

Déterminer les mécanismes moléculaires conduisant à la toxicité de l'uranium

La longue marche !

Claude Vidaud et Agnès Hagège

Résumé L'élucidation des mécanismes de toxicité d'un métal passe par l'identification de ses cibles protéiques. À l'heure actuelle, il est difficile de prédire les sites favorables à la fixation des métaux. La détermination des cibles d'un métal *ex nihilo* nécessite par conséquent de mettre en œuvre des techniques séparatives associées à des identifications en spectrométrie de masse moléculaire et élémentaire. Mais cette étape n'est pas suffisante : la détermination précise de leurs constantes d'affinité relatives vis-à-vis du métal est indispensable pour décrire celles qui vont réellement le véhiculer dans l'organisme. Ce type de démarche est illustré au travers de l'exemple de l'uranium.

Mots-clés Toxicité, uranium, actinides, méthodes séparatives, métallomique.

Abstract **A long way to elucidate molecular mechanisms leading to uranium toxicity**
The elucidation of the mechanisms of metal toxicity necessitates the identification of its proteic targets. To date, the prediction of the sites enabling metal fixation is still impossible. As a consequence, the determination *ex nihilo* of metal targets requires the implementation of separation techniques together with an identification using both molecular and elemental mass spectrometry. But this approach remains insufficient, and the precise determination of affinity constants towards a metal is essential for the description of the proteins which really carry the metal throughout the organism. This is exemplified through the uranium case.

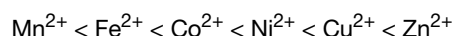
Keywords Toxicity, uranium, actinides, separation methods, metallomics.

Les mécanismes biologiques nécessitent la présence de métaux

Les métaux omniprésents dans notre environnement sont essentiels à toute forme de vie. Les systèmes vivants utilisent des métaux relativement abondants : les alcalino-terreux (Ca, Mg), les alcalins (Na, K) et ceux de la première série de transition, le fer et le cuivre, qui ont permis aux organismes de s'adapter à la présence d'oxygène et sont particulièrement représentés, mais aussi le zinc, le manganèse, le cobalt... (voir *tableau*). Les métaux ont des fonctions i) de structure (Ca, Zn, Mg) ; ii) de réserve, comme dans le cas de la ferritine, une protéine capable de stocker jusqu'à 4 500 atomes de Fe³⁺, forme oxydée du métal très peu soluble à pH physiologique ; iii) de transfert d'électrons (Fe, Cu, Mn, V, Mo, Co, Ni) ; iv) de liaison du dioxygène (Fe, Cu) ; v) catalytiques (Mn, Co, Ni, Mo) ; vi) de transfert d'information (Na, K, Ca) [1].

Il est communément admis qu'un tiers des protéines requiert la présence de métaux. Ils peuvent être directement liés aux acides aminés qui les constituent, mais aussi *via* des groupements prosthétiques comme l'hème des hémoglobines ou des glycosylations de ces protéines. L'établisse-

ment des interactions métaux-protéines dépend des orbitales de valence des ligands et des propriétés de charge, du nombre de coordination et de la géométrie de l'ion métallique. L'ordre de stabilité suit globalement la série établie par Irving et Williams pour un ligand donné [2] :



Selon la théorie HSAB (« hard and soft acids and bases ») ou de Pearson [3], les cations durs, de faible rayon ionique et de charge élevée, établissent des liaisons avec des bases d'électronégativité élevée dite dures, et les cations dits « mous », de grand rayon ionique et de faible charge, établissent des liaisons avec des bases molles de faible électronégativité.

Les métaux sont tous potentiellement toxiques

Si les carences en métaux essentiels sont néfastes pour l'organisme, ils sont aussi toxiques à concentrations élevées et leur homéostasie doit être finement régulée. Ainsi l'anémie ferriprive et l'hémochromatose sont deux pathologies, l'une

Éléments constituant plus de 95 % du poids corporel
oxygène (O), carbone (C), hydrogène (H), azote (N)
Éléments majeurs (mg/g)
calcium (Ca), phosphore (P), potassium (K), soufre (S), chlore (Cl), sodium (Na), magnésium (Mg)
Éléments-traces (µg/g)
<i>essentiels à la vie :</i>
fer (Fe), cuivre (Cu), zinc (Zn), sélénium (Se), cobalt (Co), manganèse (Mn), molybdène (Mo), iode (I), fluor (F), vanadium (V), nickel (Ni), silicium (Si), chrome (Cr)
<i>non essentiels et/ou toxiques :</i>
arsenic (As), aluminium (Al), bore (B), cadmium (Cd), uranium (U), mercure (Hg), plomb (Pb)...

Les principaux éléments du système vivant.

résultant d'un déficit et l'autre d'une surcharge en fer dont la concentration sérique normale varie de 15 à 30 µmol/L. Les deux pathologies sont symptomatiques en deçà de 10 µmol/L pour l'anémie, au-delà de 70 µmol/L pour l'hémochromatose.

En dehors des métaux essentiels, certains sont délibérément toxiques, même à très faibles doses, alors que d'autres semblent relativement tolérés. La plupart des motifs peptidiques intervenant dans la liaison protéine-métal n'impliquent qu'un petit nombre d'acides aminés organisés dans un arrangement spatial propice, et un motif donné peut permettre de lier des métaux différents. La formation de complexes entre une protéine et un métal inapproprié conduit généralement à des structures inadéquates qui altèrent leurs fonctions. La *figure 1* illustre les modifications de structures du site métallique d'une des protéines capable de lier différents métaux où le zinc est substitué par un ion cadmium [4].

La régulation des mécanismes qui conduisent à la fixation spécifique d'un métal dans une séquence protéique donnée est particulièrement complexe, et actuellement, il est encore impossible de prédire à partir de sa séquence en acides aminés si une protéine liera ou non un métal. Par ailleurs, il n'y a pas de mécanismes clés pour un métal donné et des métaux différents peuvent conduire à l'expression de pathologies similaires [5] : carcinogénicité (Ni, Co, Cd, As, Cr, Pt), immunotoxicité (Au, Co, Cr, Ni, Pt), spermioxicités (Cd, Pb, Tl), néphrotoxicité (Cd, U), neurotoxicité (Al, Hg, Mn)... Contrairement à d'autres toxiques, les métaux ne peuvent ni être générés ni détruits par les organismes vivants : seule leur forme peut changer, modifiant leur biodisponibilité et leur toxicité. La spéciation chimique (voir l'article de Carole Bresson *et coll.* p. 26) est donc un paramètre majeur à prendre en compte en plus du type d'exposition (inhalation, ingestion, contact cutané), de la dose et de la fréquence d'exposition.

La première « lésion » toxique résulte de l'interaction entre le métal et une (des) cible(s) endogène(s), dont l'identification est nécessaire pour comprendre son devenir dans un organisme, mais aussi pour concevoir des molécules capables de complexer ce métal afin de limiter ses effets et de favoriser son élimination par décorporation⁽¹⁾.

Détermination des cibles de métaux : cas de l'uranium

L'uranium n'a aucune fonction biologique connue. Cet élément 5f, dont l'isotope naturel majoritaire est ²³⁸U, est un

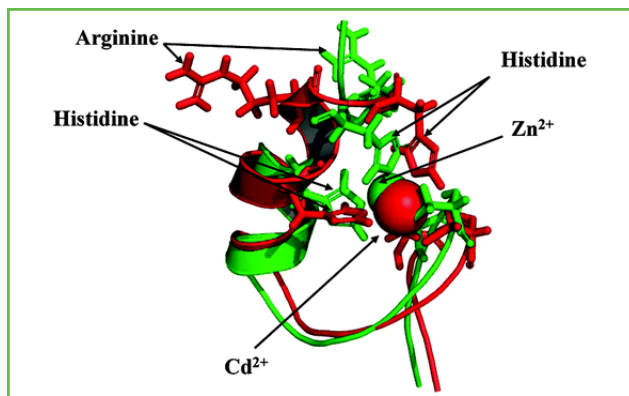


Figure 1 - Substitution du zinc par un ion cadmium dans un site métallique d'une protéine à doigt de zinc ; incidence sur la conformation du squelette polypeptidique (d'après [4]).

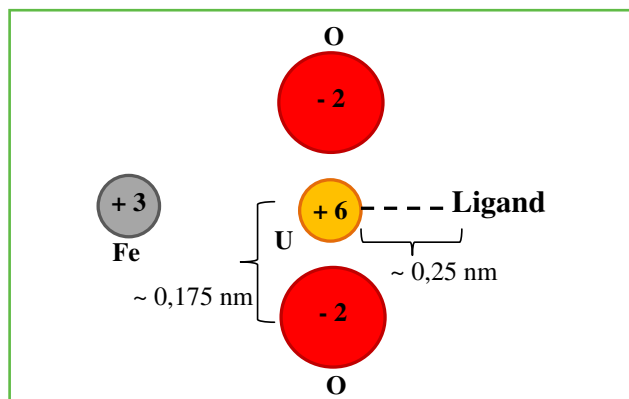


Figure 2 - Caractéristiques du cation uranyle par comparaison avec le cation du fer (d'après [6]).

très faible émetteur α ; ainsi sa toxicité chimique prévaut sur sa toxicité radiologique. En solution aqueuse, il se trouve sous la forme du dioxocation uranyle (UO_2^{2+}) et établit quatre à cinq liaisons de coordination dans un plan perpendiculaire à l'axe formé par les deux oxygènes (*figure 2*). Comme acide de Lewis dur, il peut se lier aux oxygènes des glutamates, des aspartates et des tyrosines, et dans une moindre mesure à l'azote des histidines. Il présente une spéciation très complexe en milieu physiologique et ses caractéristiques particulières, notamment de taille et de géométrie (*figure 2*), empêchent toute « analogie » avec d'autres éléments [6].

Quelle que soit sa voie d'entrée, UO_2^{2+} passe dans le sang où il forme des complexes avec les carbonates (50 %) et les protéines (30 %), les 20 % restants étant retrouvés à la surface des hématies. Ses organes cibles sont essentiellement le rein et le squelette et dans une moindre mesure le foie, les tissus mous et le cerveau [7]. Néphrotoxique, il provoque des atteintes au niveau des tubules et des glomérules rénaux, et à l'échelle de la cellule rénale, on observe une accumulation de phosphates d'uranyle dans les lysosomes [8]. Dès les premières heures suivant l'intoxication, environ 20 % de l'uranyle sont retrouvés dans les os où son temps de rétention peut atteindre plusieurs années [9]. La succession des processus biochimiques conduisant à cette accumulation n'est pas décrite, et cette connaissance est essentielle pour concevoir de nouveaux traitements plus efficaces que ceux actuellement disponibles.

L'identification des protéines affines pour UO_2^{2+} à partir de fluides biologiques est donc primordiale et nécessite la mise en place de stratégies séparatives. La première difficulté réside dans le fait que les stabilités de complexes non covalents protéine-métal sont sensibles à des variations de pH, de force ionique et de température, contrairement aux espèces covalentes. Les méthodes mises en œuvre doivent conserver des complexes généralement formés en très faibles concentrations, et les isoler sélectivement parmi les milliers de protéines d'un milieu biologique dont les concentrations sont réparties sur une échelle allant de 1 à 10^{12} dans le cas d'un sérum reste un défi. À l'heure actuelle, les méthodes permettant de séparer des complexes non covalents sont peu nombreuses (électrophorèse en conditions non dénaturantes, électrophorèse capillaire, chromatographie d'exclusion...), et en raison de la labilité potentielle des solutés, les paramètres de séparation sont très restreints. De ce fait, la résolution qui en résulte est souvent très insuffisante pour séparer l'ensemble des constituants d'un mélange biologique.

Les stratégies que nous avons adoptées reposent non plus sur l'identification des cibles réellement formées *in situ*, mais sur celle de l'ensemble des cibles de l'uranium par des approches *in silico* et *in vitro*. La répartition de l'uranyle a été ensuite déterminée grâce à la mesure des constantes d'affinité en mettant en œuvre une large panoplie de méthodes.

Stratégie par criblage *in silico*

La première stratégie consiste à sélectionner des protéines affines de l'uranyle grâce à un algorithme de criblage développé au laboratoire [10] visant à identifier des sites putatifs du métal dans les structures protéiques déposées dans des banques de données comme la « Protein Data Bank » (PDB) (figure 3). La « C Reactive Protein » (CRP) a été ainsi sélectionnée, et cette protéine a démontré ses capacités de fixation du cation UO_2^{2+} dans un site très voisin de celui du calcium, cation naturel de la protéine, et avec une affinité environ cent fois supérieure. La conséquence de cette affinité pour UO_2^{2+} est une modification structurale au voisinage du site de la fixation du métal entraînant une perte de fonctionnalité : l'absence de la reconnaissance de la phosphocholine [11]. Le manque de données structurales relatives à des protéines entières ne permet pas une étude exhaustive de recherche de cibles des métaux, et quel que soit le métal, il existe peu d'approches de ce type [12].

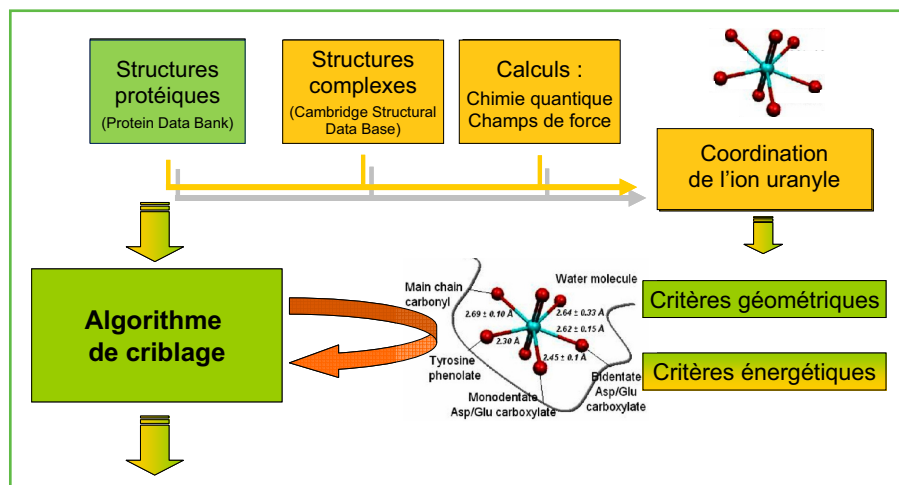


Figure 3 - Principe de l'algorithme de criblage développé (d'après [10]).

Méthodes analytiques

La seconde stratégie consiste à travailler sur des échantillons biologiques en utilisant deux approches analytiques :

Chromatographie multidimensionnelle

La première utilisée dans cette étude est basée sur un préfractionnement poussé des échantillons biologiques grâce à une chromatographie multidimensionnelle. La détermination des protéines cibles est alors réalisée sur des mélanges simplifiés par incubation d' UO_2^{2+} et leur identification par spectrométrie de masse. L'affinité de ces protéines sériques pour UO_2^{2+} a été validée pour douze d'entre elles [13].

Chromatographie d'affinité

Cette approche est cependant inadaptée au cas de petits échantillons comme les extraits cellulaires, pour lesquels les techniques d'affinités sur métal immobilisé (« immobilized metal affinity chromatography », IMAC) sont plus adéquates [14]. L'IMAC est une méthode de « capture » de protéines qui ont la potentialité de lier un métal dans la configuration imposée par le ligand fixé sur la phase stationnaire et avec une sélectivité liée à l'accessibilité des sites de fixation du métal dans la protéine. Généralement, des résines fonctionnalisées avec de l'acide nitrilotriacétique sont utilisées pour immobiliser les métaux comme le zinc, le cobalt ou le cuivre [15]. Dans le cas du cation UO_2^{2+} , ses caractéristiques de taille et de géométrie n'ont pas permis d'utiliser ces phases stationnaires. L'isolement d'une soixantaine de protéines liant le métal à partir d'extraits de cellules rénales a été réalisé après avoir développé un support greffé par des groupements de type amine phosphonique où UO_2^{2+} était immobilisé [16] et leur identification a été réalisée par spectrométrie de masse [17].

Détermination des constantes d'affinité par résonance plasmonique de surface

Dans toutes ces approches, l'étape de détermination des constantes d'affinité pour le métal reste indispensable pour décrire la biodistribution de l'uranyle.

Les techniques biophysiques classiques qui n'utilisent pas de méthode séparative (spectrophotométrie, spectroscopie de fluorescence, dichroïsme circulaire, calorimétrie) visent à quantifier le complexe formé ou le métal libre dans

l'équilibre $\text{P}_x + (\text{UO}_2^{2+})_y \rightleftharpoons [\text{P}_x(\text{UO}_2)_y]$. Elles nécessitent des quantités relativement importantes de protéines et leurs sensibilités ne permettent pas de déterminer des constantes très élevées.

Nous avons donc conçu une méthode utilisant la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore®) pour quantifier l'uranyle libre dans l'équilibre. Cette méthode est basée sur le développement d'un anticorps permettant la reconnaissance de l'uranium libre. De plus, la sensibilité de la mesure est exacerbée par l'utilisation d'un ligand rapporteur et conduit à une limite de détection du métal permettant d'atteindre des constantes d'affinité apparentes de l'ordre de la dizaine de nanomolaires [18]. À partir de ces données et des concentrations relatives des

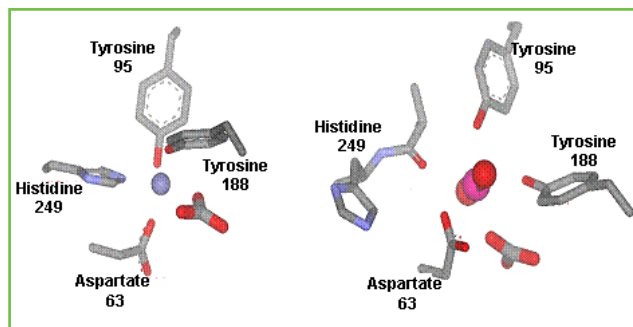


Figure 4 - Représentation d'une organisation spatiale des ligands du métal dans le site d'une protéine, la transferrine : à gauche avec le fer, à droite avec l'uranyle (d'après [20]).

protéines dans le milieu biologique, il est possible de prédire une biodistribution du métal.

Conclusion

L'ensemble de ces démarches a prouvé son potentiel dans la détermination *ex nihilo* de cibles possibles de l'uranyle et peut s'appliquer à toute recherche de cibles d'autres métaux.

La validation de la biodistribution de l'uranyle établie à partir de constantes reste indispensable en réalisant des compétitions. À ce titre, les techniques d'électrophorèse couplées à l'ICP-MS sont tout particulièrement attrayantes [19]. Par ailleurs, la description précise de l'organisation des ligands de l'uranyle dans les sites protéiques doit être enrichie avec un double enjeu : d'une part déterminer les possibles modifications structurales de la protéine et leurs conséquences en termes de fonctionnalité, et d'autre part concevoir des décorporants bio-inspirés⁽²⁾. Ces données sont encore trop peu nombreuses à ce jour, à l'exception de quelques protéines comme la transferrine (figure 4) [20].

Aujourd'hui, la compréhension des phénomènes de toxicité des métaux dans leur ensemble nécessite de renforcer les interactions entre les différents niveaux d'investigation et d'information [21] : *in vitro*, *in silico* et techniques dites « omics » (protéomique, transcriptomique, métallomique).

Notes et références

- (1) *Décorporation* : traitement visant à éliminer de l'organisme au moyen d'une substance chimique des éléments radioactifs ou toxiques qui ont été incorporés (*Journal Officiel* du 22/02/2009).
- (2) La *bio-inspiration* correspond au décodage d'un concept de construction utilisé par la nature et à son extrapolation pour la fabrication de matériaux

originaux présentant d'autres propriétés et applications, souvent différentes de celles développées par la nature.

- [1] Holm R.H., Kennepohl P., Solomon E.I., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, p. 2239.
- [2] Irving H., Williams R.J.P., *J. Chem. Soc.*, **1953**, p. 3192.
- [3] Pearson R.G., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1963**, 85, p. 3533.
- [4] Kothinti R., Blodgett A., Tatabalai N.M., Petering D.H., *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, 23, p. 405.
- [5] Wang S.W., Shi X.L., *Mol. Cell. Biochem.*, **2001**, 222, p. 3.
- [6] Van Horn J. D., Huang H., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, p. 765.
- [7] Paquet F., Houpert P., Blanchardon E., Delissen O., Maubert C., Dhieux B., Moreels A.M., Frelon S., Voisin P., Gourmelon P., *Health Physics*, **2006**, 90, p. 139.
- [8] Carriere M., Proux O., Milgram S., Thiebault C., Avoscan L., Barre N., Den Auwer C., Gouget B., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, 13, p. 655.
- [9] Durbin P.W., *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, **2006**, 5, p. 3339.
- [10] Pible O., Guilbaud P., Pellequer J.L., Vidaud C., Quéméneur E., *Biochimie*, **2006**, p. 1631.
- [11] Pible O., Vidaud C., Plantevin S., Pellequer J.L., Quéméneur E., *Protein Sci.*, **2010**, 19, p. 2219.
- [12] Andreini C., Bertini I., Rosato A., *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42, p. 1471.
- [13] Vidaud C., Dedieu A., Basset C., Plantevin S., Dany I., Pible O., Quéméneur E., *Chem. Res. Toxicol.*, **2005**, 18, p. 946.
- [14] Porath J., *Protein Expr. Purif.*, **1992**, 3, p. 263.
- [15] Smith S.D., She Y.M., Roberts E.A., Sarkar B., *J. Proteome Res.*, **2004**, 3, p. 834.
- [16] Dedieu A., Berenguer F., Basset C., Prat O., Quéméneur E., Pible O., Vidaud C., *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 5365.
- [17] Basset C., Dedieu A., Guerin P., Quéméneur E., Meyer D., Vidaud C., *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1185, p. 233.
- [18] Averseng O., Hagège A., Taran F., Vidaud C., *Anal. Chem.*, **2010**, 82, p. 9797.
- [19] Frelon S., Guipaud O., Mounicou S., Lobinski R., Delissen O., Paquet F., *Radiochim. Acta*, **2009**, 97, p. 367 ; Chamoun J., Hagège A., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2005**, 20, p. 1030 ; Chamoun J., Hagège A., *Radiochim. Acta*, **2005**, 93, p. 659.
- [20] Vidaud C., Gourion-Arsiquaud S., Rollin-Genetet F., Torne-Celer C., Plantevin S., Pible O., Berthomieu C., Quéméneur E., *Biochemistry*, **2007**, 46, p. 2215.
- [21] Yannone S.M., Hartung S., Menon A.L., Adams M.W.W., Tainer J.A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2012**, 23, p. 89 ; Lobinski R., Becker J.S., Haraguchi H., Sarkar B., *Pure Appl. Chem.*, **2010**, 82, p. 493.



C. Vidaud

Claude Vidaud

(auteur correspondant)

est chercheur au CEA, chef de laboratoire, Bagnols-sur-Cèze*.

Agnès Hagège

est chargée de recherche au CNRS, CEA Cadarache**.



A. Hagège

* CEA/DSV/SBTN, BP 17171, F- 30207 Bagnols-sur-Cèze Cedex.
Courriel : claud.vidaud@cea.fr

** CNRS, UMR 7265, CEA Cadarache, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance Cedex.
Courriel : agnes.hagege@cea.fr

Ressources nationales de chimie

www.educnet.education.fr/rnchimie



RNChimie (Ressources nationales de chimie) est un site destiné aux enseignants des lycées généraux et technologiques, des BTS et des CPGE. Vous y trouverez plus de 600 protocoles de travaux pratiques, des recommandations pédagogiques, des cours, des exercices, des présentations sous forme de diaporamas télé-chargeables, des fiches techniques de TP, des informations relatives à la sécurité mais aussi de l'histoire des sciences, des informations et des données sur les techniques spectroscopiques et chromatographiques dont des données expérimentales directement utilisables. Vous y trouverez également des cours, TD et applications sur les plans d'expérience (mathématiques), des cours et exercices de génie chimique, des exemples de TP basés sur la démarche d'investigation.

**RNChimie, c'est 600 pages web,
700 fichiers doc/zip, 930 documents pdf
et des dizaines de diaporamas à votre disposition !**