

J. Aupiais
CEA – DAM
Île-de-France

S. Sauge-Merle, D. Lemaire,
C. Berthomieu
CEA – Cadarache

R. W. Evans
Brunel University,
Royaume-Uni

INTERACTION DU PLUTONIUM AVEC UNE PROTÉINE DU SANG, LA TRANSFERRINE

La transferrine humaine est responsable du transport du fer dans l'organisme. Elle possède aussi une très grande affinité pour le plutonium tétravalent. La mesure de cette affinité, appelée constante de complexation, n'avait pas été revue depuis une détermination unique en 1991. À l'époque, il avait été conclu que l'affinité du plutonium était identique à celle du fer. Mais cette première détermination devait être validée en raison de l'adoption de plusieurs hypothèses difficiles à vérifier. Pour cela, le couplage entre une électrophorèse capillaire et un spectromètre de masse (ICPMS) a été utilisé au CEA – DAM Île-de-France. Il apparaît de façon univoque que la constante est en réalité 10 000 fois supérieure à celle du fer.

Le plutonium est un des actinides les plus radiotoxiques qui soient. Bien qu'il ne possède aucune fonction physiologique connue, il peut être retenu par l'organisme et induire des effets nocifs. En particulier, il s'accumule dans les os et le foie avant d'être partiellement excrété par les urines et les fèces. Il est aussi transporté dans le sang par une protéine abondante : la transferrine sérique. La transferrine sérique (Tf) est une glycoprotéine caractérisée par une masse de 80 000 daltons et constituée d'une unique chaîne polypeptidique de 679 acides aminés repliée en deux lobes, dits lobe N et lobe C. Ils sont chacun constitués de deux domaines distincts capables de se rapprocher et de s'éloigner l'un de l'autre. Chaque lobe de la transferrine possède un site de complexation du fer (III), situé à la charnière entre les deux domaines du lobe. La complexation du fer par la transferrine est particulière : elle requiert obligatoirement un anion additionnel appelé anion synergique. Cet anion est le bicarbonate HCO_3^- , il permet aux atomes de fer d'entrer dans les deux cavités de la protéine avec une meilleure efficacité (d'autres anions peuvent jouer ce rôle comme l'anion nitrilotriacétate NTA). En l'absence de fer, la transferrine a ses deux lobes ouverts. En présence de fer, les deux lobes se rapprochent alors l'un de l'autre. Le complexe Fe_2Tf ainsi formé présente donc une configuration dite fermée. Les

cellules cibles du fer (III) possèdent des récepteurs membranaires spécifiques (TR) du complexe Fe_2Tf qui, à pH physiologique, reconnaissent uniquement la forme complètement fermée de la protéine. Le complexe $\text{TR-Fe}_2\text{Tf}$ ainsi formé est internalisé dans la cellule par un phénomène d'endocytose. Après relargage du fer, la transferrine regagne le sérum par un phénomène d'exocytose. La durée d'un cycle est d'environ 4 minutes. La concentration de la transferrine dans le sérum ($30 \mu\text{M}$) est en excès par rapport au fer, de sorte que seul 30% de la protéine est saturé en fer. La molécule de transferrine a une durée de vie moyenne de huit jours et peut participer à 100 cycles environ.

Bien que la fonction physiologique principale de la transferrine soit de véhiculer le fer vers les cellules, cette dernière possède hélas des affinités pour d'autres métaux, plus ou moins toxiques, comme le chrome, le cuivre, le titane, le vanadium, le ruthénium, l'aluminium, le gallium, les lanthanides, les actinides, etc.

Des résultats récents ont montré que le plutonium utilisait le même mécanisme d'internalisation du fer dans une configuration où un atome de plutonium est localisé sur le lobe C et un atome de fer sur le lobe N **1**. Cette configuration particulière est topologiquement très proche du complexe Fe_2Tf . Néanmoins, l'internalisation du plutonium est conditionnée

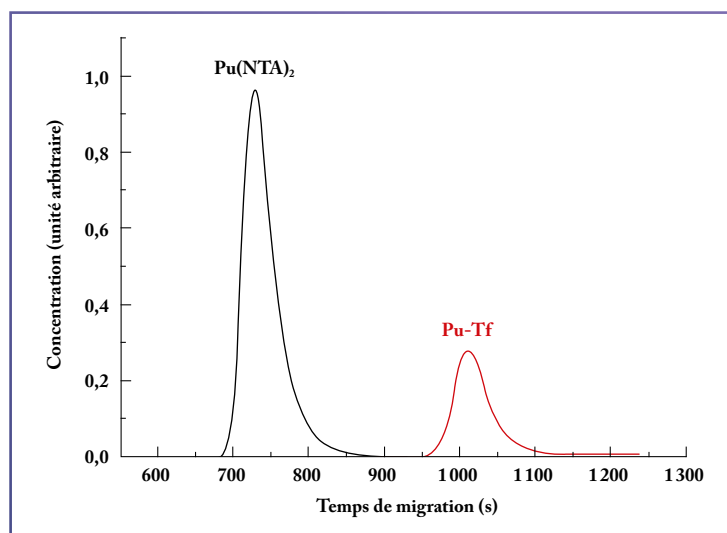


Figure 1

➔ Électrophorogrammes d'espèces de plutonium. L'acide nitrilotriacétique (NTA) est utilisé ici pour protéger Pu^{4+} de l'hydrolyse. En augmentant la concentration en transferrine (Tf), la surface des deux pics va évoluer (augmentation de la surface du pic Pu-Tf et diminution de la surface du pic $\text{Pu}(\text{NTA})_2$). Cette variation des surfaces des pics permet de calculer la constante de complexation entre le plutonium et la transferrine.

par la complexation effective et préalable par la transferrine et dépend de la présence d'autres métaux qui peuvent entrer en compétition. Or, nous avons remarqué que la force de la constante de complexation entre le plutonium et la transferrine, déterminée par L. Yule en 1991 [2] et utilisée par plusieurs auteurs pour fabriquer des complexes Pu-Tf, n'avait jamais été validée par d'autres techniques.

Pour la première fois, une technique couplant l'électrophorèse capillaire (*Capillary electrophoresis* ou CE) avec un spectromètre de masse (ICPMS, pour *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) a été utilisée pour déterminer la constante de complexation entre la transferrine et le plutonium. La technique CE-ICPMS est une technique à très haute sensibilité qui préserve les espèces chimiques (spéciation) et permet de quantifier l'affinité d'un ligand pour un métal. Par exemple, l'électrophorogramme de la figure 1 montre que l'électrophorèse capillaire est capable de séparer deux espèces chimiques distinctes contenant toutes les deux un atome de plutonium. Cette séparation physique des espèces est rendue possible, car les complexes formés sont assez stables pour ne pas se dissocier pendant la séparation électrophorétique.

En réalisant les expérimentations à un pH proche du pH physiologique, la valeur de cette constante a pu être déterminée. Contrairement à ce qu'amenait à penser l'unique valeur disponible depuis 1991, le CEA – DAM Île-de-France a montré de manière univoque que, à pH physiologique, le plutonium n'est pas identique au fer, mais que la transferrine a 10 000 fois plus d'affinité pour le plutonium que pour le fer

(figure 2). Cette différence peut paraître grande mais elle traduit simplement les évolutions technologiques qui ont permis de lever les difficultés rencontrées en 1991. Ces résultats ont fait l'objet de la page de couverture dans le journal spécialisé *Dalton Transactions* [3].

La précision de la valeur obtenue permet maintenant d'étudier de nouvelles protéines et de comparer leurs affinités relatives. D'ores et déjà engagées avec des protéines comme la calmoduline et la fétuine, ces études permettront de comprendre la physiologie du plutonium.

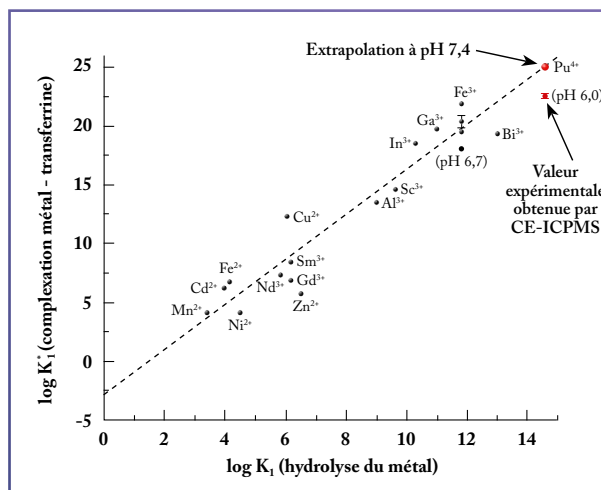


Figure 2

➔ Corrélation linéaire entre la constante de complexation K_1 métal-transferrine à pH physiologique (pH 7,4) et la constante de première hydrolyse du métal. La corrélation linéaire a été observée par Sun *et al.* avec un nombre important de métaux [4]. Cette corrélation permet de prédire que la constante de complexation plutonium-transferrine, à pH physiologique, sera $\log K_1 = 25,0$, soit environ 10 000 fois supérieure à celle du fer ($\log K_1 = 20,4$). En raison des difficultés à stabiliser le plutonium contre l'hydrolyse, la valeur expérimentale par CE-ICPMS a été obtenue pour Pu-Tf à pH 6,0. Elle est cohérente avec la valeur extrapolée, car il est connu que la constante K_1 augmente avec le pH, comme on peut le constater sur cette figure pour le fer à pH 6,7 et 7,4.

RÉFÉRENCES

- 1 M. P. JENSEN *et al.*, "An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium", *Nat. Chem. Biol.*, **7**, p. 560-565 (2011).
- 2 L. YULE, *A comparison of the binding of plutonium and iron to transferrin and citrate*, Thèse de doctorat soutenue le 29 octobre 1991, University of Wales, Cardiff.
- 3 S. SAUGE-MERLE *et al.*, "Revisiting binding of plutonium to transferrin by CE-ICP-MS", *Dalton Trans.*, **46**, p. 1389-1396 (2017).
- 4 H. SUN, H. LI, P. J. SADLER, "Transferrin as a metal ion mediator", *Chem. Rev.*, **99**, p. 2817-2842 (1999).