in cultured human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, *113*, p. 14007-12.
- [32] C. Vidaud, M. Robert, E. Paredes, R. Ortega, E. Avazeri, L. Jing, J.-M. Guigonis, C. Bresson, V. Malard, Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells, *Arch. Toxicol.*, **2019**, *93*, p. 2141-54.
- [33] C. Vidaud, D. Bourgeois, D. Meyer, Bone as target organ for metals: the case of f-elements, *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, *25*, p. 1161-75.
- [34] V. Pierrefite-Carle, S. Santucci-Darmanin, V. Breuil, T. Gritsaenko, C. Vidaud, G. Creff, P.L. Solari, S. Pagnotta, R. Al-Sahlane, C. Den Auwer, G.F. Carle, Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity, *Arch. Toxicol.*, **2017**, *91*, p. 1903-14.
- [35] L. Hurault, G. Creff, A. Hagège, S. Santucci-Darmanin, S. Pagnotta, D. Farlay, C. Den Auwer, V. Pierrefite-Carle, G.F. Carle, Uranium effect on osteocytic cells in vitro, *Toxicol. Sci.*, **2019**, *170*, p. 199-209.
- [36] T. Gritsaenko, V. Pierrefite-Carle, T. Lorivel, V. Breuil, G.F. Carle, S. Santucci-Darmanin, Natural uranium impairs the differentiation and the resorbing function of osteoclasts, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **2017**, *1861*, p. 715-26.
- [37] L. Miccoli, F. Ménétrier, P. Laroche, O. Grémy, Chelation treatment by early inhalation of liquid aerosol DTPA for removing plutonium after rat lung contamination, *Radiat. Res.*, **2019**, *192*, p. 630-39.
- [38] F. Lahrouch, B. Siberchicot, J. Fèvre, L. Leost, J. Aupiais, P.L. Solari, C. Den Auwer, C. Di Giorgio, Carboxylate- and phosphonate-modified polyethylenimine: toward the design of actinide decorporation agents, *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*, p. 128-37.
- [39] J.R. Duffield, D.M. Taylor, S.A. Proctor, The binding of plutonium to transferrin in the presence of tri-n-butyl phosphate or nitrate and its release by diethylenetriaminepenta-acetate and the tetrameric catecholamide ligand LICAMC(C), *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **1986**, *12*, p. 483-87.