



HAL
open science

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

Claude Alban, Jean Aupiais, Maria Rosa Beccia, C. Berthomieu, Damien Bourgeois, Jacques Bourguignon, Carole Bresson, Georges F. Carles, Virginie Chapon, Gaelle Creff, et al.

► To cite this version:

Claude Alban, Jean Aupiais, Maria Rosa Beccia, C. Berthomieu, Damien Bourgeois, et al.. Les actinides leur interaction avec les processus biologiques: où en sommes-nous?. *L'Actualité Chimique*, 2021, 460-461, pp.68-75. hal-03188160

HAL Id: hal-03188160

<https://hal.science/hal-03188160>

Submitted on 2 Apr 2021

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

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

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

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 Auwer³, Christophe Di Giorgio³, Thomas Dumas⁹, Philippe Guilbaud⁹, Agnès Hagège¹⁰, Véronique Malard⁴, Philippe Moisy⁹, Eduardo Paredes⁶, Valerie Pierrefite-Carle⁷, Stéphane Ravanel¹, Sabine Santucci-Darmanin⁷, Sandrine Sauge-Merle⁴, Bruno Siberchicot², Pier Lorenzo Solari¹¹, Anne Vander Meeren¹², Claude Vidaud¹³



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'Etudes 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, Univ 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

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, avec 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 n'est pas une revue, il embrasse 20 ans de chimie dite "bioactinidique" avec une sélection d'exemples, illustrant ainsi la complémentarité des disciplines scientifiques impliquées.

Mots clés : Toxicologie des actinides, biochimie des actinides, nucléaire, actinides

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 their retention and excretion rates, their physiological impact in the event of exposure and their main biological targets. With increasing availability of non-conventional spectroscopic and analytical tools, with 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 is not a

review, it covers 20 years of so-called "bioactinidic" chemistry with a selection of examples, illustrating the complementarity of scientific disciplines.

Keywords : Actinide toxicology, actinide biochemistry, nuclear, actinides

Introduction.

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 15 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 USA 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, USA), 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, créée en 1928) et l'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, créée 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.

I. 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'humain⁴ : le sérum sanguin, la salive, le « jus gastrique » et le milieu de culture. Ces quatre milieux ont des potentiels rédox 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 ou les phosphates ou organiques comme le citrate, le bicarbonate, le lactate, l'oxalate, ainsi que des protéines très variées dépendantes du compartiment biologique considéré (organe, fluide, cellules etc.).

Etablir 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. A 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-hydrogénophosphate ($\text{An}(\text{HPO}_4)_{3\text{ou}4}^{2\text{ou}4-}$) 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-carbonato ($\text{AnO}_2(\text{CO}_3)^-$) (environ 60%),^{6,7,8} mono-citrato ($\text{AnO}_2(\text{Cit})^{2-9}$) et mono-hydrogénophosphate ($\text{AnO}_2(\text{HPO}_4)^{2-}$ (environ 7% chacun) et une très faible proportion de complexe di-carbonato.

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 !

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 rendue possible par des allers-retours entre les mesures de spectroscopie (spectroscopie d'absorption X ou vibrationnelle par exemple) et les simulations.

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'U, la cible principale de l'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 d'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 l'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.

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 les peptides 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 carbonyles 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 phosphates 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 An 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 pré-orienter 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 d'U(VI) nettement plus stables que ceux observés avec les peptides linéaires de même séquence.

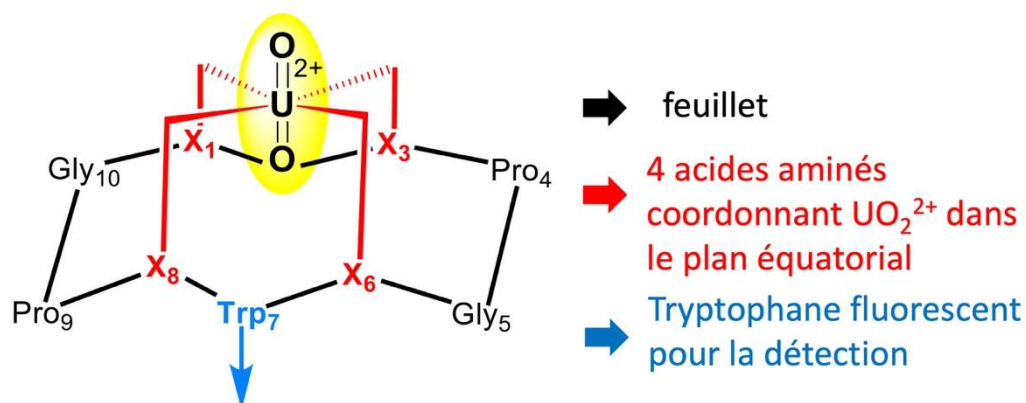


Figure 1 : Un cyclododecapeptide de structure adaptée à la coordination de l'U(VI).¹²

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

II. Les protéines sont-elles "Actinophiles" ?

On estime qu'environ la moitié des protéines exprimées chez l'homme interagit 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 radio-toxicité.

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 l'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.

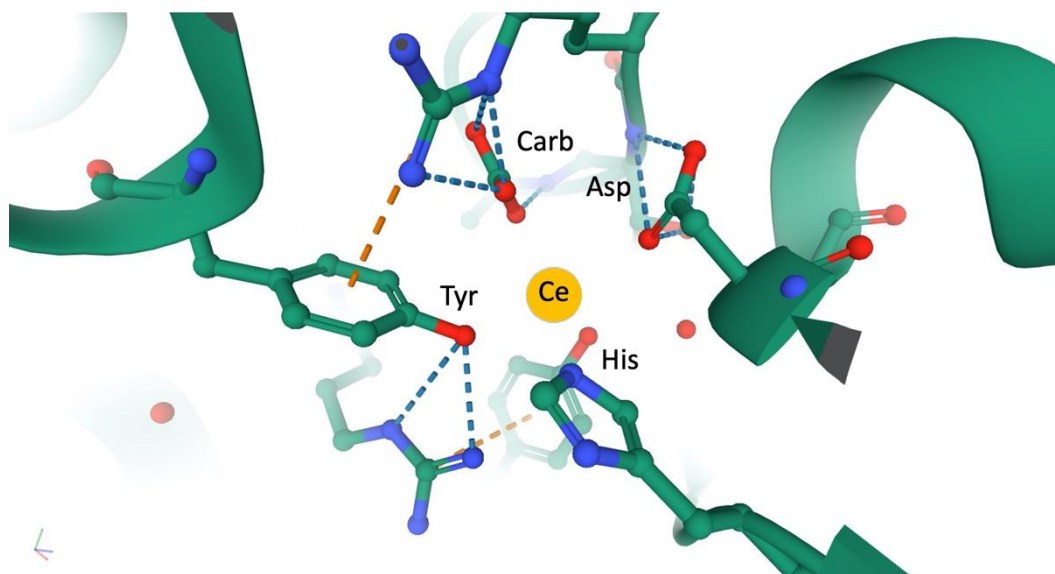


Figure 2 : Représentation du site de complexation du Ce(IV) dans le lobe N de la lactoferrine (d'après la référence PDB 1FCK).¹³ Les fonctions complexantes sont un carbonate bidente (Carb), une tyrosine (Tyr92), un aspartate (Asp60) et une histidine (His253). Notons que Ce(IV) (un lanthanide) ou souvent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

L'albumine forme également des complexes avec le 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 du Pu(IV) avec les sites à Fe(III) de la transferrine et celle de l'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 métalloprotéomique 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 d'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 du Ca(II) ou du 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 du 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 l'Am(III) et du Cm(III) semblent être associés à la protéine.¹⁵ Enfin la transferrine ne présente qu'une affinité très limitée pour l'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 le Pu(IV), le Np(IV) et le Fe(III) (impliquant des 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 couplage inductif (EC-ICP/MS) (Figure 3).¹⁸

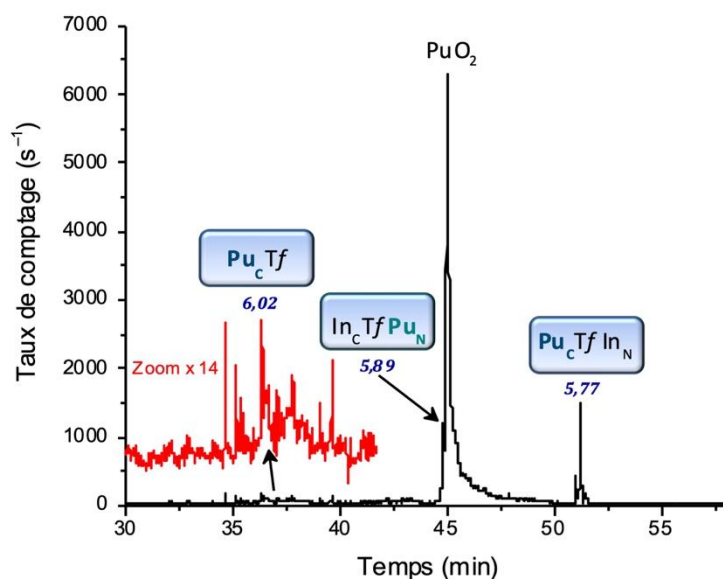


Figure 3 : Exemple de séparation de 3 complexes Pu-transferrine par focalisation isoélectrique capillaire et couplage à un spectromètre de masse de type ICP/MS pour la détection spécifique du Pu. En raison d'interférences isobariques entre le fer et le plasma, le fer a été remplacé par l'analogue In. 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

Les auteurs ont montré en particulier que l'affinité de l'un des lobes de la protéine pour le Pu(IV) est beaucoup plus élevée que pour le Fe(III) alors qu'elle semble comparable entre ce dernier et le 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 féтуine 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 ¼ de la fraction des protéines non collagéniques du squelette. Elle possède 3 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 constitué 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 féтуine.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% de l'U(VI) lié aux protéines sériques. Elle possède également une remarquable affinité pour Pu(IV) à pH 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 du Pu(IV)²¹ et certaines de celles d'U(VI).²² De plus, le Pu(IV) mais aussi Np(V) ou U(VI) ainsi que des An trivalents comme le 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 12 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 4 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).

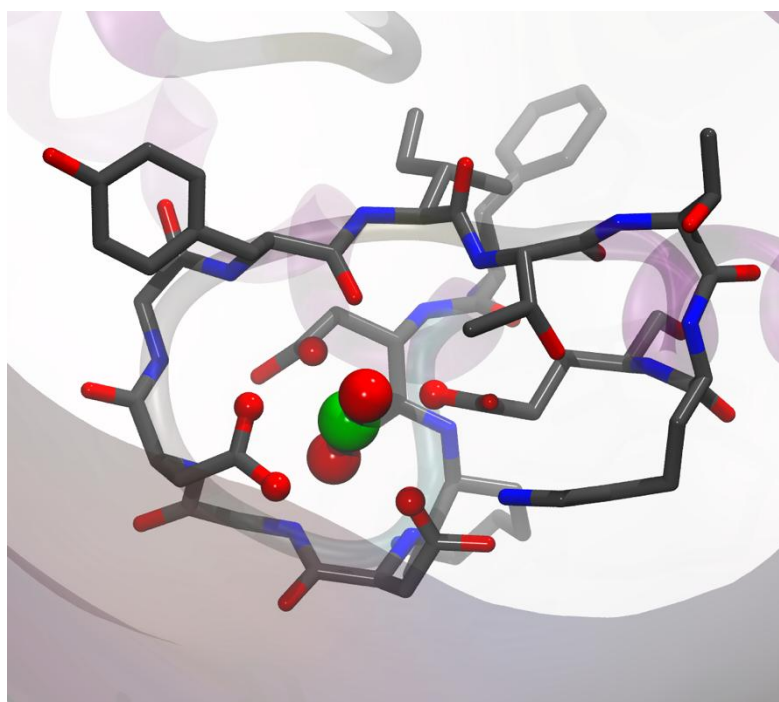


Figure 4 : Modèle structural de la coordination de U(VI) sur le site de fixation du calcium (site 1) de la calmoduline, obtenu par dynamique moléculaire. Une coordination par 5 ligands équatoriaux est soutenue par les données de XAS, tandis que les données de spectroscopie IRTF montrent bien l'implication de ligands carboxylate monodentes et bidentes.²³

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 le Pu(IV) et des motifs de type hélice-boucle-hélice montre également une très forte affinité du Pu(IV) pour ces sites, comparable pour certains d'entre eux à l'affinité du Pu pour la transferrine.²⁵

Quid des protéines phosphorylées ?

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.

Les groupements carboxylates 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 phosphates sont également susceptibles d'intervenir dans l'interaction des protéines avec les An. Si l'on estime que près d'un tiers des protéines cellulaires sont phosphorylées (au moins de façon transitoire) de façon à moduler des fonctions physiologiques spécifiques, et en considérant que l'interaction des groupements phosphates 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. 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 phosphates et les An.²⁶ Dans une étude sur l'identification des protéines cibles d'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 à l'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 l'U(VI).²⁷ Des mesures de spectroscopie ont montré l'importance des groupements phosphate dans l'environnement proche d'U(VI) complexé avec la phosvitine, un fragment de la vitellogénine, et très récemment l'interaction de la phosvitine avec l'U(VI) mais également avec le Np(V) a été décrite par spectroscopie d'absorption X.²⁸

L'ostéopontine, une protéine hyperphosphorylée intrinsèquement désordonnée est également une cible privilégiée de l'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 phosphates dans la sphère de coordination de l'U(VI) est confirmée mais apparaît moins importante que dans le cas du Th(IV) qui intègre deux fois plus de ces groupements dans son environnement proche. Cette observation semble donc indiquer une affinité plus importante du Th(IV) (et plus largement des An(IV)) pour les groupements phosphates, 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 le Th(IV), le Pu(IV) et l'U(VI)). Il est à noter que dans les deux cas, le site de complexation de l'actinide apparaît différent de celui du Ca(II), qui n'implique que des fonctions carboxylates.²⁹

III. 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'U. Des modifications des niveaux des neurotransmetteurs et de leurs métabolites impliqués dans les voies acétylcholine et dopaminergique ont été observées dans le cerveau des animaux après exposition à l'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 d'U(VI). Si l'accumulation intracytoplasmique d'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 d'U

s'accompagne d'une incorporation préférentielle de ^{235}U par les cellules exposées à des concentrations non toxiques d' 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 l' 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 l' 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' U . Enfin des protéines intracellulaires liant l' 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 An, 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 extra-cellulaire, les ostéoclastes qui résorbent cette matrice osseuse, et les ostéocytes issues 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-stoechiométrique 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, support de culture

cellulaire. Contrairement à ce qui était attendu, l'U 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 l'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 possible d'U(VI) entre la matrice osseuse et le milieu biologique impliquent plusieurs niveaux de complexité (Figure 4). Au contact des ostéoblastes, l'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 l'U(VI) se trouve sous forme de méta-autunite (phosphate d'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.

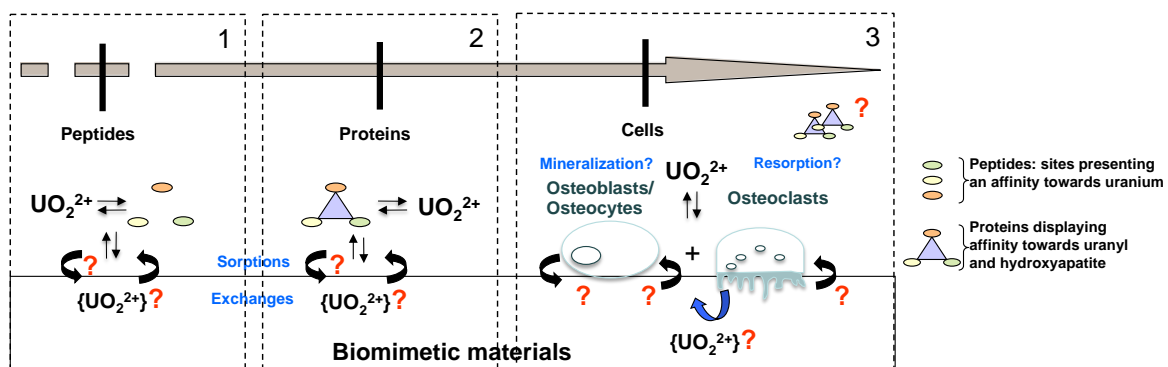


Figure 4 : Les échanges possible d'U(VI) entre la phase minérale osseuse et le milieu biologique aux niveaux moléculaire (1), biochimique (2) et cellulaire (3).³⁴

Les ostéocytes, qui sont emmurés dans la matrice osseuse possèdent une durée de vie de plusieurs années. Ce sont les 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'U lors du processus de minéralisation. Ces concentrations non toxiques affectent la minéralisation de lignées pré-ostéocytaires MLO-A5 dès $2 \mu M$, la quantité de calcium diminuant au profit de l'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 multinuclées formées par la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique. Une exposition à $5 \mu M$ d'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 l'U(VI). Concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu, une exposition à

l'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 l'accumulation de SQSTM1/p62 pourrait contribuer aux effets de l'U(VI) sur l'ostéoclastogénèse.³⁶

IV. Les avancées dans les outils de décorporation

En cas de contamination accidentelle interne, la biodistribution des contaminants dépend de la nature du composé, de sa forme physicochimique 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 décorporation, 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 décorporant 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 décorporants diminue fortement.

Deux objectifs peuvent être recherchés par l'utilisation d'un traitement décorporant : 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 60 ans, le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) est utilisé comme traitement décorporant du Pu(IV) et de l'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 décorporation de l'U(VI). Différentes pistes d'amélioration des décorporants 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, tels que les macrophages) et à augmenter le temps de résidence du décorporant au niveau local.

Pour ce faire, deux approches complémentaires sont envisagées : l'amélioration d'efficacité de molécules existantes, comme le DTPA, par des modifications de protocoles d'administration et/ou l'utilisation de nouvelles formes galéniques et la recherche de nouvelles molécules décorporantes.

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 intra veineuse chez les chiens pour la décorporation de l'Am-241. Enfin des formes liposomales de DTPA ont été développées depuis le début des années 70. L'utilisation de liposomes unilamellaires encapsulant le DTPA ont permis de décorporer les organes systémiques après contamination par du Pu. L'inhibition des 2/3 de la rétention hépatique suggère un accès aux cellules du système réticulo-endothélial du foie. Néanmoins, la voie d'administration intra veineuse 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 polymériques du DTPA.³⁸ Le PEI-MC (PolyEthyleneImine-MethylCarboxylate) et le PEI-MP (PolyEthyleneImine-MethylPhosphonate) basés sur un PEI branché commercial de 25 kDa ont clairement démontré leurs capacités à séquestrer à la fois l'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 polymérique. L'avantage d'un polymère décorporant réside dans le ciblage indirect potentiel des compartiments de rétention biologique des An.

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 méthylène 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 l'U(VI) dans les reins et le fémur des rongeurs après une injection intramusculaire.

V. Et maintenant, quelles perspectives ?

Les An 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'évènements 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. Grâce aux 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, grâce à la combinaison des données de spectroscopie avec les outils de la modélisation, le rôle des An 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.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier 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.

¹ *Toxicologie Nucléaire, Environnementale et Humaine*, M-T. Ménager, J. Garnier Laplace, M. Goyffon, Ed. Lavoisier, **2009**.

² Morrow P.E., Witschi H., Vore M., Hakkinen P.E., Mac Gregor J., Anders M.W., Willhite C., *Toxicol. Sci.* **2000**, *53*, 157.

³ Albrecht-Schmitt T., "Actinides in Animals and Man" in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, L. R. Mors, Springer 4th edition, **2011**.

⁴ 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. *Biochimie* **2006**, *88*, 1605.

⁵ Rothe J., Walther C., Denecke M. A., Fanghänel, T. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4708

⁶ Madic C., Hobart D. E., Begun G. M. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 1494.

⁷ Clark D. L., Hobart D. E., Neu M. P. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 25.

⁸ Aupiais J., Alexandre J-C., Sicre R., Siberchicot B., Topin S., Moisy P., Dacheux N. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, 216.

⁹ Pokrovsky O. S., Choppin G. R. *Radiochim. Acta* **1997**, *79*, 167.

¹⁰ Mullen L., Gong C., Czerwinski K. *J. Radioanal. and Nuclear Chemistry* **2007**, *273*, 683.

-
- ¹¹ Grison S. , Kereselidze D. , Cohen D. , Gloaguen C., Elie C., Lestaevel P. , Legendre A. , Manens L., Habchi B. , Amine Benadjaoud M., Tarlet G., Milliat F. , Martin J.-C. , Lobaccaro J.-M., Souidi M. *Inter. J. Rad. Biol.* **2019**, *95*, 737.
- ¹² Garai A., Delangle P. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110936.
- ¹³ Baker H. M., Baker C. J., Smith C. A., Baker E. N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 692.
- ¹⁴ Sarthou M., Revel B., Villiers F., Alban C., Bonnot T., Gigarel O., Boisson A-M., Ravanel S., Bourguignon J. *Metallomics* **2020**, sous presse
- ¹⁵ Duffield J.R., Taylor D.M., Proctor S.A. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **1986** *12*, 483.
- ¹⁶ Basset C., Averseng O., Ferron P-J., Richaud N., Hagège A., Pible O., Vidaud C., *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 645.
- ¹⁷ Jeanson A., Ferrand M., Funke H., Henning C., Moisy P., Solari P-L., Vidaud C., Den Auwer C. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1378.
- ¹⁸ Brulfert F., Aupiais J. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 9994.
- ¹⁹ Jensen M.P., Gormen-Lewis D., Aryal B., Paunesku T., Vogt S., Rickert P.G., Seifert S, Lai B., Woloschak G.E., Soderholm L. *Nature Chem. Biol.* **2011**, *7*, 560.
- ²⁰ Huynh T.N.S., Bourgeois D., Basset C., Vidaud C., Hagège A. *Electrophoresis*, **2015**, *36*, 1374.
- ²¹ Aryal B. P., Paunesku T., Woloschak G. E., He C., Jensen M. P. *J. Proteomics* **2012** *75*, 1505.
- ²² Dedieu A., Berenguer F., Basset C., Prat O., Quemeneur E., Pible O., Vidaud C. *J Chromatogr A* **2009**, *1216*, 5365.
- ²³ Sauge-Merle S., Brulfert F., Pardoux R., Solari, P.L., Lemaire D., Safi S., Guilbaud P., Simoni E., Merroun M.L., Berthomieu C., *Chemistry Eur. J.* **2017**, *23*, 15505.
- ²⁴ Brulfert F., Safi S., Jeanson A., Foerstendorf H., Weiss S., Berthomieu C., Sauge-Merle S., Simoni E. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *172*, 46.
- ²⁵ Sauge-Merle S., Lemaire D., Evans R.W., Berthomieu C., Aupiais J. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 1389.
- ²⁶ Creff G., Safi S., Roques J., Michel H., Jeanson A., Solari P.L., Basset C., Simoni E., Vidaud C., Den Auwer C. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 29.
- ²⁷ Qi L., Basset C., Averseng O., Quemeneur E., Hagege A., Vidaud C. *Metallomics* **2014**, *6*, 166.
- ²⁸ Kumar S., Creff G., Hennig C., Rossberg A., Steudtner R., Raff J., Vidaud C., Oberhaensli F. R., Dechraoui Bottein M-Y., Den Auwer C. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 12332.
- ²⁹ Klänning E., Christensen B., Sørensen E., Vorup-Jensen T., Jensen J K. *Bone*, **2014**, *66*, 95.
- ³⁰ Paredes E., Avazeri E., Malard V., Vidaud C., Reiller P.E., Ortega R., Nonell A., Isnard H., Chartier F., Bresson C. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 17163.
- ³¹ Paredes E., Avazeri E., Malard V., Vidaud C., Reiller P.E., Ortega R., Nonell A., Isnard H., Chartier F., Bresson *P Natl Acad Sci* **2016**, *113*, 14007.
- ³² Vidaud C., Robert M., Paredes E., Ortega R. Avazeri E., Jing, L. Guignonis J-M., Bresson C., Malard V. *Arch Toxicol.* **2019**, *93*, 2141.

-
- ³³ Vidaud C., Bourgeois D., Meyer D., *Chem. Res. Tox.* **2012**, 25, 1161.
- ³⁴ Pierrefite-Carle V., Santucci-Darmanin S., Breuil V., Gritsaenko T., Vidaud C., Creff G., Solari P.L., Pagnotta S., Al-Sahlanee R., Den Auwer C., Carle G.F. *Arch Toxicol.* **2017**, 91, 1903.
- ³⁵ Hurault L., Creff G., Hagège A., Santucci-Darmanin S., Pagnotta S., Farlay D., Den Auwer C., Pierrefite-Carle V., Carle G.F. *Toxicol Sci.* **2019**, 170, 199.
- ³⁶ Gritsaenko T., Pierrefite-Carle V., Lorivel T., Breuil V., Carle G.F., Santucci-Darmanin S. *Biochim Biophys Acta Gen. Subj.* **2017**, 1861, 715.
- ³⁷ Miccoli L., Menetrier F., Laroche P., Gremy O. *Radiat. Res.* **2019**, 192, 630.
- ³⁸ Lahrouch F., Siberchicot B., Fèvre, J., Leost L., Aupiais J., Solari P.L., Den Auwer C., Di Giorgio, C. *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 128.
- ³⁹ Duffield J.R., Taylor D.M., Proctor S.A., *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **1986**, 12, 483.