

Approche chimique de la sélectivité en radiotoxicologie

L'exemple de l'interaction protéine-uranium

Éric Quéméneur

Complément de la conférence donnée lors des 27^e JIREC (24-27 mai 2011, Orsay).

Résumé	Les interactions moléculaires conditionnent la distribution et le mécanisme d'action des radionucléides, expliquant une grande partie de leurs effets toxicologiques en plus de leurs propriétés ionisantes. L'étude des interactions de l'uranyle avec une grande diversité de protéines montrent une physico-chimie particulièrement riche dont il faudra intégrer la complexité dans la construction des modèles biocinétiques ou la conception de molécules décorporantes.
Mots-clés	Uranyle, interaction moléculaire, affinité, toxicocinétique, relation structure/activité, MIEC-JIREC 2011.
Abstract	Chemical approach of selectivity in radiotoxicology: the protein-uranium interaction as an example Molecular interactions control the distribution of radionuclides and their mechanisms of action. They explain most of their toxicological properties in addition to ionizing properties. The study of uranyl interactions with a large variety of proteins displays a rich physicochemistry of which the complexity has to be considered when elaborating biokinetic models or when designing novel decorporating molecules.
Keywords	Uranyl, molecular target, affinity, toxicokinetics, structure-activity relationship, MIEC-JIREC 2011.

L' accident survenu à la centrale de Fukushima Dai'ichi en mars 2011 est venu cruellement nous rappeler l'importance de la préparation aux crises, même les plus imprévisibles. À l'instar d'Aristote, qui conseillait au tragédien de « *préférer les impossibilités vraisemblables aux possibilités improbables* », les spécialistes du nucléaire doivent désormais intégrer une palette de scénarios élargie dans leur approche des risques. Une grande partie de la réponse à court terme se trouvera certes dans l'amélioration des standards et pratiques en sûreté/sécurité [1], mais les enjeux resteront également forts pour les spécialités connexes comme la toxicologie. L'interaction renforcée avec les chimistes permettra de progresser dans la caractérisation des interactions entre radionucléides et biomolécules, éléments essentiels de l'innovation en diagnostic ou en thérapeutique.

L'apport de la chimie en toxicologie

Alors que l'approche générique se restreint à l'analyse des causes et des conséquences, l'incorporation d'informations chimiques dans les modèles d'évaluation du risque, comme l'étude des mécanismes d'action ou la modélisation biocinétique basée sur la physiologie, les rendent plus spécifiques et plus prédictifs [2]. Schématiquement, le parcours d'un composé toxique dans un système biologique passe par une phase toxicocinétique (TK), où se déterminent la fraction et la dose qui joueront un rôle biologique, puis par une phase toxicodynamique (TD), où se manifestent les effets biologiques proprement dits (figure 1). Au cours de ce transport dans un milieu intracellulaire sur-encombré [3], diverses interactions et équilibres vont se produire avec des biomolécules « cibles ».

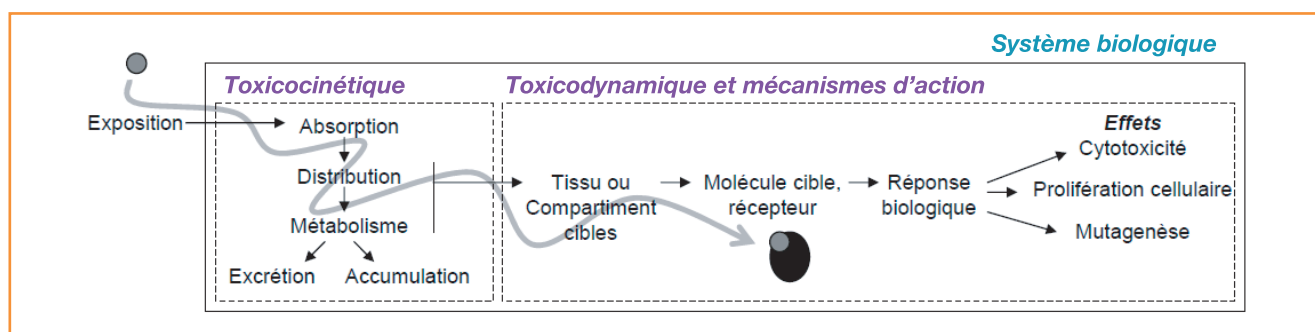


Figure 1 - Rôle central des protéines cibles dans le parcours biologique d'un composé toxique.

Le schéma rappelle les phases toxicocinétique et toxicodynamique dites TK et TD. L'interaction physique avec sa cible moléculaire est le déterminant principal de la réponse biologique consécutive à l'atteinte de l'organe cible.

Les identifier et les caractériser sera le principal objectif du biochimiste car elles conditionnent le type, la vitesse et l'intensité des réponses induites par le composé toxique. C'est à ce prix que l'on pourra ensuite construire un mécanisme fiable et prédictif.

La toxicologie nucléaire considère essentiellement des ions métalliques. À la différence des cations essentiels ($\text{Fe}^{2+/3+}$, Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ...) dont la biocoordination est très étudiée, celle des métaux non essentiels (on évitera l'emploi du terme inapproprié de « métaux lourds » [4]) mériterait de l'être plus car elle ne répond pas toujours aux règles simples de l'analogie chimique. C'est notamment le cas pour l'uranium ; sa spéciation riche et complexe ou ses propriétés à longue portée en font un ion encore difficile à comprendre sur le plan toxicologique.

La toxicologie de l'uranium

Cet élément métallique est naturellement assez abondant sur la Terre : 2 à 3 g/t dans la croûte terrestre et $\sim 3 \text{ mg/m}^3$ dans l'eau de mer. Les sites uranifères ont été exploités dès le début du XIX^e siècle, d'abord pour extraire le radium à partir de la pechblende (UO_2), puis l'uranium lui-même car ses multiples propriétés ont intéressé l'industrie : pigment jaune-orangé pour la céramique ou la faïence, composé fluorescent pour la verrerie ou les cadrans de montres, blindage de char ou agent de lest pour l'aéronautique (densité de $18,9 \text{ g/cm}^3$) et, finalement, émetteur alpha dans les combustibles ou les armes nucléaires. Hormis les régions présentant naturellement une teneur très élevée (e.g. région de Rompas en Finlande ou Athabasca au Canada), la principale source d'uranium dans l'environnement est liée à l'utilisation d'engrais car il accompagne les phosphates. Le contenu moyen du corps humain en conditions normales est d'environ 90 μg . L'apport journalier en uranium est estimé à 0,9-1,5 μg par ingestion et 0,001-0,01 μg par inhalation. Cet apport peut être multiplié par cinq dans les situations naturelles exceptionnelles mentionnées précédemment et par cent lors d'une contamination accidentelle.

L'uranium existe sous plusieurs formes chimiques et isotopiques qui conditionnent fortement son comportement *in vivo*. On peut simplifier en le considérant principalement comme un toxique chimique, notamment par l'aptitude de l'uranium U(IV) et U(VI) à interférer avec plusieurs mécanismes biochimiques. Le spectre isotopique de l'uranium naturel (99,3 % d' ^{238}U et 0,7 % d' ^{235}U) lui confère une radioactivité spécifique modérée ($\sim 25 \text{ kBq/g}$). Seul l'enrichissement en ^{235}U dans les processus de préparation de combustible civil (3,5 %) ou de matériau d'arme (97,3 %) accroît sa radiotoxicité à des niveaux respectivement égaux à 81,5 et 1 850 kBq/g , ce qui peut faire craindre un risque radiologique. Nous n'approfondirons pas ici les effets toxicologiques de l'uranium, mais le lecteur intéressé pourra se référer à plusieurs revues récentes [5-7].

Nous insisterons ici principalement sur l'oxocation uranyle (UO_2^{2+}), l'espèce majeure en solution dont la solubilité favorise sa diffusion et ses interactions au sein des systèmes biologiques. La CIPR (Commission internationale de protection contre les rayonnements) a établi un modèle consensuel de distribution des actinides après ingestion [8]. Il prévoit que les actinides comme le Th(IV), le Pu(IV) ou l'Am(III) se lieraient en quasi-totalité à la transferrine, la protéine de transport du fer dans le sérum, en raison de leurs analogies avec le Fe(III). La situation est plus complexe pour

l'uranyle qui présente une distribution sérique plus variée : 50 % sous forme de carbonates, principalement $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]^{4-}$ ($\log K \sim 4,3$), 20 % en interaction avec les globules rouges ($\log K \sim 9$), et 30 % en liaison avec les protéines, dont la transferrine ($\log K \sim 16$) ou l'albumine ($\log K \sim 10-11$) [9-10]. Le complexe $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2]^{2-}$ a également une certaine propension à l'interaction avec les peptides, les protéines ($\log K \sim 3,1$) ou les acides nucléiques ($\log K \sim 9,7$). Ce manque de spécificité apparente n'est pas sans rappeler que l'on a longtemps utilisé l'uranyle comme agent de contraste en microscopie électronique ou pour le phasage en cristallographie. Grâce à cette dernière propriété, on dispose d'ailleurs de nombreuses structures protéiques contenant de l'uranium dans la *Protein Data Bank* (PDB). L'analyse statistique des géométries de coordination témoigne d'une grande diversité dans les modalités de l'interaction protéine-uranium [10-11].

À la quête des règles de la spécificité de l'interaction protéine-uranium

Diverses molécules comme les acides nucléiques ou des hétérocycles ont de l'affinité pour l'uranyle et ont déjà montré leurs potentiels en biodétection [12]. Néanmoins, ce sont les protéines qui concentrent l'attention car elles jouent un rôle majeur dans la distribution et la rétention *in vivo*. C'est donc à leur niveau qu'il faut agir pour prévenir les conséquences d'une contamination interne, cette action devant être la plus spécifique possible.

L'uranyle peut-il occuper un site protéique conçu pour un autre cation ?

La liaison de l'uranyle à la transferrine (TF) a été évoquée précédemment. Par une large palette de méthodes physico-chimiques, nous avons pu montrer que la liaison se situe au niveau du site Fe(III) [13]. Néanmoins, la structure du complexe formé diffère de celle de l'holo-TF (la forme liée au fer) ; elle semble plutôt analogue à celle de l'apo-TF (la forme démétaillée) (figure 2).

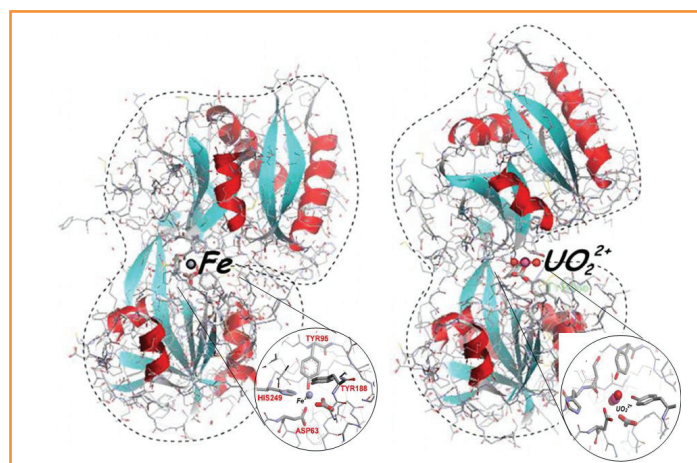


Figure 2 - Comparaison entre le complexe TF-Fe(III), lobe N, fichier PDB 1A8E, et un modèle sous contrainte expérimentale de l'interaction avec UO_2^{2+} .

De minimes différences locales de coordination ont d'importantes conséquences globales qui peuvent expliquer une perte relative de fonction [13].

L'uranyle se lie également à la sérualbumine (hSA), une protéine connue pour se lier à une grande variété de cations. Montavon *et coll.* proposent la liaison au niveau d'un site Ca(II), impliquant comme pour la TF un ion carbonate

additionnel pour former un complexe ternaire $\text{hSA-UO}_2^{2+}\text{-CO}_3^{2-}$ [14].

Un criblage informatique s'appuyant sur la structure des complexes protéine-uranium a identifié la CRP, la « C-reactive protein », comme ligand potentiel de l'uranyle [15]. Nous avons observé qu'il se lie au site du Ca(II) et, comme celui-ci, requiert la présence d'un groupe phosphate dans le site actif. L'interaction entre uranyle et phosphate est aussi responsable de la liaison spécifique à l' α -caséine [16].

Un éclairage nouveau sur la liaison dans les sites métalliques a été apporté par l'ingénierie des protéines. Il est possible de convertir le site Ni(II) de la protéine NikR d'*E. coli* en un site liant l'uranyle avec une haute affinité (K_d 53 nM) par seulement trois mutations au niveau du plan équatorial [17].

Ainsi l'uranyle peut s'adapter à un grand nombre de sites, pourvu qu'il y trouve des ligands de coordination équatoriale positionnés de façon adéquate. Le processus semble plus permissif quant aux contraintes stériques et électrostatiques.

Les anticorps monoclonaux sont des outils classiques pour explorer les déterminants structuraux et énergétiques d'une interaction moléculaire spécifique. Notre équipe et celle de Diane Blake à l'Université Tulane (Nouvelle Orléans, États-Unis) ont, toutes deux, produit des anticorps de haute affinité pour l'uranyle sous forme chélatée [18-19]. L'analyse des profils de liaison et des modèles structuraux de liaison montre bien qu'une liaison forte et spécifique est possible sans que tous les ligands équatoriaux de l'uranyle soient engagés dans l'interaction avec la protéine [20-21].

Le criblage à plus grande échelle, par deux stratégies chromatographiques et dans deux systèmes biologiques distincts, a permis d'identifier un grand nombre de protéines capables de lier l'uranyle [22-23]. Les contrôles par compétition avec d'autres cations et les mesures des énergies d'interaction confirment toutefois que ces liaisons impliquent des sites bien définis sur le plan structural.

De la coordination biologique à la toxicologie et à la thérapeutique ?

Les informations structurales et énergétiques dont nous disposons sur l'interaction de l'uranyle avec ses cibles permettent-elles de comprendre sa biodistribution et de concevoir des molécules prévenant son accumulation ?

Pour que deux molécules puissent établir une forte interaction entre elles, elles doivent se rencontrer et développer une complémentarité géométrique et électronique adéquates. L'analyse d'une dizaine de complexes protéine-uranyle de la PDB a permis de calculer les distances et la géométrie de coordination (figure 3). Les sites de liaison sont les plus fréquemment localisés à la surface des protéines, dans des zones flexibles ou des interfaces entre domaines protéiques que l'uranyle semble pouvoir stabiliser. Le caractère acide de Lewis dur de l'ion uranyle favorise sa liaison aux groupes oxygénés (aspartates ou glutamates) ou phosphatés des protéines. C'est le cas le plus fréquent, mais on trouve aussi de nombreux exemples de liaison aux ligands azotés (imidazoles des histidines), comme dans la protéine NikR ou le facteur von Willebrand (complexe 1AUQ dans la PDB).

En complément des mécanismes survenant dans la première sphère de coordination de l'uranium, des interactions à longue distance, comme les effets électrostatiques ou les liaisons hydrogène, doivent être

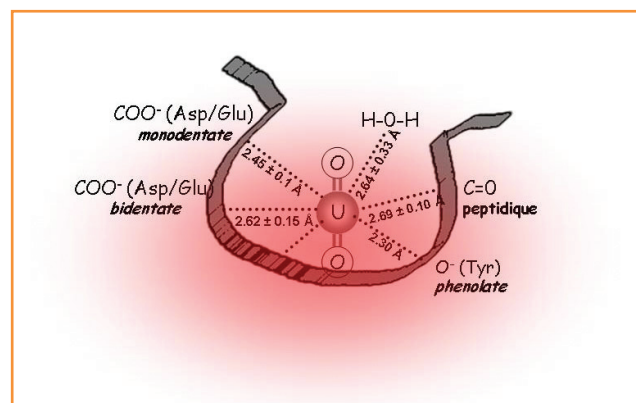


Figure 3 - Vision schématique d'un site de liaison à l'uranyle au sein d'une protéine.

La coordination implique cinq à six ligands équatoriaux, préférentiellement des ligands oxygénés mais sans exclusivité. Les cavités contiennent fréquemment une molécule d'eau ou un ion synergique, comme le carbonate. L'uranyle est très polarisé, l'environnement électrostatique est particulièrement important.

considérées. On prendra également en compte la stabilité des ligands équatoriaux (carbonates par exemple) qui, dans certains cas, restent associés au sein de complexes ternaires avec les protéines.

Conclusions et perspectives

L'étude de l'interaction protéine-uranyle a révélé un champ riche et pluridisciplinaire. Des complexes peuvent se former, mais les équilibres en milieu biologique sont particulièrement complexes et les cinétiques parfois lentes. L'analyse cinétique *in vivo* doit prendre en compte les nombreuses compétitions de faible affinité et les processus multiphasiques. Des résultats préliminaires sur la transferrine suggèrent une contribution forte de la réduction d'entropie dans le bilan d'énergie libre d'interaction. Malgré les difficultés de mesure (interférence des réactions d'hydrolyse), il sera important de poursuivre l'étude thermodynamique sur plusieurs protéines issues des criblages de cible. Si ce mécanisme de formation de complexes très stables se confirmait, il faudra que les molécules décorporantes puissent déstabiliser les complexes protéine-uranyle : une tâche délicate !

Malgré le progrès des connaissances biochimiques, on est encore loin de pouvoir rationaliser le comportement toxicocinétique de l'uranyle ou de concevoir le décorporant spécifique qui nous manque encore. Il y a de la place pour les chimistes ambitieux !

Références

- [1] Bunn M., Heinonen O., Preventing the next Fukushima, *Science*, **2011**, 333, p. 1580.
- [2] Clewell H.J.III, Andersen M.E., Blaauboer B.J., On the incorporation of chemical-specific information in risk assessment, *Toxicol. Lett.*, **2008**, 180, p. 100.
- [3] Goodsell D.S., Inside a living cell, *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, 16, p. 203.
- [4] Duffus J.H., "Heavy metals" - a meaningless term?, *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74, p. 793.
- [5] Paquet F., Adam-Guillermine C., Ansoborlo E., Beaugelin-Seiller K., Carrière M., Dublineau I., Taran F., Vidaud C., Uranium, Chap. 23, *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, M.-T. Ménager, J. Garnier-Laplace, M. Goyffon (eds), Tec & Doc/Lavoisier, **2009**, p. 411.
- [6] *ATSDR - Toxicological profile for uranium*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, **2011**.
- [7] Souidi M., Tissandie E., Racine R., Ben Soussan H., Rouas C., Grignard E., Dublineau I., Gourmelon P., Lestaev P., Gueguen Y., Uranium :

- propriétés et effets biologiques après contamination interne, *Ann. Biol. Clin.*, **2009**, 67, p. 23.
- [8] ICRP Publication 69, Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides – Part 3 : Ingestion doses coefficients, *Ann. ICRP*, **1995**, 25(1).
- [9] Ansoborlo E., Prat O., Moisy P., Den Auwer C., Guilbaud P., Carrière M., Gouget B., Duffield J., Doizi D., Vercouter T., Moulin C., Moulin V., Actinide speciation in relation to biological processes, *Biochimie*, **2006**, 88, p. 1605.
- [10] Van Horn J.D., Huang H., Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, p. 765.
- [11] Pible O., Guilbaud P., Pellequer J.-L., Vidaud C., Quéméneur E., Structural insights into protein-uranyl interaction: towards an *in silico* detection method, *Biochimie*, **2006**, 88, p. 1631.
- [12] Garcia D., Lecomte-Pradines C., Quéméneur E., Biodétecteurs environnementaux, *Biofutur*, **2009**, 295, p. 24.
- [13] Vidaud C., Gourion-Arsiquaud S., Rollin-Genetet F., Torne-Celer C., Plantevin S., Pible O., Berthomieu C., Quéméneur E., Structural consequences of UO_2^{2+} binding to apotransferrin: can this protein account for uranium entry into human cells?, *Biochemistry*, **2007**, 46, p. 2215.
- [14] Montavon G., Apostolidis C., Bruchertseifer F., Repinc U., Morgenstern A., Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, p. 1609.
- [15] Pible O., Vidaud C., Plantevin S., Pellequer J.-L., Quéméneur E., Predicting the disruption by UO_2^{2+} of a protein-ligand interaction, *Protein Science*, **2010**, 19, p. 2219.
- [16] Kristensen L.H., Nielsen P.E., Jorgensen C.I., Kragelund B.B., Mollegaard N.E., Phosphate selective uranyl photo-affinity cleavage of proteins - Determination of phosphorylation sites, *ChemBiochem*, **2008**, 9, p. 2377.
- [17] Wegner S.V., Boyaci H., Chen H., Jensen M.P., He C., Engineering a uranyl-specific binding protein from NikR, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, p. 2339.
- [18] Reisser-Rubrecht L., Torne-Celer C., Averseng O., Plantevin S., Quéméneur E., Bellanger L., Vidaud C., High affinity uranyl specific antibodies suitable for cellular imaging, *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, 21, p. 349.
- [19] Blake R.C., Pavlov A.R., Khosraviani M., Ensley H.E., Kiefer G.E., Yu H., Li X., Blake D.A., Novel monoclonal antibodies with specificity for chelated uranium(VI): isolation and binding properties, *Bioconj. Chem.*, **2004**, 15, p. 1125.
- [20] Zhu X., Kriegel A.M., Boustany C.A., Blake D.A., Single-chain variable fragment (scFv) antibodies optimized for environmental analysis of uranium, *Anal. Chem.*, **2011**, 83, p. 3717.
- [21] Odorico M., Teulon J.M., Bessou T., Vidaud C., Bellanger L., Chen S.W., Quéméneur E., Parot P., Pellequer J.L., Energy landscape of chelated uranyl-antibody interactions by dynamic force spectroscopy, *Biophys. J.*, **2007**, 93, p. 645.
- [22] Vidaud C., Dedieu A., Basset C., Plantevin S., Dany I., Pible O., Quéméneur E., Screening of human serum proteins for uranium binding, *Chem. Res. Toxicol.*, **2005**, 18, p. 946.
- [23] Dedieu A., Berenguer F., Basset C., Prat O., Quéméneur E., Pible O., Vidaud C., 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.



Éric Quéméneur

est directeur du programme de toxicologie du CEA et adjoint scientifique au directeur des Sciences du Vivant*.

* CEA, Direction des Sciences du Vivant, Route du Panorama, BP 6, F-92265 Fontenay-aux-Roses Cedex.
Courriel : eric.quemeneur@cea.fr

Internships Engineers

THE CORPORATE RESEARCH CENTER OF LHOIST, one of the leaders in the production of lime and dolomite for the industry, based in Nivelles (Belgium), is made up of approximately 42 people, structured primarily by industrial application, each type of application, typically representative of an industry served by the group. R&D Engineers work in close interaction with their equivalent in Product Development. The Corporate Research Center includes a Laboratory / Technical Assistance team and a Documentation, Patents & Licensing team, both providing support across all applications / industries. In addition, the Nivelles center interacts closely with smaller research units, one based in Germany, the others in the US and Brazil.

Over the last few years a series of improvement initiatives have been defined and implemented in order to evolve towards a more modern, innovative and entrepreneurial R&D organization.

We are looking at offering internship opportunities to scientific students especially coming from abroad so as to enhance multicultural exchanges.

Interested? All cvs should be addressed to marie-france.weichselbaum@lhoist.com
You will find more information on the group on www.lhoist.com

