



HAL
open science

Etude des générateurs in vivo Pb-212/Bi-212 et U-230/Th-226 pour la radiothérapie alpha ciblée

Alicia Le Du

► **To cite this version:**

Alicia Le Du. Etude des générateurs in vivo Pb-212/Bi-212 et U-230/Th-226 pour la radiothérapie alpha ciblée. Radiochimie. Université de Nantes, 2011. Français. NNT : . tel-00779481

HAL Id: tel-00779481

<https://theses.hal.science/tel-00779481>

Submitted on 22 Jan 2013

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.

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE 3 M.P.L
MATIERE, MOLECULE, MATERIAUX EN PAYS DE LOIRE

N° attribué par la bibliothèque

Année 2011

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Etude des générateurs *in vivo* $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ et
 $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ pour la radiothérapie α ciblée

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Chimie
Spécialité : Radiochimie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Alicia LE DU

Le 28 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Président M. BOULER Jean-Michel, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs M. ANSOBORLO Eric, Expert international, CEA-Marcoule
Mme. BILLARD Isabelle, Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Examineur M. MORGENSTERN Alfred, Senior Scientist, ITU Karlsruhe
Membre invité Mme. MOUGIN-DEGRAEF Marie, Maître de conférences, Université de Nantes
Mme. HUCLIER Sandrine, Maître de conférences, Université de Nantes
M. MONTAVON Gilles, Chargé de recherche, CNRS

Directeur de thèse : Gilles MONTAVON

Encadrante : Sandrine HUCLIER

Remerciements

Ce manuscrit de thèse n'est pas uniquement le fruit de mon travail, il est celui de l'ensemble des personnes qui sont intervenues avec leurs compétences et à divers degrés durant ces trois années. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire SUBATECH, dirigé par le Professeur Bernd Grambow, je le remercie de m'avoir donné l'opportunité d'y mener mes travaux de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le Docteur Gilles Montavon. Bien que je ne me sois jamais montrée très loquace, j'aimerais qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude, ma considération et de ma sympathie à son égard. C'est toujours avec beaucoup de simplicité, d'enthousiasme et d'optimisme qu'il a supervisé ces travaux.

Je tiens à remercier les Docteurs Eric Ansoborlo et Isabelle Billard d'avoir accepté la charge de rapporteurs, et de m'avoir apporté des conseils pour l'amélioration de ce manuscrit. Je remercie également le Professeur Jean-Michel Bouler et le Docteur Alfred Morgenstern d'avoir fait partie de mon jury en tant qu'examineurs.

Je tiens particulièrement à remercier, pour la synthèse si précieuse des liposomes, le Docteur Marie Mougin-Degraef et les personnes avec qui elle a travaillées, Eliot Botosoa et Aurore Raucher. Merci d'avoir consacré de votre temps à la synthèse de l'élément essentiel à mon travail. Encore un grand merci à toi, Marie, d'avoir répondu à toutes les questions que j'ai pu me poser sur les liposomes.

Tous les résultats présentés dans ce manuscrit ne seraient pas ce qu'ils sont sans l'aide précieuse d'un grand nombre de personnes. Merci à :

- Sandrine Huclier pour son aide et son encadrement sur l'utilisation de l'AF4
- Fabien Pottier pour son aide en HPLC et sa bonne humeur permanente ;

- Katy Perrigaud et Shaibia Azdani pour les analyses ICP-MS ;
- Guy Blain et Ronald Jahke pour la radioprotection et la préparation des sources ;
- Céline Bailly et Myriam Le Ferrec pour toutes ses petites choses au laboratoire ;
- Nicolas Bessaguet, pour son aide sur le spectromètre gamma et l'installation des bouteilles de gaz.

Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans la présence de certaines personnes :

A mes collègues de bureau :

- Ludivine, merci pour ta bonne humeur permanente, et les nombreuses sorties que tu as organisées. Bon courage pour ta fin de thèse, le plus dur reste à venir pour toi.

- Aux anciens thésards, Jim, Hicham et Delphine, merci tout simplement pour votre présence, au labo ou ailleurs. Bonne chance à vous pour la suite.

- Aux nouveaux thésards, Rachid et Gokhan, merci d'avoir su égayer ces derniers mois, par vos petites chamailleries et votre bonne humeur.

Aux autres :

- Andréa. Merci d'avoir été l'épaule sur laquelle je me suis appuyée durant ces trois années. Merci d'avoir su, de si nombreuses fois, me remonter le moral quand rien n'allait. Merci également pour ces nombreuses discussions que nous avons eues et qui m'ont si souvent éclairée.

- Audrey. Merci d'avoir été là, et pour toutes ces confidences partagées. Tu m'as aidée à me sentir moins seule en galère dans ma thèse. Tu as choisi, il y a peu, une nouvelle voie, et je te félicite pour le courage que tu as eu de tout arrêter.

- Et enfin, merci à tous ceux qui, au travers d'un sourire, d'un bonjour, ont contribué à rendre certaines journées moins difficiles.

Mes pensées vont, ensuite, tout naturellement à ma famille et amis, qui en dehors du labo à un moment ou un autre ont su m'apporter soutien, rires et bons moments. Merci d'avoir été là.

Enfin, merci à celui sans qui cette thèse n'aurait probablement pas abouti. Par l'équilibre, le soutien et l'amour que tu m'as apportés, tu as su me faire aller de l'avant et me donner la motivation nécessaire pour finir. Merci Matthieu.

Table des matières

GLOSSAIRE.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	11
PREMIERE PARTIE : LA MEDECINE NUCLEAIRE.....	17
<i>I. Les radioisotopes en médecine nucléaire</i>	<i>20</i>
1. Les types de rayonnements	20
1.1. Rayonnement α	20
1.2. Rayonnements β	21
1.3. Rayonnements γ	21
1.4. Electrons Auger.....	21
2. Critères de sélection des radioisotopes.....	21
2.1. Demi-vie	22
2.2 Radiotoxicité.....	22
2.3. Pureté	23
2.4. Radioactivité spécifique.....	23
2.5. Disponibilité et coût de production	23
3. Les radioisotopes utilisés en imagerie	24
4. Les radioisotopes utilisés en thérapie.....	26
5. Propriété et marquage des radiopharmaceutiques.....	27
<i>II. La radiothérapie alpha ciblée</i>	<i>29</i>
1. Présentation de la radiothérapie alpha ciblée	29
2. Les radioisotopes utilisés	30
3. Les générateurs <i>in vivo</i>	32
DEUXIEME PARTIE : GENERALITES.....	35
<i>I. Les liposomes</i>	<i>37</i>
1. Définitions	37

2. Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques.....	40
2.1. Rotation des chaînes hydrophobes et fluidité membranaire.....	40
2.2. Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques.....	42
2.3. Stabilité des liposomes.....	42
2.4. Perméabilité des membranes lipidiques.....	44
3. Préparation des liposomes.....	45
3.1. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique.....	46
3.2. Méthodes de réduction de taille des vésicules.....	46
4. Intérêt des liposomes en radiothérapie.....	47
<i>II. Composition du sérum.....</i>	<i>47</i>
1. Généralités.....	47
2. Les protéines du sérum humain.....	49
<i>III. Mise au point de modèles.....</i>	<i>51</i>
1. Utilisation du logiciel PHREEQC.....	51
2. Le modèle de Sofou et al.....	52
<i>IV. L'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation.....</i>	<i>53</i>
TROISIEME PARTIE : LES GENERATEURS <i>IN VIVO</i> $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ ET $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET RESULTATS.....	57
CHAPITRE 1 : LE GENERATEUR PLOMB-212 / BISMUTH-212.....	59
<i>I. Etude bibliographique.....</i>	<i>59</i>
1. Le bismuth-212 en médecine nucléaire.....	59
1.1 Production du bismuth-212.....	60
1.2 Potentiel thérapeutique du ^{212}Bi et radiomarquage.....	61
2. Le générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$	63
<i>II. Approche par chélation.....</i>	<i>66</i>
1. Etat de l'art.....	66
2. Complexation du Bi par la protéine IgG marquée au CHX-A-DTPA dans le sérum humain.....	68
3. Article 1.....	69
<i>III. Approche par encapsulation.....</i>	<i>90</i>
1. Objectifs de cette étude.....	90
2. Encapsulation du générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ dans les liposomes.....	91
3. Article 2.....	92

4. Etude de stabilité ; application d'un appareil d'Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation couplé à un détecteur γ	108
5. Article 3.....	109
CHAPITRE 2 : LE GENERATEUR URANIUM-230 / THORIUM-226.....	129
<i>I. Etude bibliographique</i>	<i>130</i>
1. L' ^{230}U et le ^{226}Th en médecine nucléaire.....	130
1.1. Généralité.....	130
1.2. Production de l' ^{230}U et du ^{226}Th	132
2. Approches de vectorisation.....	133
<i>II. Evaluation du DTPA comme agent complexant pour le ^{226}Th</i>	<i>135</i>
1. Objectif.....	135
2. Article 4.....	136
CONCLUSION GENERALE.....	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	165

Glossaire

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF4	Asymmetric Flow Field Flow Fractionation
BAL	British Anti Lewisite / dimercaprol
BSA	Bovine Serum Albumine
CHX-A-DTPA	N-[(R)-2-Amino-3-(p-aminophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2-diamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid
DCP	acide 1,10-Phenantroline-2,9-DiCarboxylique
DLS	Dynamic Light Scattering
DOTA	1,4,7,10-tetraazacycloDOdecane-N,N',N'',N'''-TétraAcétique acide
DSPC	1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine
DSPE-DTPA	1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanol amine-Diethylene Triamine PentaAcetic acid
DTPA	Diéthylène Triamine PentaAcétique acide
DUS	Difference Ultraviolet Spectroscopy
EDTA	EthylenDiamine TetraAcetic acid
FDG	Fluoro-Déoxy-D-Glucose
FFF	Fractionnement par Flux Force
GUV	Giant Unilamellar Vesicles
HEPES	N-(2-HydroxyEthyl)Piperazine-N'-2-EthaneSulfonic acid
HOPO	2-HydrOxyPyridine-N-Oxide
HPAEC	High-Pressure-Anion Exchange Chromatography
HSA	Human Serum Albumine
HSTf	Human Serum Transferrine
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy
IgG	Immunoglobuline
ITLC	Ion Thin Layer Chromatography
Llnl	Lawrence Livermore National Laboratory
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MALS	MultiAngle Light Scattering
MLV	Multilamellar Large Vesicles
NTA	acide NitriloTriAcétique
PEG	PolyEthylène Glycol
RI	Refractive Index
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire

SEC	Size-Exclusion Chromatography
SLRT	Spectroscopie par Luminescence Résolue en Temps
SRIM	Stopping and Range of Ions in Matter
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TAT	Targeted Alpha Therapy
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TEP	Tomographie par Emission de Position
TOC	Total Organic Carbon
TRLFS	Time-Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy

Introduction générale

Depuis la découverte de la radioactivité par Henri Becquerel en 1896, puis de la radioactivité artificielle par Frédéric et Irène Joliot-Curie en 1933 (prix Nobel de chimie en 1935), l'utilisation des radioisotopes n'a cessé de se développer dans de nombreux secteurs d'activité tels que l'industrie civile et militaire, et la médecine. En industrie, les isotopes radioactifs sont utilisés pour la production d'électricité et pour l'étude des matériaux ; en géoscience, ils sont utilisés comme traceurs des processus géologiques ; dans l'industrie alimentaire, l'irradiation des aliments est courante afin d'améliorer leur conservation. Toutefois, c'est le secteur médical qui est le domaine le plus actif. Les composés radioactifs sont utilisés aussi bien pour un usage diagnostique que thérapeutique.

La médecine nucléaire est la spécialité médicale qui consiste en l'injection de molécules contenant un isotope radioactif [1]. En fonction du type d'émission radioactive, les différents isotopes peuvent être utilisés en imagerie (γ et β^+) pour le diagnostic de troubles pathologiques, ou en thérapie (β^- , α et électrons Auger). Depuis quelques années, les efforts se tournent vers la recherche de nouveaux radiopharmaceutiques pour la thérapie. La radiothérapie interne ciblée consiste à vectoriser un radioisotope sur les cellules tumorales afin de les détruire. Les protocoles actuels ont recours à des particules β^- . Cependant, depuis quelques années, de nouvelles approches de radiothérapie utilisent des radioisotopes émetteurs de particules α [2,3]. Ces isotopes sont particulièrement intéressants pour la radiothérapie interne, puisqu'ils présentent l'intérêt particulier de déposer, sur un trajet de quelques dizaines de μm , une très grande quantité d'énergie.

Ce travail de thèse porte sur l'étude des deux émetteurs de particules α , potentiellement intéressants pour la radiothérapie alpha ciblée, le ^{212}Bi et le ^{226}Th . Compte tenu des propriétés qu'ils présentent, ces deux radioisotopes peuvent être utilisés sous la forme de générateurs *in*

vivo. Le principe consiste à coupler sur un vecteur, non pas le radioisotope d'intérêt, mais le radioisotope père. Après injection de ce vecteur, le radioisotope d'intérêt est directement généré *in vivo* par décroissance du radionucléide père.

L'utilisation de générateurs *in vivo*, en radiothérapie interne ciblée, implique que le couplage du radioisotope fils sur le vecteur soit similaire à celui du radioisotope père, afin de limiter l'irradiation des tissus sains. Les approches par chélation sont les méthodes les plus couramment employées pour la vectorisation des générateurs *in vivo*. Le principe consiste à fixer le radioisotope père sur le vecteur, par le biais d'un agent chélatant. Dans une situation idéale, le radioisotope fils, produit *in vivo*, est immédiatement recomplexé par ce même chélate. Cependant, dans de nombreux cas, du fait de l'énergie imputée au radioisotope fils lors de la décroissance, un relâchement est observé. Pour limiter celui-ci, d'autres systèmes de vectorisation peuvent être envisagés :

(1) un deuxième ligand peut être rajouté à la surface du vecteur pour recomplexer le radioisotope fils,

(2) le radioisotope père peut être encapsulé dans des vésicules artificielles, type liposomes. La taille de ces derniers devra être suffisamment importante pour retenir le radioisotope fils.

Au cours de ce travail de thèse, deux générateurs *in vivo* ont été étudiés, les générateurs $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$. Le choix du mode de vectorisation le plus adapté pour ces générateurs est abordé tout au long de ce mémoire.

Ce mémoire s'articule en trois parties. Afin de replacer ce travail dans son contexte, une étude bibliographique constitue la première partie. Nous y aborderons notamment le principe de la médecine nucléaire avec la préparation des radiopharmaceutiques, les radioisotopes utilisés, pour finir par une présentation détaillée de la radiothérapie alpha ciblée, ainsi que des générateurs *in vivo*.

La deuxième partie de ce mémoire rappellera quelques généralités importantes pour la compréhension de ce travail, avec notamment la composition du sérum humain et la présentation des modèles théoriques utilisés pour exploiter les résultats expérimentaux obtenus.

Les générateurs *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$, ainsi que les résultats obtenus au cours de ce travail, seront présentés en détail dans la troisième partie de ce mémoire. La faisabilité des deux approches de vectorisation, par chélation ou par encapsulation, sera développée pour chaque générateur. Une double approche, expérimentale et théorique, a été

utilisée afin d'évaluer l'approche de vectorisation la plus favorable à chacun de ces deux générateurs. Des études de stabilité en milieu simple (NaCl) ont dans un premier temps été réalisées, avant de passer à des tests *in vitro* dans le sérum humain. Cette partie sera notamment constituée des quatre publications scientifiques qui ont été rédigées au cours de cette thèse.

Première partie : La médecine nucléaire

La médecine nucléaire est la spécialité médicale qui consiste en l'injection de molécules contenant un isotope radioactif [1]. Elle utilise les propriétés de certains isotopes radioactifs, associés ou non à une molécule porteuse, pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge d'un nombre important et varié de pathologies, ainsi que pour le traitement par radiothérapie de certaines d'entre elles.

L'isotope radioactif est appelé le marqueur. Les radioisotopes peuvent être utilisés seuls lorsqu'ils présentent une activité intrinsèque pour la cible biologique (comme dans le cas de l'iode pour la thyroïde), ou bien couplés à un ion ou à une molécule biologiquement active [4-6]. La molécule à laquelle est éventuellement associé le radioisotope est appelée le vecteur ; l'ensemble forme le radiopharmaceutique ou radiotraceur. Ces molécules radiomarquées sont considérées comme des médicaments depuis 1992, et sont utilisées depuis plusieurs décennies. Administrés au patient, ces radiopharmaceutiques se concentrent sélectivement dans certains organes ou lésions dont ils permettent d'évaluer le métabolisme et/ou le fonctionnement normal ou pathologique. En fonction du type d'émission radioactive, les différents isotopes peuvent être utilisés en imagerie (γ et β^+) pour le diagnostic de troubles pathologiques, ou en thérapie (β^- , α et électrons Auger).

Leur spécificité en tant que médicament repose sur plusieurs propriétés :

- ils sont principalement utilisés à des fins diagnostiques mais également à des fins thérapeutiques,
- ils sont souvent administrés en petites quantités,
- la durée d'utilisation du médicament peut être très courte (quelques minutes à quelques jours) en raison de la période physique du radioisotope et/ou de la période biologique du médicament,

- ils se présentent sous la forme de sources non scellées, destinées à être administrées par voie orale ou veineuse, avec des activités variables selon l'utilisation, l'âge et le poids du patient.

La médecine nucléaire utilise une large gamme de radiopharmaceutiques de structures chimiques très différentes : des ions, des complexes métalliques, des traceurs biologiques, des protéines ou des colloïdes. Excepté pour les isotopes utilisés seuls, l'étape de marquage est l'étape prépondérante de la préparation du radiopharmaceutique. Différentes méthodes de marquage peuvent être employées : la méthode directe où l'isotope est fixé directement au vecteur, ou la méthode indirecte en utilisant un synthon bifonctionnel capable de fixer l'isotope à une extrémité et la molécule biologiquement active à l'autre.

I. Les radioisotopes en médecine nucléaire

Dans leur grande majorité, les radioisotopes sont produits artificiellement. Les moyens techniques actuels (réacteurs, cyclotrons) ont permis d'en créer environ un millier pour l'ensemble des éléments connus. Ces radionucléides sont générés en soumettant les isotopes stables au bombardement de particules d'énergie élevée, soit dans des accélérateurs, soit dans des réacteurs nucléaires. Les radionucléides se désintègrent ensuite, directement ou par cascade, en un nouvel élément stable. Cette désintégration s'accompagne alors de l'émission d'un ou plusieurs rayonnements (α , β , γ ou électron Auger). Les applications biomédicales de ces radioisotopes reposent sur les propriétés de ces rayonnements et, en particulier, sur les propriétés de ces rayonnements et leur interaction avec la matière.

1. Les types de rayonnements

1.1. Rayonnement α

Les rayonnements α sont constitués par des noyaux d'hélium comportant deux protons et deux neutrons (${}^4_2\text{He}^{2+}$). C'est un rayonnement très ionisant, c'est-à-dire qu'il possède un TEL (transfert d'énergie linéique) très élevé. L'énergie délivrée est comprise entre 4 et 10 MeV. Ils sont absorbés par de faibles épaisseurs de matière et leurs parcours dans l'air varient de quelques millimètres à quelques centimètres seulement.

1.2. Rayonnements β

Les rayonnements β sont constitués par des électrons (β^-) et par des positons (β^+), utilisés en imagerie. Les positons sont uniquement émis par des isotopes artificiels, généralement assez légers (^{11}C , ^{13}N , ^{18}F ,...). Du fait de leur faible masse, de leur charge limitée et de leur vitesse très élevée, la pénétration des électrons dans la matière est plus importante que celle des particules α . Ils peuvent traverser quelques dizaines de centimètres voire quelques mètres dans l'air. Cependant les électrons sont assez rapidement absorbés par la matière où ils donnent naissance à des rayons X ; la plus grande partie de leur énergie se dissipe en chaleur. Quant aux positons, ceux-ci s'annihilent avec un électron avec dégagement de deux photons γ de 511 keV s'éloignant selon la même trajectoire linéaire mais dans des directions opposées. C'est le principe mis à profit par la TEP (tomographie par émission de positon).

1.3. Rayonnements γ

Les rayonnements γ sont constitués par des ondes électromagnétiques de courte longueur d'onde et d'énergie très variable (2 keV à 2,76 MeV). Emis par la plupart des radionucléides artificiels, ils accompagnent souvent les rayonnements α ou β . Très pénétrants, ils peuvent traverser des épaisseurs importantes de matière.

1.4. Electrons Auger

Les électrons Auger correspondent à des électrons émis par le cortège électronique pour se désexciter. Ils sont d'énergie moindre que les électrons β^- et que les particules α (< 10 keV) et ont donc un pouvoir de pénétration inférieur (< 1 μm). Les électrons Auger ne sont donc efficaces en thérapie que s'ils peuvent pénétrer la membrane du noyau de la cellule cible.

2. Critères de sélection des radioisotopes

Le choix du type de radiation, donc du radioisotope à utiliser, dépend de l'application que l'on souhaite pour le radiopharmaceutique. Pour le diagnostic, le radioisotope devra

émettre des rayonnements γ pénétrants et peu ionisants pour limiter les risques de dosimétrie élevée tout en étant détectables par voie externe. Au contraire, pour la thérapie, il est nécessaire d'avoir des rayonnements ionisants, donc β^- , α ou électrons Auger. En effet, c'est de la nature et de l'intensité de ce rayonnement que dépendra la destruction de la cellule. De plus, plusieurs facteurs sont à prendre en considération :

- la demi-vie (physique et effective),
- la radiotoxicité,
- la pureté,
- l'activité spécifique,
- la disponibilité et le coût de production.

2.1. Demi-vie

La période du radioisotope doit être adaptée à l'exploration pratiquée : suffisamment longue pour permettre un taux de fixation optimal au niveau de la cible, et suffisamment brève pour limiter l'exposition du patient. Deux facteurs entrent en compte : la demi-vie biologique (temps nécessaire, pour éliminer de l'organisme, la moitié de la quantité du radiopharmaceutique injecté) et la demi-vie physique ($t_{1/2}$) pour donner la demi-vie effective t_{eff} selon la formule suivante :

$$t_{eff} = \frac{1}{T_{eff}} = \frac{1}{T_{bio}} + \frac{1}{T_{ph}}$$

Les radioisotopes utilisés en thérapie ont, en général, une demi-vie plus longue que ceux utilisés en imagerie.

2.2 Radiotoxicité

La radiotoxicité d'un radioisotope mesure sa capacité à générer des dommages cellulaires par rayonnement. Elle dépend de la nature des particules émises, de leur énergie, du taux de fixation et de la cinétique d'élimination de ce radioisotope.

Les particules α et β sont absorbées très rapidement par la matière et délivrent de ce fait une irradiation locale élevée. Très radiotoxiques, elles peuvent être utilisées en thérapie interne.

2.3. Pureté

La notion de pureté comprend la pureté radionucléidique (rapport de l'activité de l'isotope considéré sur l'activité totale), la pureté chimique (contaminants organiques ou minéraux) et la pureté radiochimique (rapport du radionucléide considéré sous la forme chimique indiquée (degré d'oxydation) sur la radioactivité totale de ce même isotope présent dans l'échantillon).

2.4. Radioactivité spécifique

Selon son mode de production, le radioisotope peut être obtenu à l'état pur (sans entraîneur) ou sous forme d'un mélange d'isotopes comportant notamment des isotopes stables. L'activité spécifique mesure la radioactivité du radionucléide dans le mélange, et est exprimé en becquerels par mole (ou gramme) du mélange isotopique obtenu.

2.5. Disponibilité et coût de production

On peut distinguer quatre grands modes de production des radioisotopes :

- le bombardement neutronique (réacteurs nucléaires),
- la séparation isotopique des produits de fission de l'uranium,
- le bombardement par des particules chargées (accélérateurs),
- la réalisation de générateurs isotopiques.

La disponibilité du radionucléide dépend du mode de production. Le plus souvent, du fait de leur faible durée de vie, la production des radioisotopes doit se faire à proximité des centres de production (réacteur, accélérateur), ce qui est un facteur limitant, et a une influence sur le coût d'obtention. Le mode de production le plus adapté pour la préparation de radioisotopes pour la médecine nucléaire est le générateur. Un générateur de radioisotopes est constitué par un couple nucléaire père-fils ; la séparation de l'élément fils de son précurseur est le plus souvent réalisée sur colonne chromatographique. L'utilisation de tels systèmes permet d'une part d'obtenir un haut degré de pureté radionucléidique, et d'autre part, de contourner les problèmes logistiques liés à la production et à l'utilisation de radioisotopes à vie courte.

La sélection d'un radioisotope résulte d'un compromis entre ses caractéristiques nucléaires, sa disponibilité et son coût de revient qui découle de sa polyvalence d'utilisation. La figure 1 montre les principaux éléments de la classification périodique ayant un potentiel intérêt pour la médecine nucléaire.

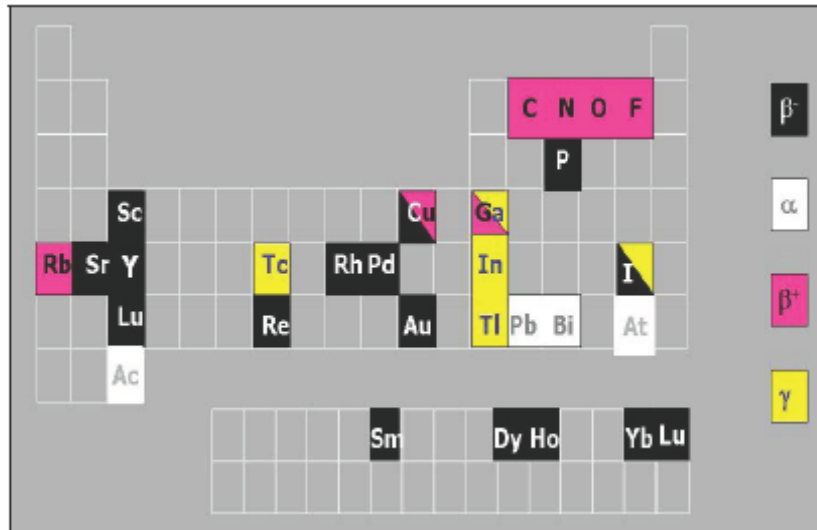


Figure 1 : Principaux éléments de la classification périodique dont les isotopes sont utilisés en médecine nucléaire

3. Les radioisotopes utilisés en imagerie

L'imagerie consiste à administrer un traceur radioactif au patient permettant sa détection externe. Les conditions pour qu'un radioisotope soit utilisé en diagnostic *in vivo* sont les suivantes :

- Emission de rayonnement γ avec une énergie comprise entre 100 et 200 keV, ou une émission β^+ , suivi de l'émission de deux rayonnements γ de 511 keV,
- Absence de particules fortement ionisantes (α ou β^-),
- Période effective relativement courte.

En ce qui concerne les émetteurs γ , il existe un large choix de radioisotopes possibles, d'où une large gamme de radiopharmaceutiques utilisables en médecine nucléaire. A titre d'exemples :

- L'iode-131 fut le premier radioisotope utilisé *in vivo*. C'est un radioisotope peu coûteux, commercialement disponible, formant facilement des liaisons avec les protéines. Cependant, en plus du rayonnement γ très pénétrant émis (365 keV), il possède également un

rayonnement β^- de 600 keV, ce qui entraîne une irradiation trop importante du patient et nécessite une protection lors de la synthèse des radiopharmaceutiques

- Le technétium-99m représente le radionucléide de choix en analyse clinique. Il est utilisé en routine dans plus de 95% des examens isotopiques réalisés en milieu hospitalier. En effet, ces caractéristiques physiques répondent parfaitement aux besoins de la médecine nucléaire. Il est obtenu à partir d'un générateur ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$).

- Depuis une dizaine d'année, l'utilisation du ^{18}F -FDG (fluoro-déoxy-D-glucose marqué au fluor-18), en tomographie d'émission de positons, connaît un vrai succès, et est de plus en plus répandue.

Deux types d'imagerie sont possibles : la scintigraphie qui utilise des radionucléides émetteurs γ , et la tomographie d'émission de positons (TEP) qui utilise des radionucléides émetteurs β^+ . Le principe de cette technique repose sur l'annihilation d'un positon avec un électron, deux photons d'égales énergies (511 keV) sont alors émis colinéairement à 180° . La TEP permet ainsi de délivrer des images en trois dimensions.

Pour la scintigraphie, en fonction de l'organe ciblé, différents radioisotopes sont utilisés (figure 2). La nature de l'isotope et du vecteur sont deux paramètres important à prendre en compte, puisqu'ils vont en effet conditionner la méthode de ciblage (isotope seul ou fixation sur un vecteur).

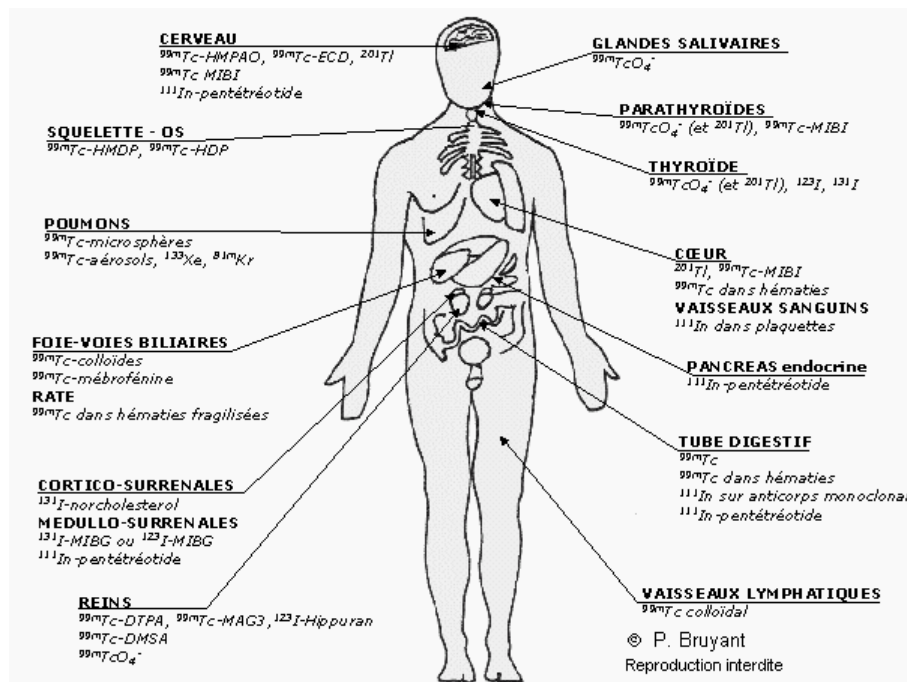


Figure 2 : Explorations fonctionnelles des principaux organes à l'aide de quelques radiotraceurs

4. Les radioisotopes utilisés en thérapie

Contrairement à l'imagerie, où le ^{99m}Tc domine largement pour la scintigraphie et le ^{18}F pour la TEP, il n'existe pas actuellement, en thérapie, de radioisotope capable de répondre seul aux besoins. La médecine nucléaire s'oriente donc de plus en plus vers une approche personnalisée de ce mode de traitement, où le choix du radioisotope est discuté en fonction du contexte (taille et nature de la cible à détruire, localisation, rapport cible/organes sains). Bien que de nombreuses études portent sur leurs intérêts thérapeutiques, très peu de radioisotopes sont utilisés en thérapie. Actuellement, seuls quelques radiopharmaceutiques, porteurs de radioisotopes β^- , sont utilisés pour des applications cliniques (^{131}I , ^{90}Y , ...). A l'heure actuelle, aucun radioisotope émetteur de particules α n'est employé ; il est toutefois à noter que certains radioisotopes émetteurs α sont en cours d'études précliniques.

Comme pour l'imagerie, les radioisotopes utilisés dans un but thérapeutique sont sélectionnés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, de leur mode de production et des paramètres biologiques relatifs à l'utilisation, ainsi que de la stabilité des éléments fils :

- les radioisotopes à visée thérapeutique sont, pour une très grande majorité, des émetteurs β^- dont l'énergie de rayonnement varie de 0,5 à 2 MeV (soit une pénétration allant de 3 mm pour l' ^{131}I à 3 cm pour l' ^{90}Y). Quelques émetteurs α , avec une forte énergie sur une faible distance, sont également à l'étude ;

- la période physique du radioisotope en rapport avec la cinétique de fixation et de rétention du vecteur utilisé ;

- la disponibilité des radioisotopes à un coût raisonnable.

Une émission γ peut accompagner la décroissance des radioisotopes utilisés en radiothérapie interne. Cette radiation contribue très peu à l'efficacité thérapeutique et augmente l'irradiation des tissus sains. Cependant, si l'énergie des photons émis est dans la gamme diagnostique (entre 100 et 200 keV), elle peut être utilisée pour l'imagerie et la localisation *in vivo* en fonction du temps.

Dans le cas des émetteurs β^- , le choix des candidats est très étendu, ce qui permet d'affiner les critères de sélection, notamment en fonction du parcours maximum des particules émises, de la demi-vie et/ou des propriétés chimiques du radioisotope. A titre d'exemple, l'yttrium-90 est un émetteur β^- pur de forte énergie ($E_{\text{max}} = 2,28 \text{ MeV}$) avec une

demi-vie de 2,67 jours, déjà utilisé en thérapie. Sa production est réalisée à partir d'un générateur ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$). La demi-vie du strontium-90, de 29 ans, rend la disponibilité de ^{90}Y plus accessible.

L'utilisation d'un radioisotope en thérapie va dépendre du type de cancer à traiter. En effet, pour que le traitement soit efficace, il faut que l'énergie soit déposée au niveau de la tumeur sans irradier les tissus sains, et que l'ensemble de la masse cancéreuse soit irradié. Ainsi, une particule β^- est plus efficace pour les tumeurs de tailles micrométriques. Les électrons Auger déposant leur énergie à proximité immédiate de leur lieu d'émission, il faut donc que le radioisotope entre dans la cellule et irradie directement le noyau, détruisant ainsi l'ADN de la cellule conduisant à sa destruction. L'utilisation des particules α présente un intérêt pour l'éradication de petites masses tumorales ou de cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme.

5. Propriété et marquage des radiopharmaceutiques

L'efficacité d'un radiopharmaceutique dépend de la spécificité du vecteur, c'est-à-dire la partie non radioactive de la molécule, et des caractéristiques de l'isotope qui lui est rattaché. Il faut également considérer sa demi-vie effective. Pour cela, il est nécessaire de connaître le temps de résidence au contact de la cible. Idéalement, le temps de résidence devrait être maximum dans l'organe visé et quasi-nul dans les autres parties du corps. La demi-vie effective donne accès à l'impact réel du radiopharmaceutique sur sa cible.

La stabilité chimique et les propriétés pharmacocinétiques conditionnent aussi le comportement des radiopharmaceutiques. Ils doivent être stables dans le milieu circulant, et la présence du radioisotope ne doit pas perturber les propriétés ciblantes du vecteur. Les contraintes de pharmacocinétiques sont les mêmes que pour les médicaments, et une excrétion trop rapide ou des interactions non spécifiques sont des obstacles à la biodisponibilité. La rétention dans le sang doit être suffisamment longue pour que le produit atteigne sa cible, étape qui doit être la plus courte possible. Lorsque le radiopharmaceutique a atteint sa cible, le taux de dissociation doit être faible. Afin de limiter le temps de circulation du radiopharmaceutique dans l'organisme, une approche par injections localisées peut également être utilisée.

La méthode de marquage doit être simple, une ou deux étapes maximum, et avec un délai de synthèse en rapport avec la période du radionucléide. La pureté radiochimique doit être supérieure à 90% et la méthode de marquage ne doit pas nécessiter de purification. Il existe deux stratégies de marquage des radiopharmaceutiques : par liaison chimique, covalente ou de coordination, ou par encapsulation.

Certains isotopes peuvent être introduits de manière covalente sur le radiopharmaceutique. C'est le cas des isotopes d'iode ou de fluor qui sont introduits à la place d'un hydrogène. Le principal attrait du marquage covalent est la faible modification des propriétés chimiques et structurales des molécules radiomarquées.

Dans l'approche de marquage par complexation, on distingue les traceurs non-dirigés des traceurs vectorisés. Les premiers sont constitués de complexes non-ciblants de radioisotopes. La seconde catégorie de traceurs associe un groupe complexant à un motif vecteur. Trois approches ont été développées pour introduire le radioisotope : la voie directe, l'approche bifonctionnelle et l'approche intégrée.

Voie directe :

Cette méthode met à profit les groupements chélatants des chaînes latérales des acides aminés. Cette approche ne nécessite pas de modification de la molécule vectrice et est aisée à mettre en œuvre. Toutefois, les complexes résultants peuvent être instables, et le site de marquage est difficilement contrôlable. De plus, le marquage peut avoir un effet sur les propriétés biologiques de la molécule en modifiant, par exemple, sa structure ou sa polarité. Cette méthode est donc peu utilisée.

Approche bifonctionnelle :

Cette technique est la plus utilisée pour le radiomarquage par complexation des traceurs vectorisés actuellement décrits. Elle est aussi appelée "approche BFCA" pour "bifunctional chelating agent". Elle consiste à utiliser une molécule ciblante reliée, par un "linker", à un motif de complexation du radioisotope à introduire.

Cette approche présente l'avantage de préserver l'affinité de la molécule ciblante pour son récepteur en éloignant le motif chélatant. Le linker peut être une simple chaîne hydrocarbonée pour augmenter la lipophilie, une séquence d'acides aminés pour améliorer l'élimination rénale, ou encore de type PEG pour ralentir l'élimination hépatique. L'inconvénient majeur de cette approche est la taille des molécules formées qui les rend

immunogènes, pose des problèmes de biodisponibilité, ou modifie la spécificité et/ou la sélectivité initiale(s) du vecteur.

Approche intégrée :

Dans cette stratégie, la partie chélatante du radionucléide fait partie intégrante de la partie ciblant. Il faut en théorie parvenir à former un objet dont la taille est proche de celle de la molécule ciblant modèle. Les structures chimiques et tridimensionnelles reconnues par le récepteur doivent être conservées afin de maintenir une affinité et une spécificité suffisantes.

Dans le cadre de nos études, nous utiliserons uniquement une approche bifonctionnelle.

II. La radiothérapie alpha ciblée

1. Présentation de la radiothérapie alpha ciblée

En 1926, C. Regaud et A. Lacassagne (pionniers de la radiothérapie) avaient prédit que « l'agent idéal du traitement du cancer serait constitué d'éléments lourds, capable d'émettre des rayonnements d'ordre moléculaire, qui seraient administrés dans l'organisme et se fixeraient sur les cellules que l'on cherche à détruire » [7]. Cette définition caractérise parfaitement la radiothérapie alpha qui combine un radioisotope émetteur alpha avec un vecteur spécifique des cellules tumorales. La radiothérapie interne ciblée est une thérapeutique anticancéreuse de radiothérapie interne permettant de placer une source radioactive directement au contact des cellules ciblées (figure 3).

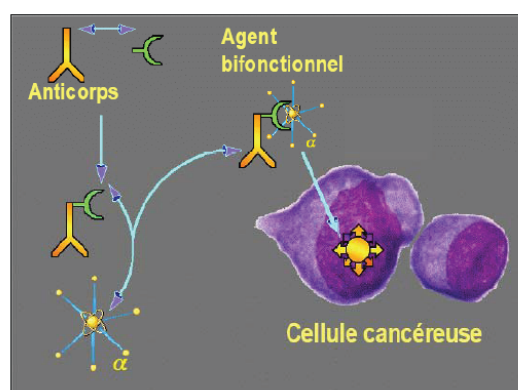


Figure 3: Principe de la radiothérapie alpha vectorisée

Elle représente une approche comparable à la radiothérapie bêta, mais de nombreuses spécificités physiques les séparent.

- les particules α ont un parcours moyen de 50 à 100 μm dans les tissus biologiques, alors que le parcours des émissions β est de l'ordre de quelques millimètres, ce qui va permettre de limiter l'irradiation non désirée des tissus environnants (figure 4)

- la désintégration α permet de délivrer une plus grande quantité d'énergie dans un volume plus réduit, ce qui confère à l'irradiation α une plus grande cytotoxicité à nombre de désintégrations équivalent. L'énergie des particules α est de l'ordre de plusieurs MeV, et le transfert d'énergie linéique (TEL) a été mesuré de 20 à plusieurs centaines de keV par μm , alors qu'il n'est que de 0,2 keV/ μm pour les particules β . Cela permet de délivrer une dose importante. Ce parcours limité et ce fort dépôt d'énergie laissent espérer un ciblage cellulaire beaucoup plus précis et cytotoxique dans le cas de la radiothérapie α que dans le cas de la radiothérapie β .

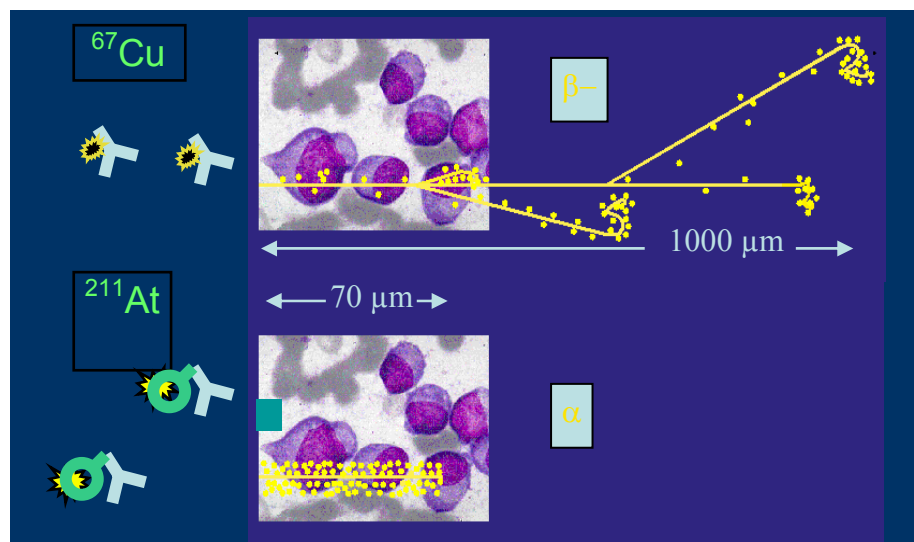


Figure 4 : Différence de trajet et de la densité d'ionisation entre le cuivre-67 (émetteur β^-) et l'astate-211 (émetteur α)

Il existe approximativement une centaine de radioisotopes émetteurs α , pour la plupart des noyaux lourds de numéro atomique supérieur à 82, et seul un nombre réduit de ces radioisotopes est disponible pour une éventuelle utilisation clinique. Les différents critères permettant la sélection des isotopes émetteurs α d'intérêt sont les suivantes:

- une demi-vie compatible avec une utilisation clinique en radiothérapie interne,
- le rendement d'émission α ,
- la co-émission de rayonnements X et γ ,

- la demi-vie de l'élément fils produit après désintégration α ,
- les moyens de production (disponibilité, pureté, coût),
- la chimie de l'isotope.

A l'heure actuelle, la littérature internationale reste encore pauvre concernant la radiothérapie interne, très probablement en raison de l'absence ou la non-disponibilité d'isotopes appropriés, ainsi que de leur coût. Seuls quelques uns ont fait l'objet d'études précliniques : le bismuth-212, le bismuth-213, l'astate-211, l'actinium-225 et le terbium-149 (Tableau 1) [8]. Il existe, en revanche, un isotope étudié en phase 3, le ^{223}Ra , et qui correspondrait à court terme, au premier traitement en thérapie α ciblée. Il apparaît particulièrement intéressant pour le traitement des métastases osseuses, puisqu'il présente une affinité naturelle pour les os.

Tableau 1 : Principaux radioisotopes émetteurs α et leurs caractéristiques

Radioisotope	Demi-vie	Energie alpha (MeV)	Avantage	Inconvénient
Astate-211	7,2 h	6,8	Demi-vie longue	Faible disponibilité
Bismuth-212	60,6 min	6	Disponible sous forme de générateur	Demi-vie courte
Actinium-225	10 j	6-8,38	5 particules α émises	Stabilité du ligand
Bismuth-213	45,6 min	6-8,38	Disponible sous forme de générateur	Demi-vie courte
Plomb-212	10,6 h	7,8	Disponible sous forme de générateur	Emission d'électrons déstabilisant le vecteur
Terbium-149	4,1 h	4	Faible irradiation non spécifique	Faible disponibilité
Radium-223	11 j	5,78	Faible irradiation non spécifique	

Parmi ces différents isotopes, le bismuth-212 est le premier à avoir fait l'objet d'études animales ayant conduit au développement de la radiothérapie alpha vectorisée. Le ^{212}Bi présente cependant des difficultés de production en quantité suffisante pour une étude clinique [9].

L'actinium-225 présente quant à lui une demi-vie très longue mais présente l'inconvénient d'émettre 4 particules α au cours de sa décroissance induisant, par la radiolyse

et la diversité chimique des isotopes fils, une très mauvaise stabilité du couplage à l'anticorps [10]. L'actinium-225 est actuellement utilisée en étude clinique par injection localisée.

Le bismuth-213, en raison de ses propriétés, est un isotope très étudié en radiothérapie α ciblée, car il est aisément couplé à une structure protéique par l'intermédiaire d'un agent chélatant bifonctionnel de type CHX-A-DTPA [9].

L'astate-211 représente actuellement l'alternative la plus intéressante au ^{213}Bi , pour un développement clinique à grande échelle [3].

La plupart des radionucléides ne possèdent pas de tropisme particulier pour un tissu tumoral. Pour leur utilisation en radiothérapie interne, les radioisotopes doivent être facilement couplés au vecteur. L'association stable peut se faire directement sur la structure protéinique du vecteur ou de façon indirecte par l'intermédiaire d'une molécule organique bifonctionnelle. La liaison entre le radioisotope et le vecteur doit être la plus stable possible *in vivo* afin de limiter la libération du radionucléide à distance de la tumeur ciblée par le vecteur (libération pouvant faire suite au métabolisme physiologique du vecteur, à une instabilité chimique, à la radiolyse consécutive à une désintégration radioactive à proximité du vecteur,...). Cette étude de la stabilité de marquage sera donc un facteur prépondérant dans le développement de la radiothérapie interne, et il sera très important de la développer pour chaque radioisotope et pour chaque technique de marquage. En conclusion, il faut rechercher la possibilité d'une technique de marquage simple, efficace, reproductible et permettant d'obtenir l'activité spécifique la plus forte possible ainsi que la plus grande stabilité *in vivo* du radio-conjugué.

3. Les générateurs *in vivo*

La notion de générateurs *in vivo* a été introduite en 1989 par Leonard Mausner et son équipe [11]. Le concept consiste à marquer le vecteur (complexes, anticorps, peptides,...) avec un radionucléide, de demi-vie intermédiaire, dont la décroissance permettra de produire *in vivo*, dans l'organisme, le radioisotope d'intérêt, dans le but :

- d'augmenter la période physique du radioisotope d'intérêt ; c'est par exemple le cas du générateur $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$, où le ^{212}Pb , avec une période de 10 h, est utilisé pour produire le ^{212}Bi ($t_{1/2} = 60.6$ min), émetteur de particules α ;

- d'augmenter la dose administrée ; c'est par exemple le cas des générateurs $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$ ou $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$, la chaîne de désintégration de l' ^{230}U et de l' ^{225}Ac conduisant à la formation

respective de 5 et 4 radioisotopes émetteurs de particules α . La dose cumulée administrée sera donc plus importante que pour l'injection d'un seul radioisotope émetteur α .

Ce concept implique, cependant, que le couplage de l'isotope fils sur le vecteur soit similaire à celui de l'isotope père, afin que le radionucléide fils ne soit pas relâché de sa position initiale. Ceci est plus particulièrement important lors de l'étape de vectorisation. Plusieurs générateurs peuvent potentiellement être utilisés comme générateurs *in vivo* (Tableau 2). Le choix de ces systèmes est basé sur :

(1) les propriétés chimiques du radioisotope père, afin de pouvoir facilement fixer l'isotope sur le vecteur choisi ;

(2) la période radioactive de l'élément père ; celle-ci doit être suffisamment longue afin de pouvoir réaliser le marquage et la vectorisation *in vivo* jusqu'aux cellules cibles, et suffisamment courte pour que la décroissance en l'élément fils ait lieu au niveau de la cible avant élimination du vecteur par l'organisme.

Tableau 2 : Potentiels couples de radioisotopes pour des générateurs *in vivo*

générateur	élément père		élément fils	
	$t_{1/2}$	décroissance	$t_{1/2}$	émission
$^{66}\text{Ni} / ^{66}\text{Cu}$	2,3 j	β^-	5,1 min	γ, β^-
$^{112}\text{Pd} / ^{112}\text{Ag}$	21,0 h	β^-	3,1 h	$\gamma, \text{électron Auger}, \beta^-$
$^{134}\text{Ce} / ^{134}\text{La}$	3,2 j	CE	6,5 min	$\gamma, \text{électron Auger}, \beta^+$
$^{140}\text{Nd} / ^{140}\text{Pr}$	3,4 j	CE	3,4 min	$\gamma, \text{électron Auger}, \beta^+$
$^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$	10,6 h	β^-	1.01 h	$\gamma, \text{électron Auger}, \alpha, \beta^-$
$^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$	10,6 j	α	45,6 min	β^-, α
$^{44\text{m}}\text{Sc} / ^{44}\text{Sc}$	2,44 j	γ	3,97 h	β^+, γ
$^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$	20,2 j	α	31 min	α

Ce travail de thèse se consacrera à l'étude des générateurs *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$.

Deuxième partie :

Généralités

Cette partie a pour but de rappeler certaines généralités qui sont importantes pour la compréhension de la suite. Les liposomes, de part leur propriétés d'encapsulation, ont été particulièrement utilisés au cours de cette thèse. Une description détaillée de leurs propriétés sera présentée dans cette partie. De plus, au cours de ce travail de thèse, une double approche est régulièrement utilisée. Elle se base sur l'utilisation des méthodes expérimentales et de modèles théoriques réalisés via la loi d'action de masse. Les modèles utilisés au cours de cette thèse vont être brièvement présentés dans ce chapitre. Lors des tests *in vitro*, le sérum humain a été choisi comme milieu modèle d'étude. La composition de celui-ci est également décrite dans cette partie. Le principe général d'un appareil d'Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation sera également présenté.

I. Les liposomes

Les liposomes ont fait l'objet de nombreuses études depuis 1960. Ils connaissent actuellement un intérêt considérable dans les milieux scientifiques et médicaux. Par leur structure compartimentée, ils ont suscité et suscitent encore actuellement un réel intérêt dans le domaine de l'encapsulation [12,13].

1. Définitions

Les lipides

Les lipides sont des corps gras d'origine naturelle. Ce sont en général des molécules amphiphiles, c'est-à-dire constituées d'une partie polaire (hydrophile) et d'une partie apolaire (hydrophobe) [14]. Il en résulte une tendance de ces molécules à s'accumuler aux interfaces

et à s'auto-associer en solution. En milieux aqueux, l'organisation la plus stable de ces molécules est celle qui permet de minimiser les interactions entre les composants hydrophobes et les molécules d'eau.

En 1925, Gorter et Grendel sont les premiers à démontrer la capacité de certains lipides à former des simples et des doubles couches. Différents types d'auto-assemblage sont possibles selon la concentration en lipides, la température mais aussi selon la forme géométrique des molécules considérées [15,16].

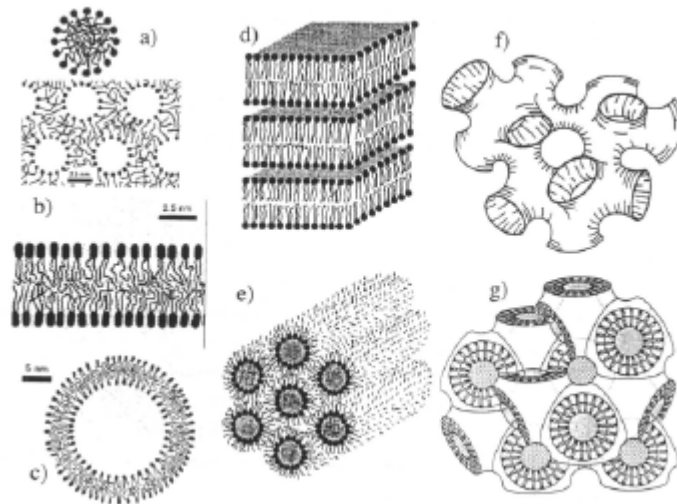


Figure 5 : Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a) micelle et micelle inverse, b) bicouche, c) vésicule, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse, f) phase éponge, g) phase cubique directe bicontinue

La figure 5 montre l'existence de différents types d'auto-assemblages. Toutes ces phases ont en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l'eau tout en empêchant le contact des chaînes hydrophobes avec l'eau [16].

Les lipides qui nous intéressent essentiellement dans ce travail sont les phospholipides. La plupart de ces composés naturels sont constitués de deux chaînes d'acides gras estérifiant les fonctions alcool du glycérol en positions 1 et 2. Les groupes polaires fixés sur le phosphate estérifient la position 3 du glycérol. Ces molécules sont un constituant majeur des cellules vivantes, dont ils séparent le milieu intra du milieu extracellulaire par la formation d'une membrane.

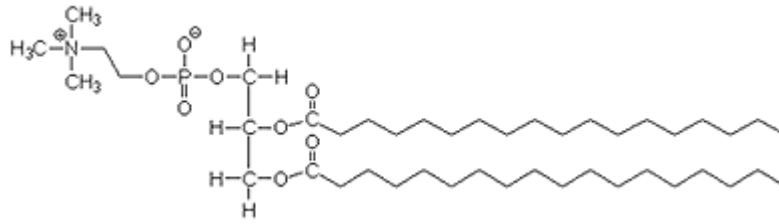


Figure 6 : Représentation d'un phospholipide

Parmi les différents assemblages possibles, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux liposomes.

Les liposomes

Les liposomes ont été décrits initialement par Bangham et al [17], suite à des travaux de microscopie électronique effectués sur une suspension de phospholipides d'origine cellulaire. Ces vésicules artificielles, ou liposomes, dont la membrane est constituée d'une ou plusieurs bicouches de lipides résultent de l'auto-assemblage spontané des molécules amphiphiles dans un excès de solution aqueuse [18].

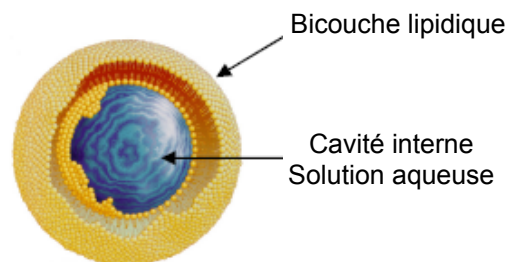


Figure 7 : Schéma d'assemblage d'un liposome

Les liposomes peuvent être préparés à partir de toute une variété de lipides d'origine naturelle ou synthétique, ou encore à partir d'un mélange de ces lipides. Ils sont utilisés en cosmétologie et pharmacologie pour transporter des principes actifs jusqu'à leurs cibles. Les liposomes sont également présents en biologie sous forme de vésicules cytoplasmiques.

Les liposomes ont longtemps été considérés comme étant des analogues de cellules vivantes. La morphologie des phases formées dépend non seulement de la concentration des molécules amphiphiles et de la température mais également de la forme géométrique des molécules considérées. Afin de former un liposome, il est nécessaire que l'aire de la tête hydrophile des lipides soit légèrement supérieure à la section de la chaîne aliphatique. Les molécules qui remplissent ces conditions s'auto-assemblent spontanément en vésicules, c'est-

à-dire en structure fermée. Le rayon minimum de la paroi de la vésicule est alors fixé par la géométrie de la molécule : les têtes polaires des lipides sont séparées d'une distance maximale égale à deux fois l'extension des chaînes aliphatiques.

Les liposomes sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques qui les composent. On distingue (figure 8) :

- les liposomes multilamellaires, appelés MLV pour « multilamellar large vesicles »,
- les liposomes unilamellaires de petite taille, appelés SUV pour « small unilamellar vesicles » (20 à 100 nm de diamètre),
- les liposomes unilamellaires de grandes tailles, appelés LUV pour « large unilamellar vesicles » (100 à 500 nm de diamètre),
- les liposomes géants, appelés GUV pour « giant unilamellar vesicles » (500 nm à 100 μm de diamètre).

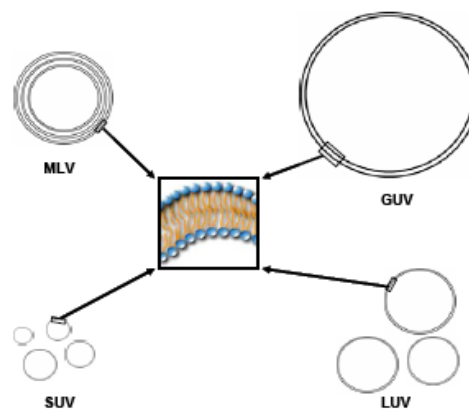


Figure 8 : Représentation schématique des différents types de liposomes

2. Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques

La membrane des liposomes est un système complexe. Ses caractérisations physico-chimiques et, notamment, l'organisation et la mobilité des phospholipides qui la constituent influencent la capacité d'encapsulation du liposome.

2.1. Rotation des chaînes hydrophobes et fluidité membranaire

Plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même. La température est un facteur important. En effet, chaque lipide pur possède une température de transition de phase qui

correspond au passage réversible d'un état ordonné (L_β) vers un état désordonné (L_α) via un état intermédiaire P_β [16,19].

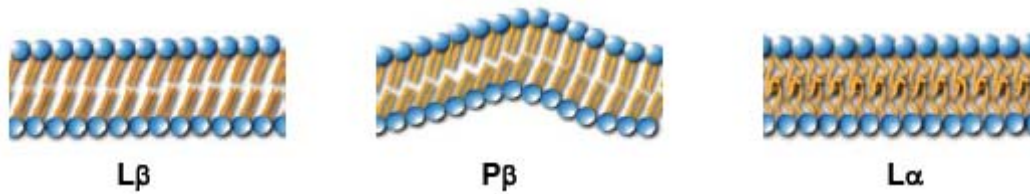


Figure 9 : Représentation des principaux changements de phase au sein des membranes lipidiques

Ces deux états résultent d'une rotation possible autour des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des queues apolaires des phospholipides. A une température suffisamment faible, la plupart des chaînes carbonées sont de type *trans*. Les chaînes sont étirées au maximum, parallèles les unes aux autres et ordonnées : il s'agit de l'état L_β . Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire. La probabilité d'une isomérisation *trans-cis* augmente. Dans une bicouche lipidique, les liaisons *cis* provoquent un changement de direction et rendent le parallélisme des chaînes plus difficile [20]. Au-delà d'une température donnée, appelée température de transition de phase, la conformation ordonnée passe à une conformation désordonnée : il s'agit de l'état L_α . Dans la conformation désordonnée, les chaînes oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la membrane. Elles ne sont plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche diminue [20].

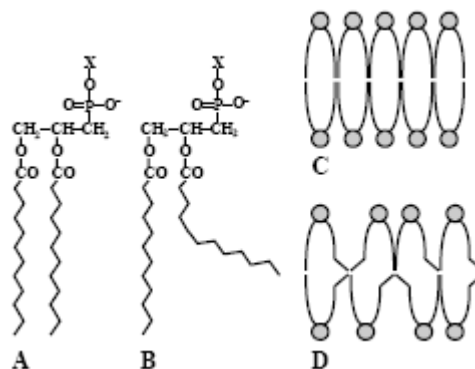


Figure 10 : a) Phospholipides « tout *trans* » ; b) Phospholipide avec liaison *cis* ; c) Membrane en conformation β ; d) Membrane en conformation α .

L'état ordonné de la bicouche, L_β , est défini comme un état de gel, c'est-à-dire un état dans lequel les chaînes hydrophobes sont figées et présentent une mobilité réduite. L'état

désordonné de la bicouche, L_{α} , est défini au contraire comme un état de type fluide, dans lequel les lipides sont animés de divers mouvements.

2.2. Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques

Des mouvements autres que l'expansion latérale interviennent également au niveau des phospholipides des bicouches lipidiques [16] :

- Les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane
- Ils présentent aussi un mouvement de balancier plus ou moins prononcé
- Ils sont aussi capables de diffuser au sein d'une même monocouche ou de passer d'une monocouche à l'autre ; ce mouvement est communément appelé « *flip-flop* ».

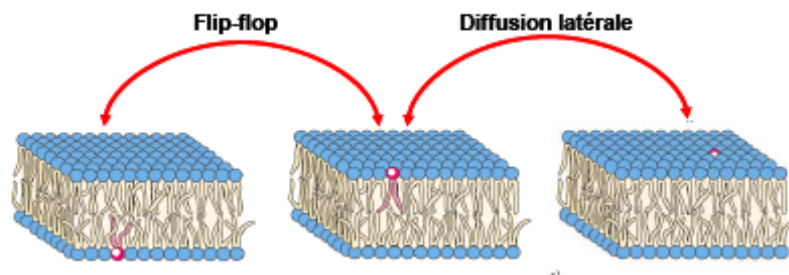


Figure 11 : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes [16]

La fluidité d'une membrane est donc définie comme l'aptitude des lipides à se mouvoir au sein de cette membrane. Une bicouche dans un état ordonné présente une fluidité plus faible que dans un état moins ordonné.

2.3. Stabilité des liposomes

Plusieurs paramètres peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même, sa stabilité et donc les propriétés d'encapsulation du liposome.

La température :

Comme nous l'avons décrit précédemment, la température est un facteur influençant fortement l'état d'organisation de la membrane : son augmentation permet le passage d'un état organisé (en dessous de la température de transition de phase) à un état désordonné (au dessus). Dans une gamme de température proche de la zone de transition, des imperfections

vont apparaître dans la structure de la bicouche et la coexistence des zones organisées et désorganisées ont des conséquences sur les propriétés de la membrane : la présence de défauts favorise la fusion entre deux liposomes en contact [21] mais augmente aussi la perméabilité de la membrane.

La transition de phase des lipides permet donc d'utiliser la température comme un paramètre externe contrôlant la perméabilité de la membrane et les propriétés d'encapsulation du liposome [22].

La composition de la bicouche :

La composition de la bicouche permet de contrôler la fluidité de la membrane, paramètre qui intervient, dans les propriétés d'échange et de stabilité du liposome. Un choix judicieux de la structure de la bicouche permet d'envisager un contrôle précis du relargage de l'espèce encapsulée dans le temps. L'insertion de molécules telles que le cholestérol (figure 12) peut ainsi mener à des modifications des propriétés physiques des membranes lipidiques. En effet, le cholestérol est une molécule possédant un caractère hydrophobe très marqué, ce qui lui permet de s'insérer au sein d'une membrane lipidique [23]. Il est composé de quatre cycles rigides coplanaires et d'une chaîne ramifiée à 8 atomes de carbone. La présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique engendre une condensation forte des lipides, faisant ainsi diminuer l'interface qu'ils occupent. Le cholestérol réduit ainsi la dynamique des lipides au sein de la membrane et tend donc à la rigidifier. La membrane présente ainsi une perméabilité plus faible et une stabilité face à la fusion plus importante.

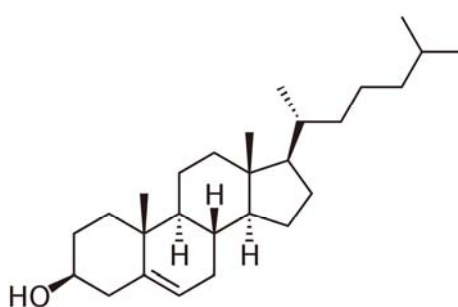


Figure 12 : Structure de la molécule de cholestérol

Présence de polymères sur la membrane :

Le problème de la stabilité des liposomes en milieu biologique constitue un frein à leur utilisation dans des applications touchant à la biologie. Différentes stratégies ont été développées pour augmenter la stabilité, c'est-à-dire la durée de circulation, d'un liposome dans l'organisme. L'une des méthodes consiste à recouvrir le liposome d'une couche inerte,

par exemple à l'aide d'un polymère biocompatible tel que le polyéthylène glycol (PEG). On dispose ainsi une couche protectrice autour du liposome qui diminue les interactions avec les protéines circulantes et donc retarde leur élimination de l'organisme. Le temps de demi-vie des liposomes dans le sang passe ainsi de 30 min, pour une formulation à base de phosphatidylcholine et de cholestérol, à 5 h pour une même formulation sur laquelle on a greffé des molécules PEG. Une relativement faible quantité de polymère greffé à la surface des liposomes suffit à former une couche protectrice et à rendre le liposome « furtif ». Depuis leur découverte, les liposomes furtifs ont été étudiés en détail et sont utilisés à de nombreuses fins médicales.

Le pH :

Les phospholipides ont une tête zwitterionique ou chargée. Ainsi, on peut s'attendre à des modifications du comportement des lipides avec le pH. Un changement de la valeur du pH externe peut modifier la charge de la tête polaire ou son hydratation. Cela a pour conséquence de modifier les forces entre têtes polaires voisines et donc modifier la stabilité de la membrane du liposome [24]. Cet effet est réversible si on diminue à nouveau le pH.

Ainsi le développement de liposomes sensibles au pH permet d'envisager des matériaux qui sont stables pour le pH physiologique (pH = 7,4) mais se déstabilisent sous condition acide, conduisant au relargage de leur contenu.

2.4. Perméabilité des membranes lipidiques

La bicouche lipidique est imperméable à la plupart des substances polaires, même de faibles masses moléculaires. L'eau est la seule exception notable : elle diffuse de façon passive à travers la bicouche lipidique.

La bicouche lipidique isole un réservoir aqueux du milieu externe, lui-même aqueux. Toute espèce initialement encapsulée dans le compartiment interne aura tendance à diffuser à travers la bicouche et à être libérée dans le milieu continu sur des échelles de temps variables, fonctions de la nature de la bicouche. De nombreuses études ont été menées afin d'identifier les différents mécanismes intervenant dans ces processus de fuite. Ils diffèrent avant tout selon la nature de l'espèce encapsulée.

En l'absence de canaux ou de molécules de transport transmembranaire, la perméation, à travers la bicouche du liposome, de molécules d'eau et d'espèces non-ioniques est décrite comme un processus de solubilisation-diffusion en trois étapes [25-27] :

- Adsorption de l'espèce à l'interface interne de la bicouche,
- Diffusion à travers la bicouche,
- Désorption.

Les cinétiques de ce processus de solubilisation-diffusion sont fonction de la taille de l'espèce encapsulée, de son coefficient de partition entre l'huile et l'eau mais dépend aussi fortement de la fluidité de la membrane, c'est-à-dire de la dynamique des lipides au sein de la membrane : une réduction de la mobilité des lipides au sein de la membrane réduit la vitesse à laquelle les espèces diffusent à travers cette bicouche [25,26]. Différentes études ont expérimentalement établi un lien entre la fluidité de la membrane et sa perméabilité vis-à-vis de l'eau.

Dans le cas d'espèces ioniques, les mécanismes mis en jeu sont plus compliqués. En particulier, les mécanismes d'adsorption et de désorption dépendent alors fortement de la charge de la membrane, de la polarité des lipides mais aussi de la force ionique et du pH des deux milieux aqueux.

D'autres travaux décrivent le flux des espèces ioniques à travers la membrane comme un passage d'ions à travers des pores se formant transitoirement dans la bicouche lipidique sous l'effet de fluctuations thermiques. Les pores constituent alors un chemin aqueux à travers lequel les ions peuvent diffuser, franchissant le cœur hydrophobe de la membrane.

3. Préparation des liposomes

Pour toute formulation de liposomes, le choix de la méthode de préparation dépend non seulement de la composition lipidique, de la structure des liposomes (uni ou multilamellaires) et de leur taille, mais aussi en fonction de critères de stabilité et de devenir *in vivo*. La plupart des méthodes de préparation des liposomes font appel aux étapes suivantes (figure 13) [18] :

- dissolution des lipides dans un solvant organique ;
- élimination du solvant organique par évaporation sous vide ;
- dispersion des lipides séchés en solution aqueuse.

Des techniques complémentaires permettent ensuite d'optimiser la taille des liposomes formés. Les liposomes peuvent être conservés soit par congélation, soit par lyophilisation en présence d'agent cryoprotecteurs comme des sucres ou du glycérol.

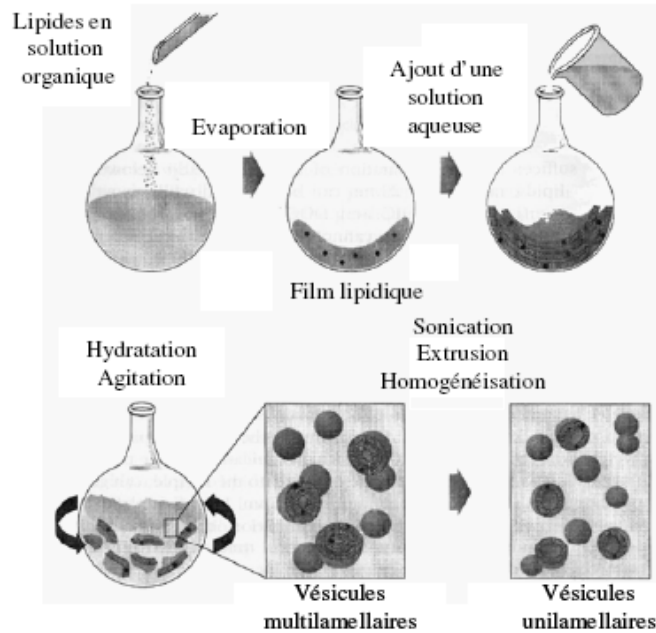


Figure 13 : Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation d'un film lipidique

3.1. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique

Cette technique, initiée dès les années 60, consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de celle-ci, le film phospholipidique, au contact de la solution gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de types MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres, et la distribution de la taille est très hétérogène. Les techniques d'homogénéisation telles que les ultrasons ou l'extrusion permettent de réduire la taille et l'hétérogénéité des vésicules.

3.2. Méthodes de réduction de taille des vésicules

Sonication :

Afin de réduire le diamètre des liposomes MLV, obtenus par hydratation d'un film lipidique, la suspension liposomiale peut être soumise à l'action des ultrasons dans un bain ou plus efficacement à l'aide d'une sonde pour former des SUV de 20 à 50 nm. L'utilisation

d'une sonde à ultrasons est plus efficace qu'un bain à ultrasons pour réduire la taille des liposomes. Cependant cette technique possède quelques inconvénients. En effet, elle peut conduire, d'une part, à la dégradation des lipides, et d'autre part, à la libération, par la sonde, de particules métalliques

Extrusion sur membranes de polycarbonate :

Ce procédé consiste à calibrer la taille des liposomes MLV ou des LUV en les faisant passer à travers des membranes, dont le diamètre des pores est bien défini. Quand les liposomes sont filtrés, sous faible pression d'azote sur des cellules de filtration munies de plusieurs membranes en polycarbonate de diamètres de pores décroissants (1-0,8-0,6-0,4-0,2-0,1 μm), les diamètres des liposomes descendent jusqu'à 60-100 nm.

4. Intérêt des liposomes en radiothérapie

De part leur propriété de microréservoir, les liposomes sont particulièrement intéressants dans le but de vectoriser de plus fortes activités que ne peuvent le faire les anticorps, soit par inclusion de radionucléides dans la membrane lipidique soit par encapsulation dans l'espace interne. Des liposomes porteurs de radioactivité peuvent être dirigés spécifiquement vers des cellules cibles en liant de façon covalente un haptène aux lipides, et en utilisant des anticorps bispécifiques (dirigés d'une part contre l'haptène et d'autre part contre la tumeur).

Des études récentes ont également montré que les liposomes, contenant du DTPA dans leur milieu interne, pouvaient être utilisés comme agent de décorporation, notamment pour le plutonium.

II. Composition du sérum

1. Généralités

Le sang est composé à 55% (en volume) de plasma, phase aqueuse liquide constituée des éléments non cellulaire du sang (minéraux, molécules protéiques et non protéiques), et à 45% de cellules en suspension dans le plasma.

Parmi les cellules du sang, on distingue :

- les érythrocytes, ou globules rouges, dont le rôle est de transporter l'oxygène absorbé des poumons aux cellules de l'organisme, et une partie du dioxyde de carbone des cellules aux poumons
- les leucocytes, ou globules blancs, également présents dans la lymphe, qui interviennent dans le système immunitaire
- les thrombocytes, ou plaquettes, cellules essentielles dans le phénomène de coagulation du sang.

Le plasma est constitué à 91% (en poids) d'eau, et à 9% de soluté. Les principaux constituants du sérum et leur concentration moyenne pour un individu standard sont regroupés dans le tableau 3 [28,29]. Parmi ces solutés, on trouve les minéraux, qui participent au maintien de la pression osmotique de l'organisme, ainsi qu'à l'équilibre acido-basique du sang en maintenant le pH à 7,35-7,45. Les minéraux sont principalement des sels de sodium, mais on trouve également une quantité non négligeable de sels de calcium, de potassium et de magnésium. Les autres éléments entrant dans la composition du plasma sont les solutés organiques, constitués de molécules organiques non protéiques, telles que les nutriments (glucose, acides gras, acides aminés), hormones et produits du métabolisme intermédiaire (acide citrique, lactique, urée,...) transportés par le sang, et les protéines.

La concentration totale en protéines, dans le sang, est d'environ 70 g/L. Les protéines présentes en plus grande quantité dans le sang sont l'albumine, qui représente environ 60% (massique) des protéines, et dont le rôle principal est le transport d'un grand nombre de molécules, les globulines intervenant dans la défense immunitaire, et le fibrinogène participant à la coagulation. De nombreuses autres protéines, présentes en moindre quantité, ont aussi des fonctions essentielles pour l'organisme. C'est le cas de la transferrine, qui représente 3% de la concentration massique des protéines. Elle a pour rôle de transporter le fer vers ses organes cibles, son internalisation et sa régulation. Le plasma est appelé sérum lorsqu'on ne tient pas compte du fibrinogène. L'albumine et la transferrine sont les deux principales métallo-protéines du sérum.

Tableau 3 : Concentration des principaux constituants du plasma sanguin

		Constituants	Concentration (mmol/L)
minéraux	cations	Na ⁺	90
		Ca ²⁺	1,37
		K ⁺	0,49
		Mg ²⁺	0,58
	anions	carbonate	25
		phosphate	1,1
		sulfate	0,33
chlorure		90	
molécules organiques non protéiques	glucose	5,6	
	cholestérol	4,9	
	urée	3	
	citrate	0,16	
	lactate	1,51	
	oxalate	9,20E-03	
protéines	albumine	0,63	
	β-globulines	0,1	
	fibrinogène	9,00E-03	
	transferrine	0,04	

2. Les protéines du sérum humain

La transferrine :

La transferrine est une glycoprotéine d'environ 80 kDa, constituée d'une unique chaîne polypeptidique de 670 à 700 acides aminés [30]. Le rôle principal des transferrines est le transport et la régulation du fer(III) chez les vertébrés et quelques invertébrés tels que les insectes. Ainsi la transferrine sérique solubilise le fer(III), le transporte dans le sang jusqu'aux cellules cibles, pour enfin l'internaliser.

La structure tertiaire d'une protéine est définie par le repliement de la chaîne peptidique la constituant, résultant des interactions non covalentes entre les acides aminés de cette chaîne. La structure tertiaire décrit la forme globale de la protéine. De nombreuses

études de diffraction par rayons X ont permis d'avoir accès à la structure de la transferrine. Comme l'illustre la figure 14, la chaîne polypeptidique de la transferrine est repliée en deux lobes, l'un étant la partie N-terminale de la protéine, l'autre la partie C-terminale. Ces deux lobes d'environ 330 acides aminés chacun, possèdent un site de complexation du fer(III). Ceux-ci se rapprochent l'un de l'autre lors de la complexation d'un cation fer(III).

La transferrine est essentiellement une protéine de transport du fer. Cependant, elle montre également une forte affinité pour les cations possédant une charge positive importante. Elle peut ainsi complexer une large variété d'ions métalliques.

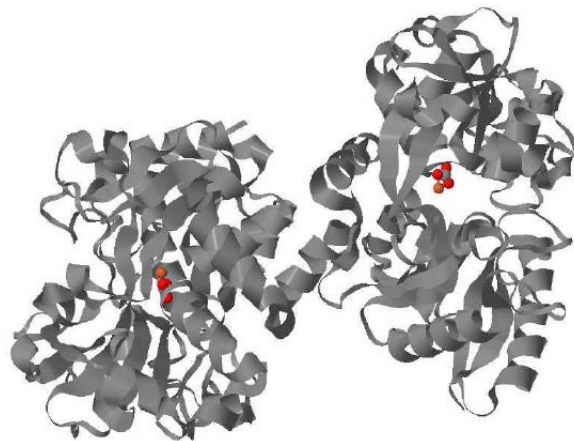


Figure 14 : Représentation de la transferrine. Le fer (orange) et son ligand carbonate (sphères rouges et grises) sont représentés sous forme de sphère pour plus de clarté.

L'albumine :

L'albumine est la protéine du plasma la plus abondante chez l'homme (HSA) et certains animaux (bovin (BSA), rat, cheval, ...). Elle est essentielle pour maintenir la pression colloïdale osmotique requise pour la distribution appropriée des fluides corporels entre les compartiments intravasculaires et les tissus. La BSA est généralement employée comme une protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche.

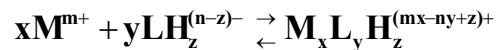
La BSA est une protéine globulaire avec un poids moléculaire de 66,4 kDa. Sa structure primaire est constituée par une chaîne polypeptidique unique de 582 résidus d'acides aminés, connue pour interagir avec des nombreux cations (Ca^{2+}).

Au cours de ce travail, afin d'étudier la spéciation de cations métalliques dans le sérum, nous avons considéré que les principaux constituants de celui-ci étaient, pour les protéines, la transferrine et l'albumine, et pour les composés de faibles poids moléculaires, les carbonates et les citrates.

III. Mise au point de modèles

1. Utilisation du logiciel PHREEQC

Des simulations, permettant de mettre au point des modèles théoriques basés sur la loi d'action de masse, ont été réalisées en utilisant le logiciel PHREEQC [31]. La formation d'un complexe x:y:z entre un cation métallique et un ligand est décrite selon la formule suivante :

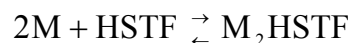


où x correspond au nombre de cations métalliques complexés ; z, le nombre de protons impliqués dans la réaction ; y, le nombre de ligands complexés au métal M ; et n, le nombre de protons du ligand, représentant ses propriétés acide-base.

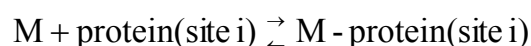
La constante de complexation est, quant à elle, définie par la formule suivante :

$$K_{xy}^z = \frac{(M_xL_yH_z^{(mx-ny+z)+})}{(M^{m+})^x (LH_z^{(n-z)-})^y}$$

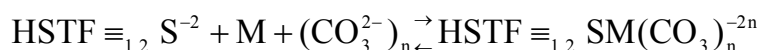
Plusieurs modèles peuvent être utilisés pour décrire l'interaction d'un cation métallique avec les protéines. Un modèle simple, basé sur le modèle de Langmuir, considère l'interaction du métal avec les protéines comme une réaction globale, sans prendre en compte la possibilité que plusieurs sites d'interaction, d'affinité différente, peuvent exister. De plus, avec ce modèle, l'interaction du métal avec les composés de faible poids moléculaire n'est pas prise en compte. Les constantes, ainsi établies, ne peuvent être appliquées qu'aux conditions expérimentales où elles sont obtenues (pH, composition du milieu, concentration en protéines). L'interaction du métal M avec la transferrine peut être décrite selon la réaction suivante où l'on considère que deux cations métalliques sont impliqués dans la réaction puisque la transferrine possède deux sites de complexation.



Un modèle plus complexe peut également être pris en compte, en considérant l'interaction du cation métallique sur plusieurs sites de complexation présents à la surface de la protéine.



Cependant la description de l'interaction reste incomplète tant que les groupes fonctionnels de la protéine impliqués dans la complexation ne sont pas clairement définis. Un modèle microscopique peut ainsi être employé où les interactions ayant lieu au niveau moléculaire sont converties en réaction par la loi d'action de masse. L'interaction du cation métallique avec la transferrine est décrite en considérant deux sites de complexation à la surface de la protéine. En présence de carbonates, un complexe ternaire peut être formé ; il est décrit par la réaction suivante :



Dans les résultats présentés dans la partie suivante, l'interaction du cation métallique avec la transferrine sera principalement décrite à l'aide de ce modèle, tandis que l'interaction du métal avec l'albumine sera décrite en utilisant le modèle de Langmuir, en considérant un seul site de complexation.

Le fichier créé, sur le logiciel PHREEQC, pour étudier la distribution des espèces dans le sérum contient plusieurs types de données :

- les conditions expérimentales (composition du milieu, pH, température)
- les réactions décrivant l'interaction du cation métallique avec les composants inorganiques présents dans le milieu sérique (OH^- , CO_3^{2-} , $\text{Cl}^- \dots$),
- les réactions décrivant la complexation du métal avec les protéines (HSTf et HSA) ou/et avec les composés organiques (citrate ou DTPA).

Les constantes de complexation utilisées dans les modèles sont obtenues, soit à partir de la littérature, et notamment de la base de données NIST, soit expérimentalement. De modèles simples, basés sur la loi d'action de masse, ont ainsi pu être facilement créés pour appuyer nos résultats expérimentaux.

2. Le modèle de Sofou et al

Le modèle développé par Sofou et al (2003) [32] permet d'évaluer théoriquement l'efficacité de rétention des radioisotopes fils dans le compartiment interne des liposomes en fonction de la taille de ceux-ci. Les liposomes sont considérés sphériques et homogènes, en considérant que chaque radioisotope est réparti uniformément dans le compartiment interne des liposomes.

Ce modèle considère que chaque désintégration a une probabilité f que le radioisotope fils soit éjecté du liposome. La probabilité d'éjection $f_{r,rd}$, pour une désintégration, qui a lieu à une distance r du centre du liposome, d'un rayon r_l , peut être calculée en utilisant des lois géométriques et en prenant en compte les distances de recul, r_d , imputées aux radioisotopes fils. La probabilité totale d'éjection, f , est calculée en faisant la moyenne des probabilités d'éjection $f_{r,rd}$, des différents lieux d'émission possibles. Les distances de recul sont déterminées à l'aide du logiciel SRIM (Stopping and Range of Ions in Matter).

Les formules mathématiques permettant de décrire ce modèle sont représentées ci-dessous.

$$f_{r,rd} = \begin{cases} 1 - \frac{2rr_d - r_l^2 + r^2 + r_d^2}{4rr_d}, & r > r_l - r_d \\ 1, & r < r_l - r_d \end{cases}$$

$$f = \int_0^{r_l} 4\pi f_{r,rd} r^2 dr / \frac{4}{3} \pi r_l^3.$$

En utilisant ces formules, un programme, utilisant le solveur d'Excel, a été développé, au sein du laboratoire SUBATECH par Ferid Haddad. Il permet de calculer rapidement les taux de rétention des radioisotopes fils dans les liposomes en fonction de leur taille, et ce quel que soit le système étudié.

IV. L'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation

Les méthodes dites de Fractionnement par Flux Force (FFF), sont des techniques assez nouvelles, dédiées principalement à la caractérisation des macromolécules. Décrites pour la première fois en 1960 par Giddings, les techniques de fractionnement par flux-force sont basées sur l'action simultanée de l'écoulement d'un liquide dans un canal de faible épaisseur et l'effet d'un champ externe appliqué perpendiculairement au canal. Le champ d'application de ces techniques est très large, avec une étendue en taille allant du submicronique à des particules de plus de 100 μm . Différentes techniques de fractionnement sont aujourd'hui décrites, qui diffèrent selon le champ externe appliqué :

- Sedimentation FFF (SdFFF): Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation, qui est une technique qui utilise la force centrifuge comme champ externe,

très utilisée dans la caractérisation des particules colloïdales dont le diamètre est compris entre 0.05 et 1 μm [33,34].

- Thermal FFF (ThFFF) : cette technique est généralement utilisée pour analyser les polymères synthétiques dans les solvants organiques. Elle est basée sur l'utilisation d'un gradient de température établi par chauffage d'une plaque d'un côté et d'un refroidisseur de l'autre côté du canal [35].

- Electrical FFF (EIFFF) : elle combine les avantages de l'électrophorèse et de la séparation par Flux Force. Elle utilise un champ électrique comme champ externe et permet ainsi de séparer les molécules en fonction de leur taille, mais également en fonction de leur nature électrostatique [36].

- Flow FFF (FIFFF) : technique la plus universelle, dans laquelle le champ de force appliqué est un flux croisé perpendiculaire au flux d'élution. Elle permet de séparer les molécules très petites (500 Da) jusqu'aux particules de 100 μm de diamètre [37,38].

Parmi l'ensemble des techniques de fractionnement, on retrouve l'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) qui est certainement l'une des techniques de FFF la plus universelle. Sa gamme d'application couvre des macromolécules, simples ou complexes, d'importance biologique, pharmaceutique, industrielle ou environnementale. Le fractionnement des protéines par AF4 est basé sur une séparation en fonction de leur rayon hydrodynamique.

Le système de fractionnement par AF4 est constitué d'une cellule de séparation dite asymétrique (figure 15), à travers laquelle un flux d'élution est appliqué. La cellule est constituée d'un bloc supérieur imperméable et d'un bloc inférieur doté d'un fritté :

- une membrane d'ultrafiltration, généralement de 5 ou 10 kDa, est déposée sur le fritté à travers lequel une fraction de l'éluant introduit dans la cellule va pouvoir être soutiré. La membrane détermine la limite inférieure de taille des échantillons (membranes en cellulose régénérées, en polysulfones, etc...)

- un spacer (espaceur) qui est une fine lamelle de forme trapézoïdale, déposée sur la membrane et serrée entre deux blocs. L'épaisseur de cette pièce fixe le volume de la zone de fractionnement, elle peut varier entre 125 et 490 μm .

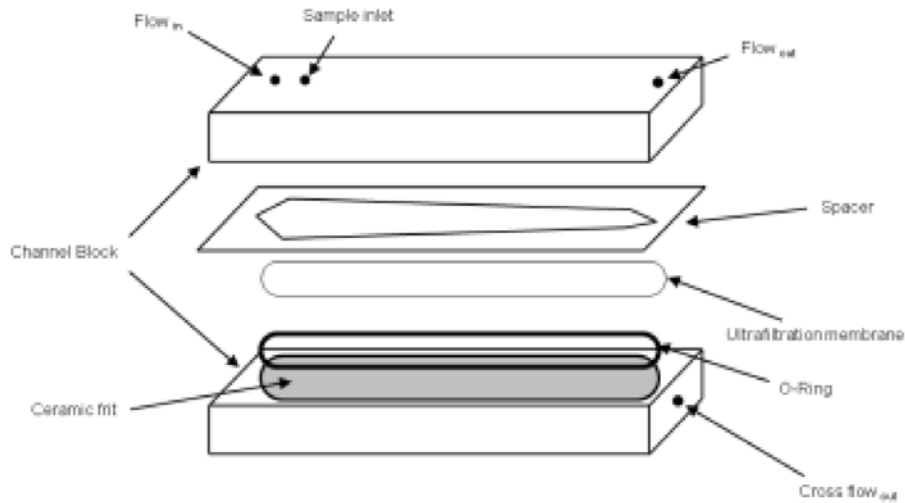


Figure 15 : Représentation schématique d'une cellule AF4

Par rapport aux techniques d'exclusion stérique, ce système présente les avantages d'une adsorption minimale des molécules due à la surface de contact limitée, et d'un cisaillement négligeable des molécules du fait de l'absence de phase stationnaire.

Les constituants de l'échantillon sont séparés par application d'un champ de force perpendiculaire à la direction d'éluion, dit flux croisé d'éluant. En mode normal, mode fréquemment observé, la séparation se fait selon la figure 16. Or un mode différent du mode normal peut apparaître, le mode stérique, qui a lieu à partir d'une certaine taille ($> 1 \mu\text{m}$) et dans lequel les molécules de grosses tailles sont éluées avant les petites.

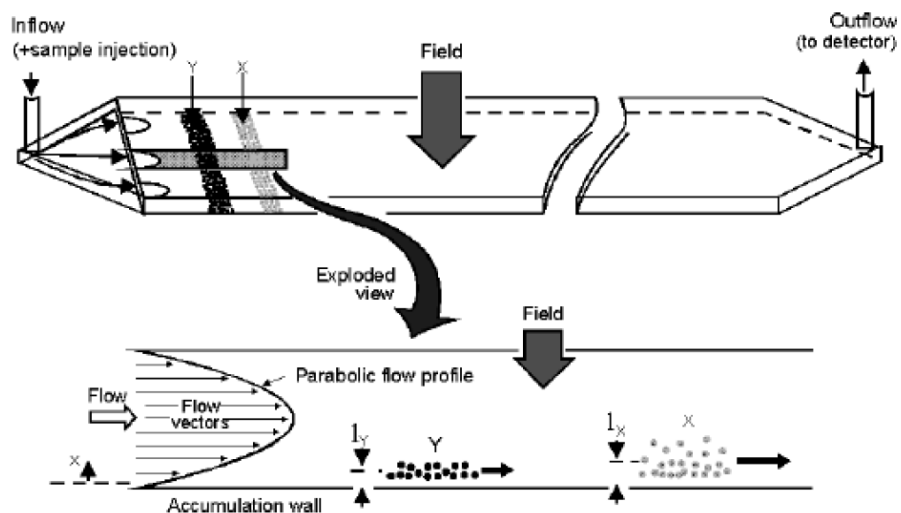


Figure 16 : Représentation schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule

L'échantillon injecté dans la cellule est soumis au flux croisé de débit V_c , et au mouvement Brownien, qui est fonction du coefficient de diffusion D des molécules dans l'éluant. Lors des phases de concentration et de relaxation des échantillons, les molécules se répartissent sur un même plan à proximité de la membrane. Les plus grosses, à plus petit coefficient de diffusion, sont plus proches de la membrane, et les plus petites, à coefficient de diffusion plus élevé, en sont plus éloignées. Lors de la phase d'élution, l'épaisseur de la cellule étant très faible (de 125 à 490 μm), le régime est laminaire et le profil de vitesse parabolique. Le temps de rétention t_R s'écrit en fonction du coefficient de diffusion :

$$t_R = \frac{t_0 \cdot V_c \cdot w^2}{6 \cdot V_0 \cdot D}$$

avec t_R le temps de rétention du composé, t_0 le temps mort correspondant à la traversée du volume de la cellule, V_0 le volume de la cellule, D le coefficient de diffusion, w l'épaisseur de la cellule, et V_c le débit du flux croisé.

Ce mode de fractionnement permet de séparer les constituants d'un échantillon par taille. Le couplage de cette technique avec une détection mutliangulaire laser (MALS) permet de déterminer de manière absolue les masses moléculaires et le rayon de giration des molécules. Depuis plusieurs années, l'AF4 est employée pour la caractérisation de colloïdes naturels, de protéines telle que l'albumine, de biopolymères (polysaccharides comme des pullulanes ou des dextrans, de l'amidon...) ou encore de liposomes [39,40].

Troisième partie : Les
générateurs *in vivo*

$^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$:

Etude bibliographique et
résultats

Chapitre 1 : Le générateur Plomb-212 / Bismuth-212

I. Etude bibliographique

1. Le bismuth-212 en médecine nucléaire

Le bismuth-212, d'une demi-vie de près d'une heure, est produit uniquement à partir de générateurs. Les radioisotopes parents du ^{212}Bi , couramment utilisés pour les générateurs, sont le thorium-228 et le radium-224, qui sont tous deux issus de la décroissance naturelle du thorium-232 ($t_{1/2} = 1,4 \times 10^{10}$ ans) (figure 17) [9,41].

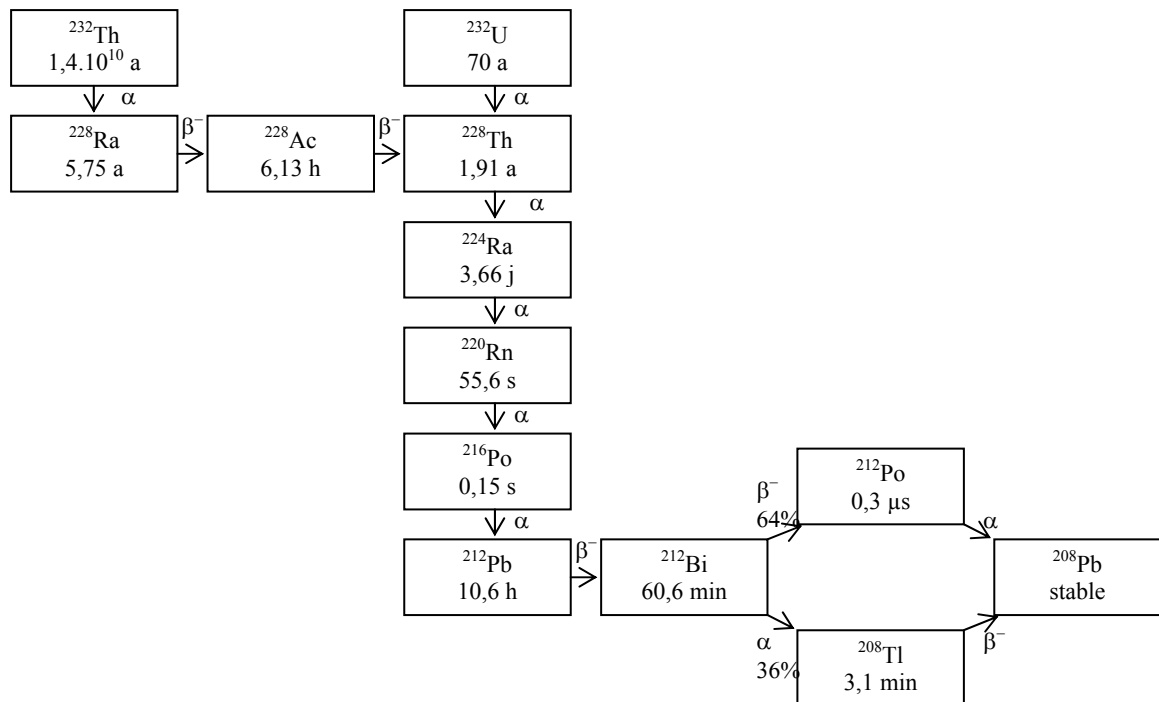


Figure 17 : Schéma de décroissance du ^{228}Th pour la production du ^{212}Bi et du ^{212}Pb

1.1 Production du bismuth-212

Le ^{228}Th peut être produit de deux façons :

(1) La première consiste à extraire et purifier une source de ^{228}Ra à partir du ^{232}Th ; le ^{228}Th sera obtenu par séparation du ^{228}Ra . Cette opération pourra être réalisée chaque année pour obtenir une activité suffisamment importante [42].

(2) La deuxième méthode de production du ^{228}Th est la double capture neutronique, suivi d'une décroissance β^- , du ^{226}Ra . Les cibles de ^{226}Ra peuvent être produites à partir de l' ^{238}U . Ce procédé est uniquement utilisé en Europe et aux Etats-Unis [41,43].

Les systèmes, les plus couramment utilisés pour la production du ^{212}Bi sont les générateur $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Bi}$ et $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Bi}$. Un générateur $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Bi}$ a été conçu et développé, en 2006, au laboratoire SUBATECH par Cyrille Alliot. Dans le cadre d'une collaboration, 450 kBq de ^{228}Th ont été fournis par AREVA. Le principe développé est le suivant :

500 mg de résine DOWEX-50x8 est traitée pour éliminer toutes impuretés éventuelles. Elle est donc lavée successivement en milieu nitrique concentré (HNO_3 9 M) puis en milieu acide chlorhydrique concentré (HCl 9 M). Cette résine est ensuite introduite dans une colonne prête à utiliser.

La résine est reconditionnée en milieu HCl 0,01 M. La solution de ^{228}Th est également conditionnée en milieu HCl 0,01M par évaporation et reprise par HCl 0,01 M. La solution est alors injectée en tête de colonne. Dans ces conditions, tous les éléments sont fixés sur la colonne (^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{228}Th , ^{224}Ra). Le ^{212}Bi est élué par une solution HCl 0,5 M. Le ^{212}Pb est quant à lui élué par une solution HCl 1 M. Au cours de ces deux éluions successives, le ^{228}Th et le ^{224}Ra restent fixés sur la colonne. De part les périodes respectives des radionucléides, les activités récupérées en ^{212}Bi et ^{212}Pb sont identiques à celles du thorium.

Au cours de cette thèse, ce générateur a été utilisé pour la production du ^{212}Pb . Cependant, avec le temps, quelques problèmes de pureté sont apparus probablement dus aux dommages subis par la résine par les radiations. Une autre étape de purification s'est donc révélée nécessaire. Cette dernière est réalisée sur Chelex-100 ; l'adsorption du ^{212}Pb sur la résine est réalisée à pH 5[44], par une solution d'acétate à 5 mM. Après rinçage, le ^{212}Pb est désorbé de la résine par un milieu HNO_3 5 M. La solution de ^{212}Pb est évaporée à sec, puis reprise dans le milieu désiré.

1.2 Potentiel thérapeutique du ^{212}Bi et radiomarquage

Le potentiel thérapeutique du ^{212}Bi a été clairement démontré dans des études précliniques par des cultures cellulaires et par des tests réalisés sur des modèles animaux [9]. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* sur des immunoconjugués marqués avec du ^{212}Bi ont montré, notamment sur des souris atteintes de leucémie, qu'un traitement avec du ^{212}Bi permettait de réduire le nombre de cellules cancéreuses tout en prolongeant le temps de survie dans 30 à 70% des cas. Des études de microdosimétrie ont également montré qu'il suffisait d'une à quatre particules α traversant le noyau d'une cellule pour provoquer une destruction de 90% de la population cellulaire dans la zone tumorale.

De nombreuses études ont ainsi porté sur le développement d'agents bifonctionnels pour la complexation du Bi. La conception de chélates à visée thérapeutique nécessite la connaissance parfaite de la sélectivité du ligand et de la stabilité du complexe métal-ligand. La théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases), développée par Pearson permet de prévoir l'affinité d'un ligand pour le métal cible. Selon cette théorie, l'interaction entre deux entités est assimilée à un équilibre acide-base. Les ions ou les atomes aisément polarisables sont considérés comme mous, tandis que ceux qui possèdent une densité de charge plus élevée sont dits durs car leur nuage électronique est plus apte à se déformer. Les cations métalliques sont des acides durs ou mous, tandis que les ligands sont des bases dures ou molles. L'expérience montre, d'une manière générale, que les complexes les plus stables sont ceux qui contiennent des acides durs avec des bases dures, et des acides mous avec des bases molles.

Le bismuth avec un grand rayon ionique et une charge importante est classé comme un acide limite (intermédiaire entre acide dur et acide mou). Il présentera donc des affinités pour les bases soufrées (base molle) ou azotées (base limite) [45]. Le bismuth va donc être capable de former de nombreux complexes avec des ligands type BAL (dimercaprol) pour les bases soufrées, et EDTA ou DTPA pour les bases azotées.

De nombreuses études de complexation du Bi se sont basées sur les ligands organiques déjà existants tels que le DTPA (diéthylène triamine penta acide) ou le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tétraacétique acide) [9,46]. Le tableau suivant regroupe quelques constantes de complexation du Pb et du Bi avec des ligands azotés. On peut y

observer que le Bi possède une forte constante de complexation pour le DTPA et le DOTA, ce qui en font de bons ligands pour une application en radiothérapie.

Tableau 4: Constantes de complexation du Pb et du Bi avec des ligands azotés (I=0.1)

	Pb	Bi
DTPA	18.9	30.7
EDTA	18	27.8
DOTA	24.3	30.3
NTA	13.3	17.75

Le DTPA est apparu très tôt comme pouvant être un ligand potentiellement intéressant pour la thérapie. Il présente en effet de fortes constantes thermodynamiques avec une grande variété de cations métalliques. Afin de pouvoir être utilisé en médecine, ces complexes doivent être cinétiquement stables et inertes *in vivo*, afin de conserver un taux de complexation suffisamment élevé. Le couplage du DTPA avec un anticorps ou une protéine peut facilement être réalisé, par l'intermédiaire de l'une des fonctions acides du ligand. Les études *in vitro*, réalisées par complexation du ^{212}Bi avec du DTPA couplé à un anticorps, ont conduit à des résultats encourageants. Cependant ces mêmes essais réalisés *in vivo* sur des animaux pour le traitement de cellules cancéreuses, ont montré un manque de stabilité du système, rendant son application en thérapie impossible. Ce manque de stabilité a été attribué à la formation d'un complexe peu stable, lié au couplage DTPA-anticorps, qui engendre une coordination du métal moins importante qu'en absence de couplage.

Plusieurs dérivés du DTPA ont ainsi été créés, tel que le CHX-A-DTPA ; ils sont représentés en figure 18. Celui-ci, ainsi que le DOTA, est aujourd'hui utilisé dans les études cliniques [47].

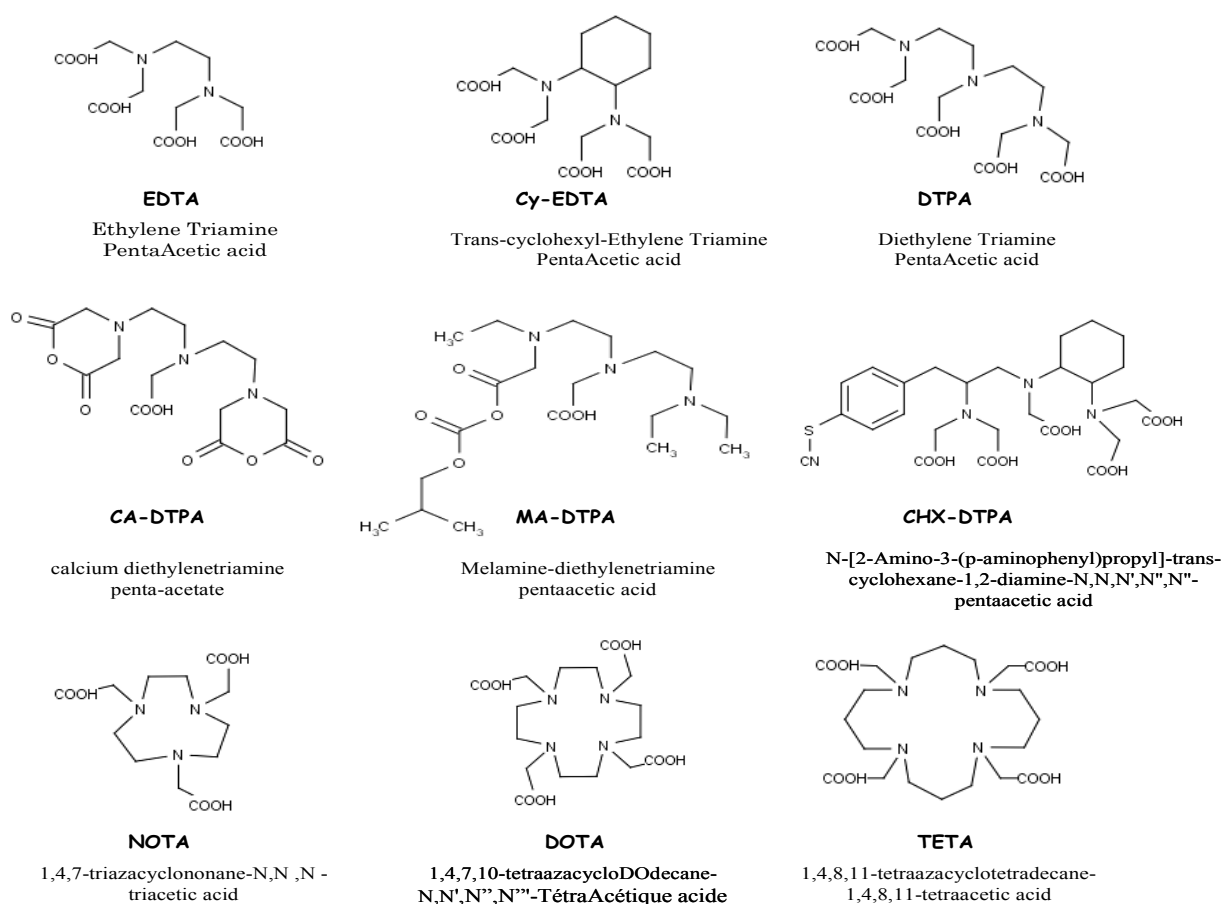


Figure 18 : Représentation des principaux chélates fonctionnels utilisés pour la complexation du Bi en radiothérapie interne

2. Le générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$

Comme il est décrit dans le chapitre précédent, afin de pouvoir utiliser un générateur en thérapie, il est nécessaire que celui-ci remplisse certaines conditions (demi-vie et propriétés chimiques du radioisotope père). Le ^{212}Pb présente une demi-vie adaptée pour une étude clinique, et peut facilement se complexer avec de nombreux ligands organiques (EDTA, DTPA, ...) avec des constantes de stabilité relativement élevées.

Les ligands macrocycliques tels que le DOTA ont fait l'objet de nombreuses études pour la complexation du Pb et du Bi. Les travaux de Mirzadeh et al [48] ont porté sur l'utilisation du DOTA comme agent de complexation pour le générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$. Leur étude a montré que 35% du complexe ^{212}Bi -DOTA, formé après décroissance β^- du complexe ^{212}Pb -DOTA, était dissocié en ions $^{212}\text{Bi}^{3+}$. La dissociation du ^{212}Bi du complexe peut être

attribuée aux effets de la décroissance. En effet, deux types d'excitation ont lieu lors de la décroissance du ^{212}Pb : une excitation cinétique et une excitation électronique.

- excitation cinétique : Cette excitation est la conséquence directe de la décroissance. En effet, les émissions de particules β^- , de rayonnements γ et X, et les conversions internes d'électrons vont induire une énergie cinétique au radioisotope fils produit. Cette énergie est également appelée énergie de recul. Si l'atome qui subit une décroissance β^- est lié à une molécule, l'énergie de recul sera distribuée entre les modes de mouvements de la molécule (translation, rotation et vibration). Parmi ces modes, seul le mode de vibration est capable de rompre une liaison. Ainsi, seul un faible pourcentage de l'énergie de recul sera susceptible de venir dissocier le complexe. En faisant l'approximation d'un système diatomique pour le complexe Pb-DOTA, l'énergie de recul du ^{212}Bi sera de l'ordre de 1 eV. En considérant une énergie d'une liaison métal-oxygène de 4,6 eV [49], l'énergie de recul émise est trop faible pour rompre une liaison. L'excitation cinétique n'a donc pas pour conséquence la dissociation du complexe Bi-DOTA.

- excitation électronique : Parmi les différents processus responsables de l'excitation électronique du ^{212}Bi , le soudain changement du degré d'oxydation du métal, lors de la décroissance du ^{212}Pb et la conversion interne d'électrons sont les plus importants. Le changement du degré d'oxydation va considérablement altérer l'énergie des orbitales électroniques, et peut engendrer un gain d'énergie au ^{212}Bi allant jusqu'à 130 eV. La réorganisation des orbitales électroniques, suite à la conversion interne, se faisant par émission de rayons X, ou d'électrons Auger, il en résultera des espèces de Bi hautement ionisées. L'énergie requise pour neutraliser ces charges est suffisante pour rompre une liaison métal-oxygène (4,6 eV), et aura pour conséquence la dissociation du complexe ^{212}Bi -DOTA.

Ces excitations, liées à une cinétique de complexation très lente entre le Bi et le DOTA, vont induire un relâchement de 35% du ^{212}Bi . Malgré ce relâchement, des études ont porté sur l'utilisation d'anticorps monoclonal comme agent de vectorisation pour le ^{212}Pb [50-52]. Ces anticorps sont couramment fonctionnalisés avec du DOTA, afin de permettre une complexation stable et inerte du ^{212}Pb . Le couplage anticorps / DOTA est illustré sur la figure 19 [51].

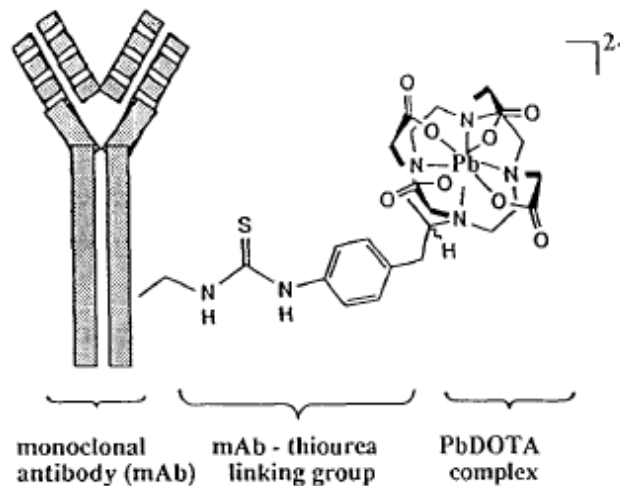


Figure 19 : Représentation schématique d'un anticorps fonctionnalisé au DOTA pour la complexation du Pb

Les travaux de Pippin et al, en 1995, ont porté sur le vecteur présenté en figure 19 [51]. Ils ont montré que le complexe $\text{Pb}(\text{DOTA})^{2-}$ était rapidement formé en solution à $\text{pH} \sim 7$, avec une constante de complexation relativement importante de l'ordre de 24,3 (complexe 1:1:0) ($I = 0,1$). La dissociation du complexe est quant à elle très lente en milieu acide. De plus, ils ont également démontré que lorsque l'anticorps est fonctionnalisé avec le DOTA, le complexe formé $\text{Pb}(\text{DOTA})^{2-}$ est stable dans des conditions *in vivo*. Ce système de vectorisation semble donc approprié pour une utilisation clinique.

Cependant, lors de la décroissance du ^{212}Pb , du fait des énergies émises, environ 35% de ^{212}Bi formé va se trouver dissocier du site de complexation. C'est également ce qu'ont mis en évidence Su et al, en 2005, en utilisant non pas du DOTA seul, mais de la biotine (vitamine B8) marquée au DOTA [50]. Ils ont montré que le complexe $\text{Pb}(\text{DOTA})^{2-}$ est stable sur plus de quatre jours. Mais en utilisant le radioisotope ^{212}Pb , bien que le complexe soit initialement stable, en 4h, plus de 30% du ^{212}Bi , formé après décroissance, n'est pas retenu par le vecteur biotine-DOTA. Une part non négligeable du ^{212}Bi n'est pas recomplexé par le DOTA.

Cette étude montre clairement qu'un simple ligand polydentate n'est pas suffisant pour éviter une dissociation du complexe après la formation de l'isotope fils formé par décroissance β^- . D'autres systèmes de fixation sont donc nécessaires. Deux approches de vectorisation vont être étudiées dans le cadre de ce travail :

- la première consiste en une approche par chélation. L'utilisation du CHX-A-DTPA sera envisagée pour complexer le ^{212}Bi . Après décroissance du ^{212}Pb et dissociation du complexe, le CHX-A-DTPA devra être en mesure de recomplexer le ^{212}Bi « expulsé »,

- la deuxième consiste en l'encapsulation du générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ dans des liposomes. Les liposomes utilisés ont été développés dans le but d'application thérapeutique, pour la médecine nucléaire, par le Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA, INSERM U892).

II. Approche par chélation

1. Etat de l'art

Afin d'améliorer la fixation du ^{212}Bi , obtenu après décroissance du ^{212}Pb , un ligand, autre que le DOTA, devra être utilisé pour la complexation du ^{212}Bi . Deux possibilités sont envisageables :

- Dans le premier cas, le ^{212}Pb est fixé sur le vecteur, via une complexation avec du DOTA. Un deuxième ligand est alors rajouté sur le vecteur, celui-ci étant destiné à la recomplexation du ^{212}Bi .

- Le deuxième cas envisageable est l'utilisation d'un même ligand pour complexer le ^{212}Pb et le ^{212}Bi . Ce ligand devra être en mesure de complexer de façon stable le ^{212}Pb , et de recomplexer rapidement le ^{212}Bi , expulsé après décroissance, afin d'éviter une trop large dispersion de celui-ci dans l'organisme.

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux ligands ont été développés pour la complexation du Bi. Le CHX-A-DTPA est actuellement l'un des ligands le plus utilisé en thérapie pour la complexation du Bi. Il est notamment particulièrement étudié pour les travaux portant sur l'utilisation du ^{213}Bi en radiothérapie α ciblée [53,54]. Le CHX-A-DTPA est un candidat particulièrement intéressant pour la complexation du Bi. En effet comme l'ont montré Brechbiel et al [55], le Bi est idéalement complexé par 8 hétéroatomes (figure 20) avec des distances métal-oxygène/azote relativement courtes, avec une coordination en antiprisme à base carrée. Dans le cadre de notre étude, le CHX-A-DTPA, couplé à une protéine, est donc le ligand que nous avons choisi d'étudier.

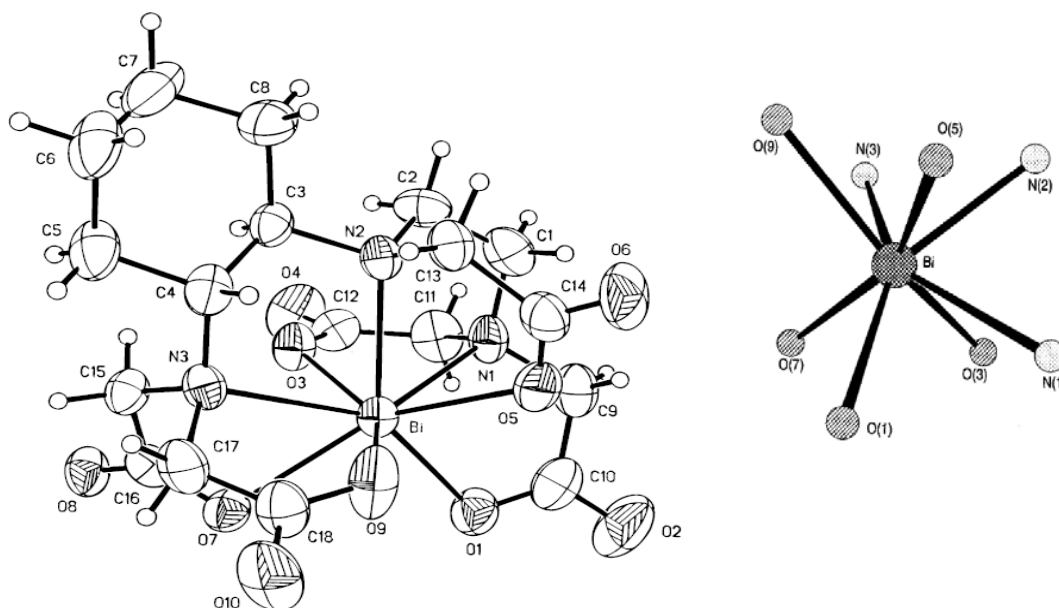


Figure 20 : Structure moléculaire du complexe Bi/CHX-A-DTPA

Comme nous l'avons vu précédemment environ 35% du ^{212}Bi , formé après décroissance du ^{212}Pb , sera éjecté dans le sérum. Le Bi est donc susceptible d'être complexé par les composés présents dans le sérum (protéines, citrate, ...) (voir deuxième partie, chapitre 2). Il est donc important de connaître la spéciation du Bi en milieu sérique, ainsi que les paramètres thermodynamiques décrivant l'interaction du Bi avec les différents composés du sérum, et ce afin de vérifier que le CHX-A-DTPA puisse être en mesure de venir recomplexer le Bi après dissociation du vecteur.

Une équipe de chercheurs s'est beaucoup intéressée à la spéciation du Bi en milieu sérique. En 1996, Li et al ont étudié l'interaction du Bi avec la transferrine par spectroscopie UV et par résonance magnétique nucléaire (RMN), en utilisant l'anion nitrilotriacétique (NTA) comme anion synergique [56]. Ils ont montré la complexation de deux cations Bi^{3+} dans deux sites non équivalents de la transferrine, le site C-terminal et le site N-terminal. Ils ont mis en évidence qu'une forte complexation avait lieu entre le Bi et la transferrine, en reportant des $\log K$ de 19,63 et de 18,80 ($I = 0$). Ces constantes de complexation ont également été calculées en utilisant le carbonate comme anion synergique ; des valeurs similaires ont été reportées (19,42 et 18,58 respectivement ($I = 0$)).

En 2001, ils se sont plus particulièrement intéressés à l'interaction du Bi en présence des deux protéines principales du sérum, l'albumine et la transferrine [57]. Ils ont montré, à l'aide de séparations chromatographiques, dans des conditions proches des conditions *in vivo*,

que 74,7 % du Bi est lié à la transferrine, les 25,3 % restants étant complexés à l'albumine. Ils ont également reporté une constante de complexation décrivant l'interaction Bi-albumine avec un $\log K = 11,2$ ($I = 0$). La transferrine est donc la protéine principale à considérer dans la spéciation du Bi en milieu sérique.

2. Complexation du Bi par la protéine IgG marquée au CHX-A-DTPA dans le sérum humain

La capacité d'un vecteur marqué au CHX-A-DTPA, à recomplexer le ^{212}Bi après que celui-ci soit relâché dans l'organisme a été évaluée au cours de ce travail. Le CHX-A-DTPA, couplé à une protéine d'IgG (immunoglobuline, 150 kDa), a été choisi comme modèle d'étude, la protéine permettant de simuler un vecteur. La première partie de cette étude consiste à étudier la complexation Bi / CHX-A-DTPA. Peu de données dans la littérature relatent de la constante de complexation $\text{Bi}(\text{CHX-A-DTPA})^{2-}$ [55]. Celle-ci est supposée similaire à celle du complexe $\text{Bi}(\text{DTPA})^{2-}$. L'objectif de ce travail consiste donc, dans un premier temps, à déterminer précisément la constante de complexation décrivant la complexation Bi/CHX-A-DTPA. L'effet du couplage du CHX-A-DTPA sur la protéine sera également étudié, afin de vérifier que ce couplage n'affecte pas les propriétés de complexation du ligand (que ce soit pour un aspect structural ou pour une raison quantitative). La deuxième partie porte sur la stabilité du complexe Bi/CHX-A-DTPA dans le sérum humain. Une double approche, théorique et expérimentale avec la réalisation des tests *in vitro*, a été employée dans cette étude.

Des études ont montré une forte stabilité du complexe Bi/CHX-A-DTPA [58]. Celle-ci provient d'une pré-organisation de la molécule et à sa grande flexibilité, qui permet une coordination idéale du Bi par 8 hétéroatomes [55]. L'effet du couplage du ligand sur la protéine a été étudié par spectroscopie de fluorescence résolue en temps. Celle-ci est une méthode couramment utilisée pour les actinides pour étudier la formation de complexes, la spéciation d'espèces, ... [59] Du fait des propriétés de luminescence de certains lanthanides et actinides, le curium (III) a été choisi comme sonde fluorescente. Le curium étant un cation trivalent comme le Bi(III), il présentera les mêmes propriétés de complexation que le Bi avec le CHX-A-DTPA, c'est-à-dire une coordination de type octodentate. Dans notre étude, des expériences réalisées par SRLT, par Gilles Montavon, ont montré que la fixation du CHX-

DTPA sur les protéines n'affectent pas les propriétés de coordination du ligand. Par ailleurs, une constante similaire est observée entre le Bi et le CHX-A-DTPA, et le Bi et le CHX-A-DTPA lié à la protéine. Cela montre que l'effet de la surface chargée de la protéine sur la constante de complexation est négligeable. Cette étude met en évidence qu'une constante similaire permet de décrire l'interaction du Bi avec le DTPA, le CHX-A-DTPA et le CHX-A-DTPA lié à l'IgG.

Nous avons montré de manière expérimentale que la spéciation du Bi dans le sérum est contrôlée par la fraction protéinique. La description quantitative est réalisée en considérant que la transferrine est la protéine principale à prendre en compte dans la spéciation. Un modèle simple, basé sur la loi d'action de masse, a été mis au point permettant de prédire l'efficacité d'un agent chélatant à complexer le Bi en condition sérique. D'après ce modèle, dans le cas du DTPA, du CHX-DTPA ou du CHX-DTPA lié à l'IgG, la constante de complexation ($10^{35,5}$) est si élevée que des quantités infimes de ligands peuvent efficacement entrer en compétition avec les protéines contrôlant la spéciation Bi dans le sérum humain. Toutefois, en tenant compte de la présence des cations majeurs du sérum, et notamment du Fe(II), ces ligands ne sont pas suffisamment sélectifs pour complexer le Bi, la compétition entre le Bi et le Fe étant trop importante. En conséquence, dans l'objectif d'une utilisation du générateur *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$, le CHX-DTPA n'est pas suffisamment sélectif pour limiter le relâchement du ^{212}Bi dans l'organisme. Ces résultats ont été confirmés par des tests *in vitro*.

Cette étude a fait l'objet d'une publication, présentée dans le chapitre suivant.

3. Article 1

Cet article va faire l'objet d'une publication dans le journal *Dalton transaction* (soumis prochainement). Les numéros des figures, tableaux et références de ce chapitre renvoient à ceux de l'article.

Complexation of Bi by CHX-DTPA-bound IgG in blood serum

Abstract

The *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ generator is potentially interesting in applications in targeted alpha therapy. The principle is based on the stable binding of alpha emitting radionuclides to disease selective carrier molecules, such as antibodies or peptides. One main limitation is a significant part of Bi escaping from the carrier molecule due to the radioactive transformation $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$. The objective of the present work is to assess whether vector-bound CHX-DTPA may be able to catch released Bi to limit toxic effects. CHX-DTPA was bound to IgG protein to mimic a model conjugate and the stability was studied *in vitro* in blood serum by ultrafiltration. To show that the fixation of CHX-DTPA on the protein IgG does not affect the coordination properties of the ligand, TRLFS experiments were realized with Cm. Furthermore, the similar constant observed between Bi/CHX-DTPA and Bi/IgG-bound CHX-DTPA proves that the effect of the charged protein surface on the complexation constant is negligible. A similar stability constant can describe interaction between DTPA, CHX-DTPA and IgG-bound CHX-DTPA. The complexation constant between Bi and compounds is high enough for allowing ultra trace amounts of the ligand to efficiently compete with the serum proteins controlling Bi speciation in blood plasma conditions. However, it could not “catch” Bi in the blood serum because of the strong competition between Bi and Fe(II) for the ligand. As a result, CHX-DTPA is not selective enough to limit Bi release in the body when the *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ generator is considered.

Key words: bismuth, curium, serum, speciation, DTPA, alpha therapy

Introduction

Bismuth-212 (^{212}Bi) is a potentially interesting α -emitting radionuclide for targeted alpha therapy (TAT) ¹. The principle is based on the stable binding of alpha emitting radionuclides to disease selective carrier molecules, such as antibodies or peptides ². The challenge is to deliver the radioactive isotopes to the disease target with the objective to find the right balance between toxicity and anti-tumor effect.

Considering its short half-life ($T_{1/2} = 60.6$ min), ^{212}Bi is limited to situations where the labeled carrier molecule rapidly reaches its target. To minimize the probability of released Bi(III), an interesting method is to use its parent, lead-212 (^{212}Pb) ($T_{1/2} = 10.6$ h), which will generate *in vivo* ^{212}Bi . Literature data show that the classical chelation approach, used to bind the radionuclides to the carrier molecules, does not work ³. Indeed, even if DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) (Figure 1) is a good chelating agent for Bi and Pb, a significant part of Bi escapes from the carrier molecule as a result of the radioactive transformation $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ and the formation of highly ionized daughter atoms after the Auger electrons emission ³.

An interesting alternative is to use liposomes ^{4, 5}. Once ^{212}Pb is encapsulated in its internal compartment, the phospholipidic membrane prevents Bi(III) release provided by the fact that the liposome size is large enough (~100 nm). Another approach would consist in fixing some “free” chelating agents at the surface of the carrier molecule for “catching” Bi(III) expelled in the blood serum after $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ transition which was already tested with success for the long-lived alpha emitter ^{225}Ac to control the daughter nuclide chains⁶. This approach is challenging since the chelating agent must complex Bi(III) in a medium containing competitor metal ions and strong complexing agents in more important quantity. The chosen molecule must therefore be selective and strong enough for catching Bi in a dynamic system giving importance of both kinetic and thermodynamic parameters.

Among the different chelating agents developed for application of Bi(III) isotopes (^{212}Bi and ^{213}Bi) in TAT, CHX-DTPA (N-[(R)-2-Amino-3-(p-aminophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2-diamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid) (Figure 1) fulfils the requirement for a rapid Bi(III) complexation and for *in vivo* stability when conjugated to protein ¹. Currently, clinical studies using the isotope ^{213}Bi ($T_{1/2} = 46$ min) that can be made available to hospitals via a radionuclide generator loaded with its mother nuclide ^{225}Ac ($T_{1/2} = 10$ days) are the most advanced.

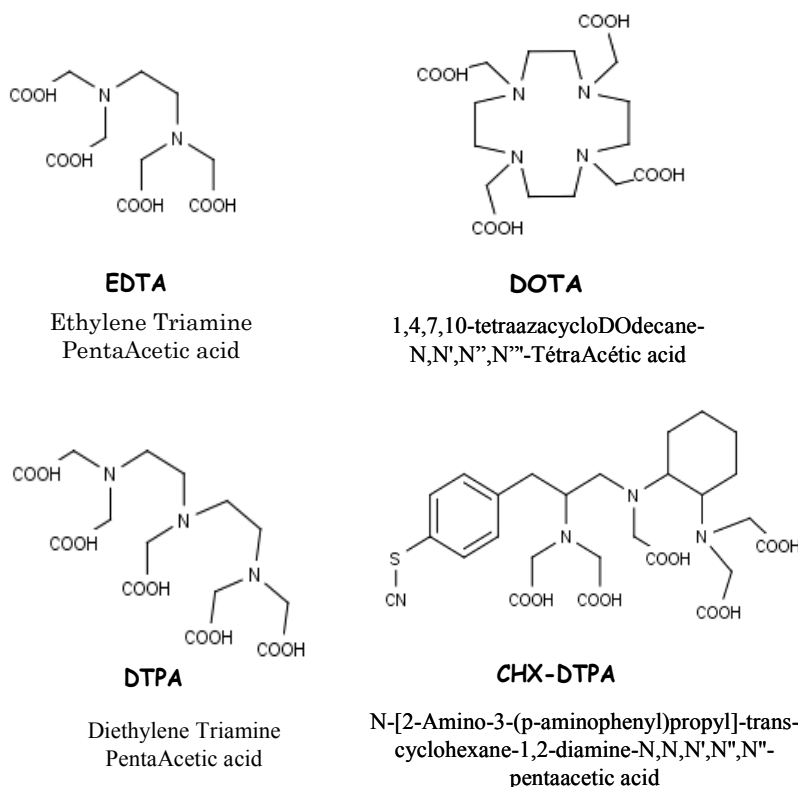


Figure 1. Ligands used for Bi complexation

The objective of the present work is to assess whether CHX-DTPA may be as well a good candidate for the $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ generator, i.e. whether the chelating agent can complex Bi(III) *in vivo*. CHX-DTPA was bound to a immunoglobulin (IgG) protein to mimic a model conjugate and Bi/CHX-DTPA-IgG interaction was studied in blood serum to contribute to answer the question raised. The experimental results were confronted to modelling results based on the law of mass action by using published data describing Bi(III)/serum components interaction ^{7, 8} and IgG-bound CHX-DTPA complexation constant determined in the present study. We were notably interested in assessing whether Bi/CHX-DTPA interaction is similar when CHX-DTPA is free or bound to the protein. To improve the comprehension of the system, information were obtained at the molecular level with the fluorescent probe curium (Cm) by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS).

Results

Complexation of Bi by CHX-DTPA

Bi complexation by CHX-DTPA was little studied; only Pippin *et al.* reported the stability constant at pH 7 and amounting to $\log K = 35.5$ ($I = 0.1$ M). Complementary experiments were performed in the present work with both CHX-DTPA and DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid), this latter being used as a good model compound for which a stability constant of $\log K = 30.7$ ($I = 0.1$ M) is recommended by the NIST database¹⁰. The systems were studied by the competition method with EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)⁹ in the pH range 5-7. The results are presented for DTPA in Figure 2.

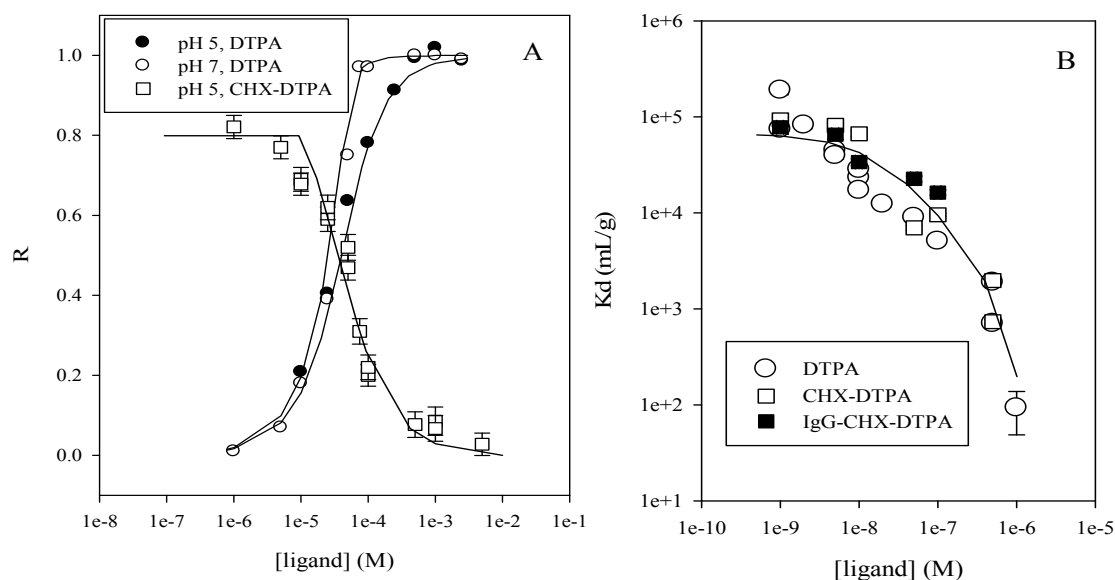


Figure 2. (A) Complexation between Bi and (CHX-)DTPA by the competition method with EDTA determined by UV-spectrophotometry. R represents the ratio between Bi-(CHX)-DTPA and Bi-EDTA concentrations. The lines correspond to the calculation made with the parameters given in Table 1. (B) Complexation between Bi and DTPA / CHX-DTPA and IgG-CHX-DTPA studied by a competition method with Chelex 100. S/L equals to 0.5 g/L, $[Bi] = 1.2 \cdot 10^{-6}$ M. The line represents a prediction made with the constants given in Table 1.

Data can be well reproduced with $\log K$ of 35.2. An error of 0.4 can be estimated considering the error associated to the one describing Bi/EDTA interaction. The slightly higher constant than the recommended one may be related to the $pK_a(5)$ value chosen for the calculation whose precise value is questioned in the NIST database and which strongly influence the complexation constant.

The same experiment was also performed with CHX-DTPA. The data reported in Figure 2 at pH 5 can be well reproduced with $\log K_{1:1:0} = 34.9 \pm 0.4$, in agreement with the one proposed by Pippin *et al.* (Table 1) and recalculated with pKa values recommended for DTPA (see “modelling” part in the experimental section) ⁹. The interaction strength appears therefore similar between Bi/DTPA and Bi/CHX-DTPA. Furthermore, no other species than the 1:1:0 complex, such as the 1:1:1 and 1:1:2 complexes characterized by X Ray Diffraction ¹¹, must be considered in the pH range explored (5-7.4).

Table 1. Complexation constants describing the interaction between Bi, DTPA, CHX-DTPA, and EDTA

Ligand	acid-base properties		complex formation				
	pKa [*]	ref.	Metal ion	complex x:y:z	logK _{xy} ^z	Method	ref.
EDTA	<u>-2.20</u> , <u>-3.11</u> , -6.27, -10.95	10	Bi ³⁺	1:1:0	<u>30.3</u> (0.4)	–	10
DTPA	<u>-2.20</u> , <u>-3.10</u> , <u>-4.85</u> , <u>-9.40</u> , - <u>11.84</u>		Bi ³⁺	1:1:0 +	35.2 (0.4)	EDTA competition	this work
				1:1:0	<u>33.9</u>	–	10
				1:1:1 ^{**}	<u>24.9</u>		
CHX-DTPA	<u>-2.18</u> , <u>-3.32</u> , <u>-5.23</u> , <u>-9.24</u> , - <u>12.30</u>	9	Bi ³⁺	1:1:0 ⁺	<u>35.5</u> (35.1 ⁺⁺) 34.9 (0.4)	EDTA competition	9 this work

footnotes: The underlined values are taken from the literature ($I=0.1M$) and recalculated at $\mu=0$. + the nature of the species is assumed. * pKa values are given only for the carboxyl protons. ** species not relevant in the pH range explored. ++ log K recalculated from pKa values of used in this work for DTPA

The similarity in interaction strength between CHX-DTPA and DTPA was not expected. Solid-state structures showed that CHX-DTPA has a stronger interaction with bismuth than its chemical analogue DTPA (lower Bi coordination number, shorter Bi-ligand bond distances on average) ¹¹. Notably, Bi(DTPA)²⁻ may be labile by comparison to Bi(CHX-DTPA)²⁻ due to the presence of an open coordination site. As a result, the highest *in vitro* stability of Bi/CHX-DTPA as compared to Bi/DTPA is not significantly translated by a higher thermodynamic stability and is mainly related to a higher kinetic stability, *i.e.* the cyclohexyl ring makes the Bi release rate slower.

CHX-DTPA-IgG conjugate characterization

The conjugate presents different potential binding sites, IgG-bound CHX-DTPA and the functional groups at the protein surface. Considering the pH of the serum, carboxylic functions from aspartic and glutamic acids are the most important to consider. A value of $0.88 \cdot 10^{-3}$ mol/g or 132 per IgG is estimated considering a homogeneous statistical distribution within the protein (1320 amino acids and 2 aspartic and glutamic acids for 20 amino acids). The number of CHX-DTPA ligands bound to the protein was determined by fitting the complexation isotherm (in concentration) obtained with yttrium (Y) by a langmuir-type isotherm^{12,13} (Figure 3).

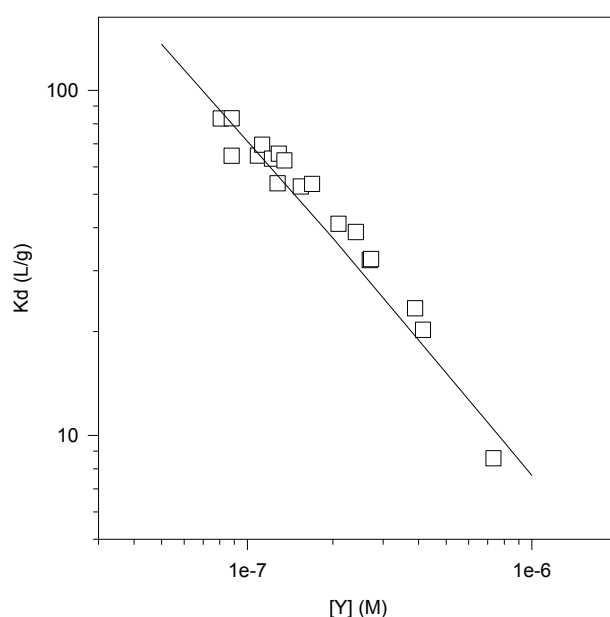


Figure 3. Sorption isotherm of Y(III) on IgG-CHX-DTPA conjugate close to metal ion saturation. The lines are calculated according to the model described in the literature^{12, 13} with a number of CHX-DTPA attached to IgG of 1.2 ± 0.1 (or $8 \cdot 10^{-6}$ mol/g IgG).

Distribution between CHX-DTPA-bound and unbound Y was determined by ion thin layer chromatography (ITLC). The elution medium contains EDTA which complex free Y and Y bound to the IgG binding sites while letting Y bound to CHX-DTPA, the latter complex being enough kinetically stable during the time of the experiment (a few minutes) to avoid a significant decomplexation. A number of chelating agents of 1.2 per IgG was thus obtained. As a result, there is about 10 times more carboxylic groups than CHX-DTPA at the surface of the conjugate.

Coordination properties of IgG-bound and free CHX-DTPA

The strong stability between CHX-DTPA and Bi is explained by the pre-organisation of the molecule and its flexibility allowing Bi to be ideally complexed by the hetero-atoms in a 8-sites coordination sphere¹¹. The possible limitation of the flexibility after binding to the protein was studied indirectly *via* Cm which is used as a probe. ${}^6D_{7/2}' \rightarrow {}^8S_{7/2}'$ emission spectra (peak position, shape) is sensitive to the first coordination sphere around Cm¹⁴ and for a given coordination sphere, to the spatial organization¹⁵. In a similar manner, the lifetime gives information about the number of water molecules in the first coordination sphere which gives indirectly the total coordination number.

Cm complexation by CHX-DTPA-IgG conjugate was studied by TRLFS as a function of the time (Figure 4). The pH was fixed to 5 for avoiding the presence of Cm hydrolysis species¹⁴. The quantitative deconvolution of emission spectra reveals the presence of three distinct species. Their fluorescence characteristics are compared with those obtained with pure species obtained from simple systems (Table 2).

Table 2. TRLFS results

Species	Conditions	λ_{\max} (FWHM) (nm) ^a	Fluorescence Intensity factor ^b	lifetime (μ s)	Estimated number of coordinated H ₂ O molecules (± 0.5) ^{kim96}
Aquo ion Cm ³⁺	pH=5, [Cm] _{tot} =10 ⁻⁷ M, 0.1 M NaClO ₄	593.8 (± 6.4)	1.00	64 \pm 3	9.3
Cm-CHX-DTPA	[CHX-DTPA] _{tot} =8.10 ⁻⁷ M, [Cm] _{tot} =10 ⁻⁷ M, pH=5, 0.1M NaClO ₄	608.6 (± 3.1)	1.81	230 \pm 10	1.9
		603.0 (± 4.5)	0.58		
		590.5 (± 6.0)	0.07		
Cm-IgG	IgG concentration at 1.3 g/L, [Cm] _{tot} =10 ⁻⁷ M, pH=5, 0.1M NaClO ₄	600.3 (± 8.0) ^c	1.3	64 (f) (14 \pm 3) 155 \pm 3 (86 \pm 2) ^d	3.3
Cm-IgG-CHX-DTPA	Conjugate concentration at 0.03 g/L, [Cm] _{tot} =10 ⁻⁷ M, pH=5, 0.1M NaClO ₄	608.6 (± 3.1)	1.4	240 \pm 10	1.8
		603.0 (± 4.5)	0.45		
		590.5 (± 6.0)	0.06		

footnotes: ^a λ_{\max} , wavelength of the emission maximum; FWHM, full-width at half maximum; ^b difference in fluorescence intensity as compared to free Cm; conditions of normalization: [Cm]_{tot}=10⁻⁷M, I=3 mJ, 500 spectra acquisition; ^c Cm-IgG spectrum was obtained by deconvolution using the species distribution obtained by decay curve analysis and the emission spectrum of free Cm; ^d two lifetimes were necessary for a good fitting; the data in brackets correspond to the proportion of the two species; (f) means that the value was fixed for the fitting.

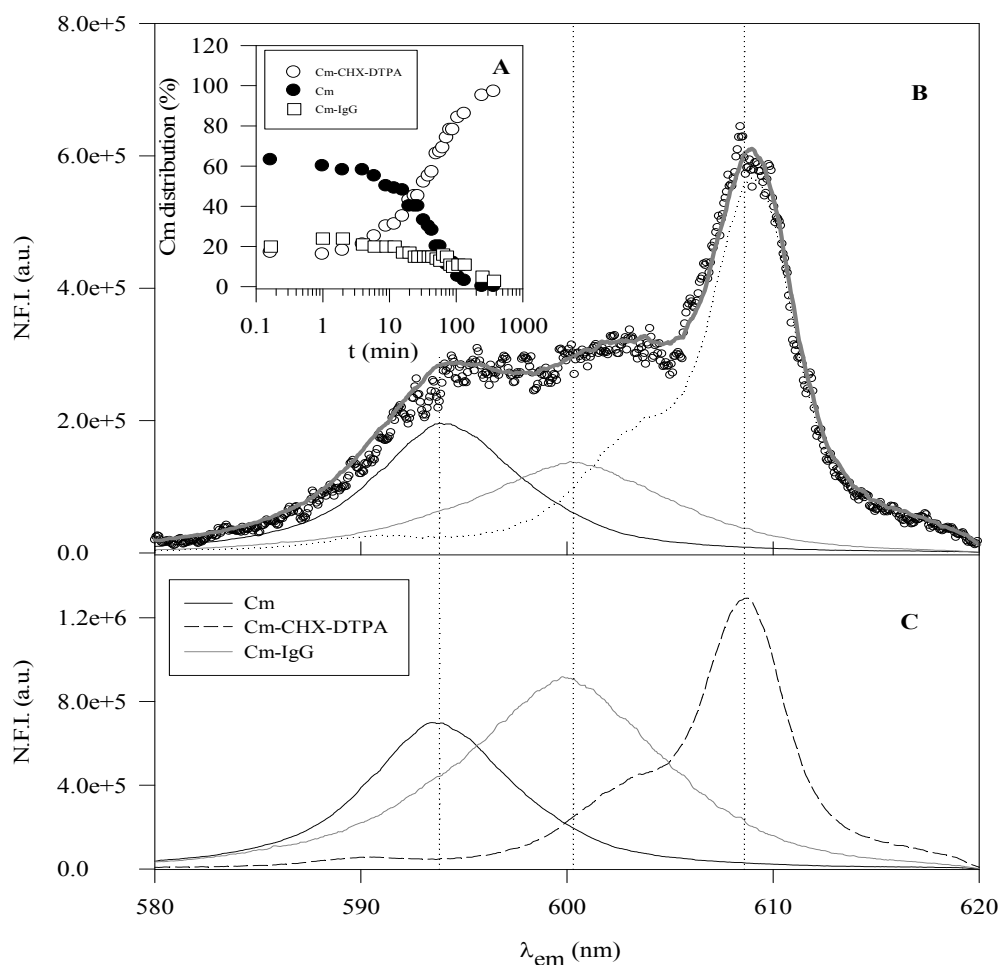


Figure 4. Kinetic of complexation between Cm ($4 \cdot 10^{-8}$ M) and IgG-CHX-DTPA conjugate (0.02 g/L) in 0.1M NaClO₄ at pH=5. Presentation of the normalized fluorescence intensity (N.F.I.), in arbitrary units (a.u.), as a function of the emission wavelength (λ_{em}). Figure 3A reports the evolution of the species distribution with the time. Figure 3B shows an example of spectrum deconvolution obtained at t = 44 min. Figure 3C presents the three pure component spectra of free Cm³⁺ and those obtained with IgG and CHX-DTPA (Table 2).

The peak centred at 593.8 nm corresponds to aquo Cm³⁺. It is characterized by a lifetime of 64 μ s corresponding to 9 water molecules coordinated in the first coordination sphere^{14,16}. No Cm³⁺ is present in the solution at equilibrium. The second species characterized by the peak at 600.3 nm corresponds to Cm in interaction with IgG functional groups. Using the empirical law of Kimura *et al.*¹⁶, this species with a lifetime of 155 μ s would lead to an expulsion of 6.0 ± 0.5 water molecules. Both spectroscopic information are coherent with observation measured in similar conditions with polyelectrolyte containing carboxylic groups¹⁵. This complex is not thermodynamically stable since its contribution becomes negligible at equilibrium ($< 3\%$). However, its formation is rapid (about 20% after

30s) and it contributes to slow down the process formation of the thermodynamically stable species. This latter corresponds to Cm in interaction with conjugated CHX-DTPA. In agreement with the data obtained with free CHX-DTPA, the emission spectrum is strongly shifted to lower energies and presents a visual contribution of three peaks. Note that a stronger interaction between Cm and CHX-DTPA than for Cm and DTPA was also observed by TRLS: the value at the maximum fluorescence intensity for Cm-DTPA (607 nm)¹⁷ is slightly shifted to lower energy compared to Cm-CHX-DTPA (608.6 nm). As for DTPA, the decay curve analysis indicates the expulsion of 7.5 ± 0.5 water molecules from the first coordination sphere of aquo Cm^{3+} . This is in agreement with the well known octadentate coordination structure characterizing the interaction between trivalent metal ions and DTPA or CHX-DTPA¹¹. The fluorescence intensity appears however slightly higher when Cm interacts with free CHX-DTPA than with the conjugated chelating agent (see intensity factor in Table 2). An enhancement of the fluorescence intensity can be explained by an energy transfer from the organic ligand to Cm after laser excitation. These whole results indicate no significant change in the structural organisation around Cm between free and IgG-bound CHX-DTPA and no significant implication of IgG functional groups in the Bi/IgG-CHX-DTPA interaction under equilibrium conditions.

Complexation of Bi by CHX-DTPA-IgG

The competition method with the Chelex 100 resin, based on the method proposed by Schubert¹⁸, was chosen for its simplicity and its applicability for trace metal ion concentrations, a prerequisite giving the weak amount of handleable CHX-DTPA-IgG. Experiments were done in parallel with both DTPA and CHX-DTPA for comparison. The results are presented in Figure 2B. First, in agreement with what was observed by the competition method with EDTA, a similar interaction strength characterizes Bi(III) interaction with DTPA and CHX-DTPA, *i.e.* the K_d value decreases similarly with increasing the ligand concentration. Data analysis with the previously determined complexation constant allows a good quantitative description. Data obtained with IgG bound CHX-DTPA are represented by the black squares. In the concentration range explored, considering the data scattering, one cannot see a clear difference between free and IgG-bound CHX-DTPA.

In conclusion, Bi(III) presents the same affinity for IgG-bound CHX-DTPA than for DTPA and CHX-DTPA. This result agrees with the work of Subramanian & Wolf¹⁹ and with

the assumption behind the spectrophotometric method developed for the determination of the number of conjugated chelating agents ²⁰, *i.e.* the complexation constant describing the interaction between a metal ion and the protein-bound chelating agent is similar to the one characterizing the interaction between the metal ion and the not-bound chelating agent. The result is coherent with the spectroscopic data showing a similar first coordination sphere for Cm-CHX-DTPA and Cm-IgG-bound CHX-DTPA complexes. This result shows as well that electrostatic effects arising from the charged surface of IgG, which is known to be an important factor to consider for the quantitative description between metal ion and polyelectrolytes ¹⁵, has obviously no effect on the complexation constant. This may be explained by the size of the linker between the surface and the chelating agent which is enough long for excluding the molecule from the influence of the electric field.

Study in blood serum

Bi speciation in blood serum.

Metal ions in blood serum²¹ are generally distributed between the protein pool and the fraction containing low-molecular weight complexing agents, and more generally as carbonate complexes. This distribution was studied with Bi by using ultrafiltration. Bi(III) was recovered almost quantitatively (85±9 %) in the filtrate when it is mixed in the presence of 1% CO₂ with the major low-molecular weight complexing agents present in the serum (citrate, phosphates, sulphates) at the concentration given by Ansoborlo *et al.* ²¹. The remaining part of Bi(III) not observed in the filtrate was adsorbed at the membrane surface. When the experiment was done with the blood serum, 100 % of Bi(III) was retained by the membrane, showing an exclusive interaction between Bi(III) and the serum proteins. Human serum transferrin (HSTf) was shown notably to interact strongly with Bi(III) ⁸ and to dominate Bi(III) speciation when HSTf was mixed with human serum albumin (HSA) in conditions relevant to blood plasma conditions ⁷. Based on these results, Bi/HSTf interaction was considered in the present study for describing Bi(III) speciation in the blood serum. To be able to use the published constants, the experiments were done in the presence of 1% CO₂ for having a bicarbonate concentration similar to the one used to get the complexation constants ⁸.

DTPA complexation in blood serum.

IgG-bound CHX-DTPA must compete with HSTf for Bi(III) complexation. According to the simple model which considers Bi(III), the chelating agent and HSTf, we predict 90 % of Bi(III) bound to CHX-DTPA under conditions relevant to TAT, *i.e.* for trace concentrations of Bi(III) (10^{-12} M) and ligand (10^{-11} M, that is the typical expected concentration bound to the protein after dilution of the conjugate in the body). Therefore, HSTf is not a strong competitor. Such a result is however not coherent with the experimental data obtained from the *in vitro* test (Figure 5).

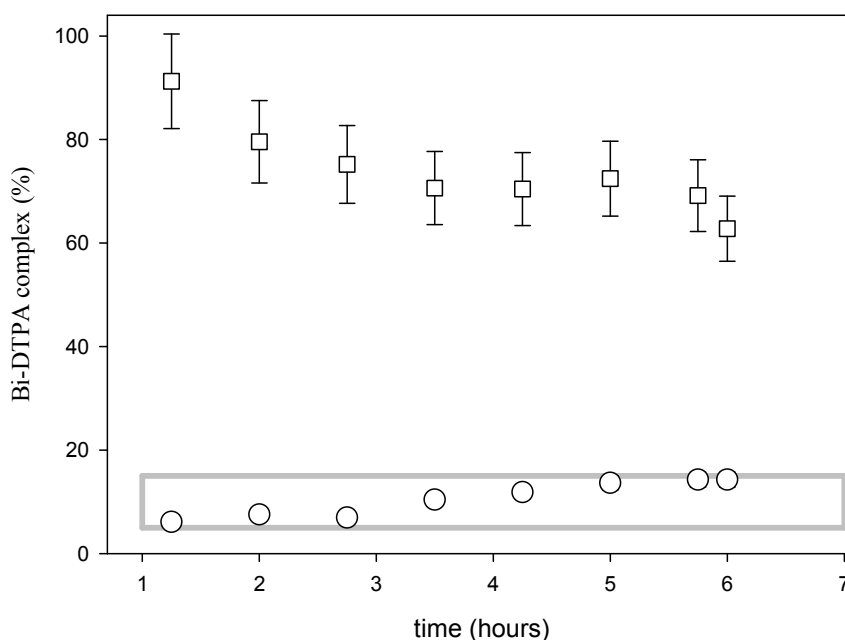


Figure 5. Stability of Bi-DTPA complex in the serum followed by ultrafiltration as a function of the time. DTPA and Bi concentration were fixed at $2 \cdot 10^{-6}$ and 10^{-6} M, respectively. (□) Bi-DTPA was pre-formed before addition in the serum. (○), Bi was added in the serum containing DTPA. The grey area represents the range in percentage of Bi-DTPA complex predicted by the model at equilibrium.

Note that the stability tests were done with DTPA as a model compound for describing Bi/CHX-DTPA-IgG interaction. DTPA was used instead of CHX-DTPA for avoiding an interaction with proteins, and the ligand was not attached to the protein for facilitating Bi speciation. Considering the sensitivity of the ICP-MS and the different dilution steps required for the analysis, Bi(III) and DTPA concentrations were fixed at 10^{-6} and $2 \cdot 10^{-6}$ M, respectively. Whereas Bi-DTPA complex formation was predicted at 100 %, in our experimental conditions, only 15 % of Bi(III) appeared experimentally bound to DTPA at equilibrium (*i.e.* after about 6 hours, corresponding to about 8 periods of ^{213}Bi). The relative stability of the pre-formed complex in the blood serum over time shows the strong kinetic

stability of Bi-DTPA complex allowing the use of such a ligand for an application in TAT with $^{213/212}\text{Bi}$. For CHX-DTPA even a stronger kinetic stability is expected.

Blood serum contains some “free” metal ions (i.e. not bound to proteins) which may as well compete with Bi(III) for DTPA. According to the modelling, and the composition of the major low-molecular weight complexing agents present in the blood serum (citrate, sulphates, phosphates), “free” Ca(II), Mg(II) and Fe(II) exist mainly as M^{2+} , MHPO_4 , ML^- (L^{3-} representing the deprotonated citrate ion) and MHCO_3^+ complexes. In the presence of trace concentrations of DTPA, a few percent of metal ions is expected to be complexed as well with DTPA considering the high stability constants characterizing the interaction between divalent metal ions and DTPA¹⁰. Modelling the data of the *in-vitro* test by introducing a competition between Bi and divalent metal ions for DTPA predicts 5-10 % of Bi bound to DTPA at equilibrium, the rest being mainly complexed with Fe(II). The range of predicted values report uncertainties associated with the concentrations of the key species involved in the reactions. They appear coherent with those experimentally obtained (15 %) and justify the fact that metal ions are the main competitors for Bi complexation with DTPA, and more particularly Fe(II).

Experimental

Chemicals

^{248}Cm was produced *via* a ^{252}Cf source²² and was stored in 0.1 M HClO_4 at a concentration of 10^{-4} M. IgG-CHX-DTPA conjugates was prepared according to the protocol described in the literature from IgG and CHX-DTPA provided by Bio-Rad and Macrocyclics, respectively. A molecular weight of 150000 mol/g was taken for calculation. Blood serum and DTPA were obtained from Lonza and Sigma Aldrich, respectively. All other chemicals were of analytical grade and were used as received without any further purification and all of the solutions were prepared with Milli-Q water.

Experimental methodologies

All experiments were conducted in air-conditioned laboratories ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Experiments realized at pH 5 were done under normal atmospheric conditions. The solutions prepared at pH 7 were done in a glove box filled with N_2 for avoiding the presence of

bicarbonate. Whenever it was possible, pH 5 was preferred. Finally, the data measured with the blood serum were performed under control P_{CO_2} (1%) for maintaining a bicarbonate concentration at 5 mM. Synthetic solutions were prepared in 0.1 M $NaClO_4$ in the presence of acetate or HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) at $2 \cdot 10^{-3}$ M as pH buffers at pH 5 and 7, respectively.

Competition method with Chelex 100 resin.

An aliquot of the resin pre-equilibrated in 0.1 M $NaClO_4$ at pH 5 was mixed in polypropylene tubes with the bulk solution (5 mL) to get a solid-to-liquid ratio (S/L) of 0.5 g/L. After equilibration of the Bi/resin system which took about one day, the ligand was added. Kinetic measurements showed that the time required to reach equilibrium was less than 2 days. The retention factor value (Kd) was calculated according to the following relation:

$$Kd = \frac{[Bi]_{tot} - [Bi]_{sol}}{[Bi]_{sol}} \frac{L}{S} \quad (1)$$

with $[Bi]_{tot}$ and $[Bi]_{sol}$ corresponding to the total concentration of Bi (M) in the system and the Bi concentration in solution after separation of liquid and solid phases, respectively. S corresponds to the dry mass (after drying at 105°C for 2 days) of the material in the sorption tube (in gram). L represents the volume of the liquid phase in the sorption tube (in L). The separation between solid and liquid phases was achieved by sedimentation. A tube containing the liquid phase with the element of interest at the studied concentration was run in parallel to the sorption tube to take into account the possible sorption of Bi(III) on the tube surface.

Competition method with EDTA.

UV-spectra were recorded using a UV-visible UV-2401 PC spectrophotometer from Shimadzu. Bi ($5 \cdot 10^{-5}$ M) was first contacted with EDTA for 3 h before addition of the second ligand. For DTPA competition, EDTA concentration was fixed to 10^{-4} M, and DTPA concentration varied from 0 to 0.01 M, whereas for CHX-DTPA competition, CHX-DTPA concentration was fixed to 10^{-4} M, and EDTA concentration varied from 0 to 0.01 M. Contact times of 12 h for DTPA and 3 days for CHX-DTPA were necessary to reach equilibrium. Excel solver was used for spectra deconvolution from the spectra of Bi-EDTA, Bi-CHX-DTPA and Bi-DTPA previously measured (supplementary information, Figure SI.1.). Concentrations of the Bi complexes were determined *via* the Beer–Lambert law with $\epsilon^{264}(Bi-EDTA) = (8.83 \pm 0.16) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon^{288.8}(Bi-CHX-DTPA) = (1.09 \pm 0.02) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and

$\epsilon^{277.1}(\text{Bi-DTPA})=(8.76\pm 0.19)\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (supplementary information, Figure SI.1.). The extinction coefficients were constant in the pH range explored (5-7).

Time resolved Laser induced Fluorescence Spectroscopy (TRLFS).

The pH was fixed to 5 for avoiding the hydrolysis species formation¹⁴ and to limit the presence of carbonates. The interaction was followed by measuring both lifetimes and the ${}^6\text{D}'_{7/2}\rightarrow{}^8\text{S}'_{7/2}$ emission spectra. The decay rate constants, k_{obs} , and the corresponding lifetimes, $\tau=k_{\text{obs}}^{-1}$, are sensitive to the number of coordinated water molecules, q , in the first coordination sphere^{16, 23}. In the present work, q was determined using the empirical law given by Kimura *et al.*¹⁶ assuming that water molecules are the only quenching agents¹⁴. Lifetime values were determined according to the following relation:

$$I(t) = \sum_i I_0^i \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

with $I(t)$, I_0^i and τ_i being the fluorescence intensity at t , the fluorescence intensity of species i at $t=0$ and the lifetime of species i , respectively.

Details concerning the spectroscopic device as well as details on how spectroscopic data were obtained can be found elsewhere²⁴. Cm species were excited at the F level. For decay curve measurements, fluorescence emission peaks at about 600 nm (${}^6\text{D}'_{7/2}\rightarrow{}^8\text{S}'_{7/2}$) were integrated. Lifetime measurements were started from the longest delay time down to 1 μs . The laser energy was fixed to 2.5 ± 0.5 mJ.

Ultrafiltration tests.

These tests were done to assess Bi speciation in blood serum, *i.e.* to differentiate the fraction of Bi bound to low- (DTPA, carbonate...) and high-molecular weight (HSTf, HSA) compounds. Experiments were performed in dialysis bags (Microcon Millipore, 3 kDa) and the separation was done by centrifugation at 27000 g. Bi concentration in the filtrates was determined by ICP-MS analysis. A blank was systematically done in parallel to assess the amount of Bi adsorbed on the membrane. It was assumed that the separation time (typically 30 minutes) was not sufficient to perturb equilibrium conditions.

Analytical tools

pH measurements were performed using a PHM220 from MeterLab. Organic carbon analyses were done on a TOC-V_{CSH} apparatus supplied by Shimadzu. Bismuth analyses were performed by ICP-MS using a XSeries 2 provided by Thermo Fischer (sensitivity limit of 0.1 ppb). The centrifugation experiments were performed using a centrifuge RC6 from Thermo Fisher. The protein concentration was determined using the protein assay kit provided by BioRad using a Microplate Reader from Berthold Technologies.

Modelling

Calculation at equilibrium:

If not otherwise indicated, calculations of metal ion speciation was carried out with the PHREEQC program²⁵. Stability constants for metal ions (Ca(II), Fe(II), Mg(II), Cm(III), Bi(III)) with organic molecules (citrate, DTPA) are taken from NIST database¹⁰. The constants given at an ionic strength (I) of 0.1 M were extrapolated at zero ionic strength using the Truncated Davies equation²⁶. There is only one study reporting pKa values for CHX-DTPA; they pretty agree with those recommended for DTPA (Table 1). It is predictable if we consider their very close structures. In the present study, to allow a direct comparison between complexation constants, we use the same pKa values reported for DTPA to describe acid-base properties of CHX-DTPA. We do not consider interaction between Bi and inorganic (hydroxide, carbonates, phosphates...) and organic (acetate, citrate ...) ligands present in the studied media in front of the strong interaction between Bi and DTPA, CHX-DTPA and HSTf. All other constants are taken from the PHREEQC thermodynamic database given with the software.

The formation of the complex x:y:z M:L:H was defined according to the following relation:



with n corresponding to the number of acid protons presenting acid-basic properties in the pH range considered for complexation studies, z the number of protons implied in the reaction, x the number of metal ion complexed and finally y the number of ligand complexing M. The complexation constant is defined by:

$$K_{xy}^z = \frac{(M_x L_y H_z^{(mx-ny+z)+})}{(M^{m+})^x (LH_z^{(n-z)-})^y} \quad (4)$$

where (i) represents the activity of species i.

Bi interaction with human serum transferrin was described by a Langmuir-type model (see below) with the published constants applicable for the present conditions of the study, i.e. at the physiological pH for a bicarbonate concentration of 5 mM^{8,27}.

Y / IgG-CHX-DTPA interaction.

It was described by a Langmuir-type model¹². It considers the reaction of Y with CHX-DTPA – bound IgG to form a 1:1 complex. The total concentration of sites (in M) at the surface, [S]_{tot}, is given by:

$$[S]_{tot} = S \cdot C_m \quad (5)$$

Where C_m is the IgG concentration (in g/L) and S the site capacity (in mol/g). The following relation can be obtained:

$$Kd = \frac{KS}{1 + K[Y]_{sol}} \quad (6)$$

where K represents the conditional constant describing the equilibrium, and [Y]_{sol} “free” Y concentration measured in solution at equilibrium. In the region of high concentrations, when the surface is close to saturation, Eq. (6) reduces to:

$$Kd = \frac{S}{[Y]_{sol}} \quad (7)$$

logKd decreases with increasing log[Y]_{sol} by slope -1.

Fittings.

All fittings carried out in this work including fluorescence decay curves (eq. (2)) and S (eq. (7)) were made using the fitting procedure of SigmaPlot software using the Marquardt-Levenberg algorithm (version 2.0, Jandel Co.)²⁸. Uncertainties associated with the fitting parameters were determined by the software.

Conclusions

The difference in coordination sphere between Bi/DTPA and Bi/CHX-DTPA allows a higher kinetic stability of the complex rather than an increase in the stability constant. TRLFS experiments realized with Cm show that the fixation of CHX-DTPA on the IgG protein does not affect the coordination properties of the ligand. Furthermore, the similar complexation constant observed between Bi and CHX-DTPA and IgG-bound CHX-DTPA shows that the effect of the charged protein surface on the complexation constant is negligible. The complexation constant of $\log K = 35.2$, characterizing the interaction between Bi and DTPA, CHX-DTPA or IgG-bound CHX-DTPA, is high enough for allowing an efficient competition between ultra trace amounts of the chelating agent with serum proteins in blood plasma conditions for Bi. However, taking into account the presence of Fe(II), the chelating agent is not able to “catch” Bi in the blood serum. As a result, CHX-DTPA is not selective enough to limit Bi release in the body when the *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ generator is considered. The model used in this work to predict Bi(III) speciation can be used to select others chelating agents available for Bi chelation in human serum. To avoid competition with HSTf, the stability constant Bi/ligand should be higher than $\log K > 28.7$. Moreover to avoid competition between Bi(III) and Fe(II), the ratio between stability constants Bi/ligand and Fe/ligand should be superior to 3.

Acknowledgements

We thank Urska Repinc for the measure of the experimental data reported in Figure 3.

Abbreviations

DTPA: diethylene triamine pentaacetic acide

CHX-DTPA: N-[(R)-2-Amino-3-(p-aminophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2-diamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid

EDTA: ethylendiamine tetraacetic acid

DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acide

TAT: targeted alpha therapy

HEPES: N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

TRLFS: time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy

HSA: human serum albumin

HSTf: human serum transferrin

TAT: targeted alpha therapy

REFERENCES

1. S. B. Hassfjell, M.W., *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 2019.
2. A. Morgenstern, Abbas, K., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C., *Curr. Radiopharm.*, 2008, **1**, 135.
3. S. Mirzadeh, Kumar, K., Gansow, O., *Radiochim. Acta*, 1993, **60**, 1.
4. G. Henriksen, Schoultz, B., Hoff, P., Larsen, R., *Radiochim. Acta*, 2003, **91**, 109.
5. A. Le Du, M. Mougin-Degraef, E. Botosoa, A. Rausche, A. Faivre Chauvet, J. Barbet, G. Montavon, *Radiochim. Acta* 2011, **99**, 1-7.
6. J. Fitzsimmons and R. Archer, *J. Label Compd. Radiopharm.*, 2007, **50**, 147-153.
7. S. K. Y. Sun H., *J. Inorg. biochem.*, 2003, **94**, 114-120.
8. H. S. Li, PJ; Sun, HZ, *J. biol. Chem.*, 1996, **271**, 9483-9489.
9. C. G. Pippin, Ensor, D.D., Brechbiel, M.W., Southeast-Southwest Regional Meeting of the American Chemical Society, New Orleans, LA, 2000.
10. A. E. M. R.M. Smith, R.J. Motekaitis, *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*, (2004).
11. M. W. Brechbiel, Gansow, O.A., Pippin, G.C., Rogers, R.D., Planalp, R.P., *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 6343.
12. W. Hummel, *Modelling in Aquatic Chemistry*, I. Grenthe and Puigdomenech I. edn., OECD Nuclear Energy Agency, Paris, 1992.
13. G. Montavon, Grambow, B., *New J. Chem.*, 2003, **27**, 1344.
14. K. R. Edelstein, Fanghänel T., Hubert S., *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 948.
15. G. Montavon, Bouby, M., Huclier-Markai, S., Grambow, B., Geckeis, H., Rabung, T., Pashalidis, I., Amekraz, B., Moulin, C., *J. Coll. Inter. Sci.*, 2008.
16. C. G. R. Kimura T., Kato Y., Yoshida Z., *Radiochim. Acta*, 1996, **72**, 61.
17. J. V. Beitz, *Radiochim. Acta*, 1991, **35**, 52-53.
18. J. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951.
19. K. M. Subramanian, Wolf, W., *J. Nucl. Med.*, 1990, **31**, 480.

20. E. D. Brady, Chong, H.-S., Milenic, D.E., Brechbiel, M.W, *Nucl. Med. Biol.*, 2004, **31**, 795.
21. E. Ansoborlo, *Biochimie*, 2006, **88**, 1605–1618.
22. R. Malmbeck, Apsotolidis, C. Carlos, R., Glatz, J.-P., Molinet, R., Morgenstern, A., Nicholl, A., Pagliosa, G., Römer, K., Schädel, M., Sätmark, B., Trautmann, N., *Radiochim. Acta*, 2001, **89**, 543.
23. J. W. D. Horrocks, Sudnick, D.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 334.
24. Rabung T., Schild, D., Geckeis H., Klenze R., Fanghänel, T., *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 17160.
25. D. L. Parkhurst and C. A. J. Appelo, *User's guide to phreeqc—a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations*, 1999.
26. C. W. Davies, *Ion association*, Butterworths, Washington D.C., 1962.
27. K. Y. S. H. Sun, *J. Inorg. biochem.*, 2003, **94**, 114-120.
28. S. Software, *SigmaPlot 10 Scientific Graphing Software*, (1993), Point Richmond.

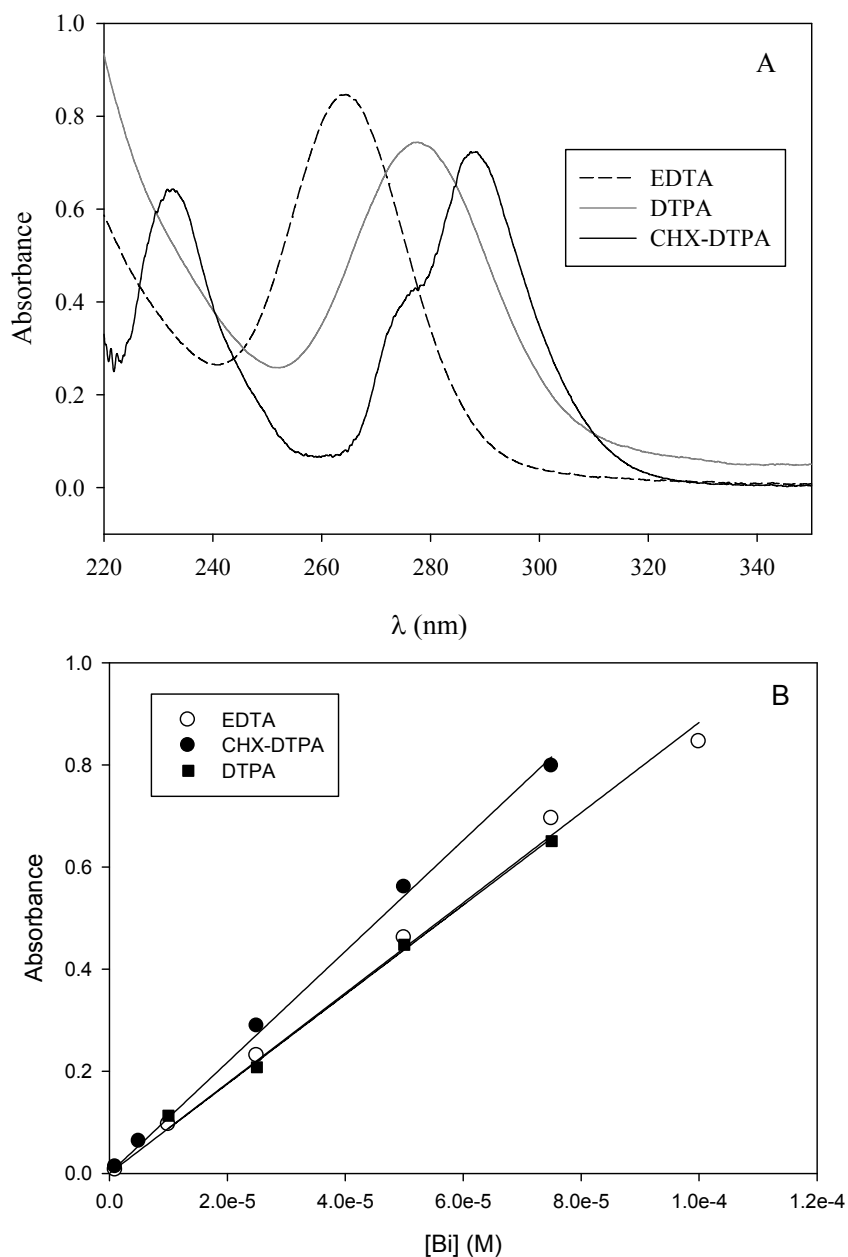


Figure SI 1. (A) UV spectra of Bi complexed with the different chelating agents studied. $[Bi]=10^{-4}$ M, pH=5, $[EDTA]=1.3 \cdot 10^{-4}$ M, $[CHX-DTPA]=[DTPA]=10^{-4}$ M, 0.1 M $NaClO_4$. (B) Absorbance measured at 264.0, 288.8 and 277.1 nm as a function of bismuth concentration for $[EDTA]=1.3 \cdot 10^{-4}$ M, $[CHX-DTPA]=[DTPA]=10^{-4}$ M respectively. The lines are fitted curves with $\epsilon^{264.0}$ (Bi-EDTA) $= (8.83 \pm 0.16) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon^{288.8}$ (Bi-CHX-DTPA) $= (1.09 \pm 0.02) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and $\epsilon^{277.1}$ (Bi-DTPA) $= (8.76 \pm 0.19) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

III. Approche par encapsulation

La deuxième approche envisagée pour permettre la vectorisation du générateur $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ est une approche par encapsulation dans des vésicules artificielles. Les liposomes, de part leur propriété d'encapsulation, ont été choisis pour cette étude.

1. Objectifs de cette étude

Comme nous l'avons vu précédemment, le générateur *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ semble particulièrement prometteur pour la radiothérapie α ciblée. Cela nécessite cependant de trouver un système de fixation de ces deux radioisotopes qui permettra leur vectorisation *in vivo*. Dans le cadre de cette étude, nous proposons l'utilisation de liposomes pour encapsuler et véhiculer le générateur $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$.

Le principe est d'encapsuler le ^{212}Pb dans le cœur aqueux du liposome, sa taille étant suffisamment grande pour retenir encapsulé le ^{212}Bi formé après décroissance du ^{212}Pb et suffisamment petite pour permettre au rayonnement α de « sortir » et d'irradier la cellule cible. Les liposomes utilisés ont été définis par l'unité INSERM U892. Ils présentent notamment des ligands organiques DTPA dans le compartiment interne et greffés à leur surface (figure 21). Les ligands présents à la surface des liposomes seront utilisés pour vectoriser les liposomes selon la technique A.E.S (Affinity Enhancement System). Celle-ci est une technique de préciblage qui repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonal bispécifique dont un bras reconnaît un antigène exprimé par les cellules tumorales, et l'autre une molécule de bas poids moléculaire (haptène) présent à la surface du liposome. Des études ont montré qu'après complexation avec de l'indium, les complexes formés pouvaient servir d'« étiquette » de reconnaissance pour certains anticorps bispécifiques [60].

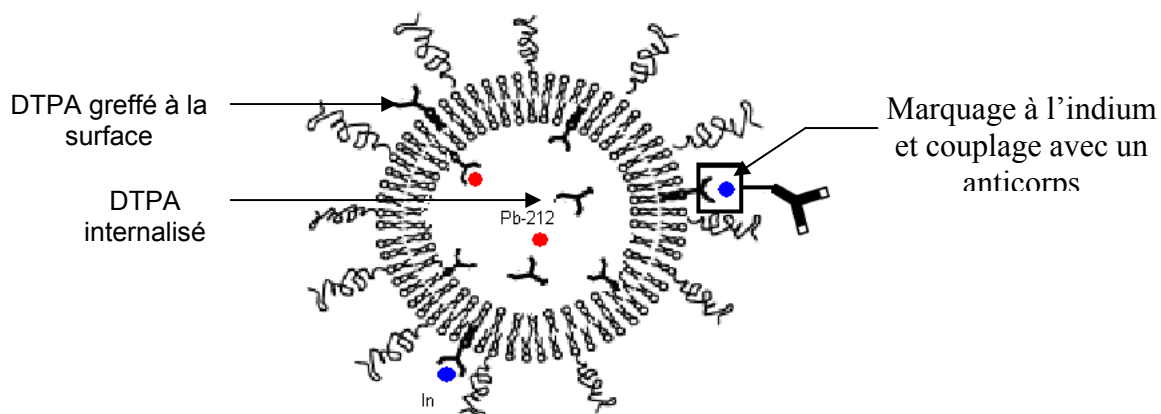


Figure 21 : Représentation schématique des liposomes utilisés

L'objectif de cette étude consiste à définir une méthodologie expérimentale permettant le radiomarquage de liposomes en considérant les étapes clés suivantes : (1) le marquage en surface des liposomes avec de l'indium et l'encapsulation active du ^{212}Pb ; et (2) l'étude de la stabilité *in vitro* des marquages réalisés. Ces deux parties font l'objet de deux articles présentés dans les parties suivantes.

2. Encapsulation du générateur $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ dans les liposomes

Avant de réaliser l'encapsulation du ^{212}Pb dans les liposomes, une première étape est nécessaire. Elle consiste à saturer les sites DTPA présents à la surface des liposomes avec de l'indium, l'espèce In-DTPA formée servant de sites de reconnaissance pour la vectorisation. Cette étape est réalisée au préalable afin d'éviter une complexation du ^{212}Pb par les DTPA de surface (figure 21). Une méthode rapide et simple a été mise en place pour réaliser ce marquage.

De nombreux articles portent sur l'encapsulation active de radioisotopes dans des liposomes. Le principe utilisé est le suivant : il consiste dans un premier temps à former un complexe neutre métal-X, qui par des phénomènes de diffusion pourra être incorporé dans le compartiment aqueux du liposome. Le ligand présent à l'intérieur, permettra alors de piéger le radioisotope, par la formation d'un complexe anionique fort qui sera ainsi retenu dans le liposome. Afin d'optimiser l'encapsulation du ^{212}Pb dans les liposomes, différents chélates (le DCP (acide 1,10-phenantroline-2,9-dicarboxylique), le BAL (British Anti Lewisite ou dimercaprol), l'acétate de sodium, et l'A23187 (calcymicine)), à caractères hydrophiles différents ont été testés ainsi que divers paramètres (température, concentration en lipides, en DTPA, en Pb...), et différentes formulations de liposomes. Cette étude a été réalisée avec du

Pb froid, le ^{212}Pb servant uniquement de traceur radioactif. Les résultats obtenus ont montré qu'aucun agent complexant n'était nécessaire à l'encapsulation du ^{212}Pb . Celle-ci se fait naturellement, par diffusion du Pb à travers la bicouche lipidique, via les propriétés de perméabilité de la bicouche lorsque la température augmente.

Ces études ont également mis en évidence que les paramètres clés influençant l'encapsulation du ^{212}Pb dans les liposomes sont la température et la concentration en DTPA présente dans le compartiment interne. L'augmentation de la température va entraîner une diminution de l'épaisseur de la bicouche, facilitant l'encapsulation du Pb. De plus, le DTPA est apparu comme étant la force motrice permettant l'encapsulation. En effet, on a pu observer que plus la concentration de DTPA internalisée est importante, meilleur est le rendement d'encapsulation. Les conditions expérimentales optimisées, en vue d'une application clinique, sont les suivantes : $[\text{Pb}] = 10^{-7} \text{ M}$, $[\text{lipides}] = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, une température de 65°C pendant 1h, avec un taux d'encapsulation de l'ordre de 75%, correspondant à 2–3 atomes de ^{212}Pb encapsulés par liposome. Cette étude a fait l'objet d'un article présenté dans le chapitre suivant.

3. Article 2

Cet article va faire l'objet d'une publication dans le journal *Radiochimica Acta* (accepté, en cours de publication). Les numéros des figures, tableaux et références de ce chapitre renvoient à ceux de l'article.

***In vivo* ^{212}Pb / ^{212}Bi generator using Indium–DTPA–tagged liposomes**

Abstract

Indium–DTPA–tagged liposomes were studied in the present work as carriers of *in vivo* ^{212}Pb / ^{212}Bi generator to be used in targeted alpha therapy. The liposomal uptake of ^{212}Pb , into preformed liposomes, was investigated using different lipophilic chelate (DCP, 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL), sodium acetate, and A23187), as a function of various parameters (temperature, concentrations of lipids, Pb, DTPA,...) with ^{212}Pb as a tracer. Different formulations of liposomes were tested to evaluate the radiolabeling efficiency. No complexing agent was necessary for the passage of Pb^{2+} through the membrane. It occurs naturally *via* a partial permeability of the lipid bilayer which increases with the temperature. A complexing agent (DTPA) appears necessary to concentrate Pb in the internal compartment of the liposomes. Conditions were found ($T = 65^\circ\text{C}$, internal DTPA concentration of 0.025 M, pH 7.4, ...) yielding a high and rapid uptake of ^{212}Pb in liposomes. The protocol established provides a novel method for the efficient entrapment of about 2-3 Pb atoms per liposome with a yield of 75% in conditions relevant for nuclear medicine.

Introduction

^{212}Bi is a potentially interesting α -emitting radionuclide for targeted alpha therapy [1]. The principle is based on the stable binding of alpha emitting radionuclides to disease selective carrier molecules, such as antibodies or peptides [2]. The challenge is to deliver the radioactive atoms to the target with the objective to find the right balance between toxicity and anti-tumor effect.

Considering its short period ($t_{1/2} = 60.6$ min), ^{212}Bi is limited to situations where the labeled carrier molecule rapidly reaches its target. To expand the range of applications, an interesting method is to use its parent, ^{212}Pb ($t_{1/2} = 10.6$ h), which will generate *in vivo* ^{212}Bi . Data in the literature show that the classical chelation approach, used to bind the radionuclides to the carrier molecules, does not work [3]. Although the chelating agent used (DOTA) is known to form strong complexes with both Bi and Pb, a significant part of Bi

escapes from the carrier molecule as a result of the radioactive transformation $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ and the formation of highly ionized daughter atoms after the Auger electrons emission [3].

An interesting alternative is to use liposomes [4]. Once ^{212}Pb is encapsulated in its internal compartment, the phospholipidic membrane prevents Bi release provided that the liposome size is large enough (~ 100 nm). This approach is studied in the present paper with liposomes designed to treat residual cancer diseases with a two step pretargeting strategy (Affinity Enhancement System) [5,6]. These liposomes present at their surface polyethylene glycol (PEG) to prevent fast elimination and DTPA chelating agents that are recognized, once complexed with indium, by the pretargeted bispecific anti-tumor x anti-indium-DTPA antibody.

Active encapsulation of ^{212}Pb was studied as a function of different parameters (pH, nature of the chelating agent used for the active encapsulation, temperature, metal ion concentration, liposome concentration, concentration of encapsulated DTPA) with the objective to optimize the labeling protocol in terms of time, encapsulation yield and specific activity. To help the comprehension of the encapsulation process, different liposome formulations were tested (Table 1)

Material and methods

Reagents

All reagents were of analytical grade. All solutions were prepared using Milli-Q water and all experiments were conducted in air-conditioned laboratories ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), except otherwise indicated. Liposomes of various compositions were used (Table 1).

Table 1: Composition of liposomes and ²¹²Pb encapsulation yield

Experimental conditions: [BAL] = 10⁻⁴ M, lipid concentration of 2.5.10⁻³ M, Pb concentration of 10⁻⁷ M; external medium: 0.1 M NaCl, 2.10⁻³ M HEPES (pH = 7.4).

liposome number	liposome composition	internal volume	lead encapsulated (%); T=65°C	lead encapsulated (%); ambient temperature
A	DSPC (68%), cholesterol (30.5%), DSPE (1.5%)	0.1 M NaCl, 2.10 ⁻³ M HEPES (pH=7.4)	24.6 ± 8.5	3.0 ± 1.2
B	DSPC (68%), cholesterol (30.5%), DSPE (1.5%)	0.025 M DTPA, 0.1 M NaCl, 2.10 ⁻³ M HEPES (pH=7.4)	74.9 ± 7.6	69.7 ± 9.5
C	DSPC (68%), cholesterol (30.5%), DSPE-DTPA (1.5%)	0.1 M NaCl, 2.10 ⁻³ M HEPES (pH=7.4)	56.3 ± 5.3	5.6 ± 0.9
D	DSPC (68%), cholesterol (30.5%), DSPE-DTPA (1.5%)	0.025 M DTPA, 0.1 M NaCl, 2.10 ⁻³ M HEPES (pH=7.4)	72.7 ± 3.2	12.9 ± 1.1
E	DSPC (68%), cholesterol (30.5%), DSPE-DTPA (1.5%), PEG	0.025 M DTPA, 0.1 M NaCl, 2.10 ⁻³ M HEPES (pH=7.4)	78.5 ± 2.5	52.0 ± 3.1

Footnotes: BAL = 2,3-dimercapto-1-propanol; HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine] ethanesulfonic acid; DSPC = 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; DSPE-DTPA = 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol amine-diethylenetriamine pentaacetic acid

The various constituents were mixed in chloroform / methanol (9/1 v/v) mixture in a 10 mL round bottom flask. A lipid film was obtained by evaporation of the solvent in a rotary evaporator. The hydration of the lipid film was performed by addition of 1 mL of the aqueous phase. After a treatment by ultrasounds for 2 min, liposomes were calibrated in size by extrusion on polycarbonate membranes to obtain an average diameter of 100 nm [7]. The size was systematically checked by dynamic light scattering with the Autosizer 4700 apparatus (Malvern Instrument SA) [8].

Liposomes prepared in the presence of DTPA were further purified to remove non encapsulated DTPA by membrane filtration (Centrisat, 20 kDa). The purification step was monitored by UV-spectrophotometry *via* the analysis of the Bi-DTPA complex ($\epsilon[\text{Bi-DTPA}]^{2-} = 8758 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ($\lambda = 278 \text{ nm}$)). The Bi-DTPA complexation constant ($\log K = 30.3$, $I = 0$) is high enough to allow a quantitative complexation of DTPA [9]. The liposomes

were stored at 4°C and the stock solution was never older than 3 months. The liposome concentration is given as the content of lipid in mol/L and was determined using a calibration curve of measured organic carbon content as a function of lipid concentration. The number of liposomes per unit volume, calculated at about 10^{14} vesicles per mL (0.02 M of lipids), was estimated from the formula given in [10].

450 kBq of ^{228}Th was provided by AREVA in 2006. A $^{228}\text{Th} / ^{212}\text{Pb}$ generator was prepared according to Narbutt & Bilewicz [11] using DOWEX-50x8 cation exchanger. ^{228}Th was adsorbed on the resin in 0.01 M HCl, while ^{212}Pb was stripped from the column using 1 M HCl. With time, some problems of purity were observed, probably due to radiation damage of the resin. Another purification step was then necessary and was performed using Chelex-100 [12]. Pb sorption was done at pH 5 in an acetate pH buffer solution [13]. After washing (about 30 times the void volume), ^{212}Pb was desorbed from the column with 5 M HNO_3 . The solution was then evaporated to dryness and the residue dissolved with 5 mM HCl to obtain a stock solution of 20 kBq/mL.

Experimental methodologies

Encapsulation studies.

Experiments were performed in 1.5 mL glass tubes. A holder in aluminium controlled by a heater was specifically designed to allow working at different temperature (25 – 150°C). Liposomes were first equilibrated in the labeling medium for 1 h before the lead addition (^{212}Pb ~600 Bq (10^{-13} M) and 10^{-9} M of natural Pb in 0.4 mL). ^{212}Pb was only use as a tracer. For some experiments, natural Pb was added to reproduce conditions relevant in nuclear medicine (~100 MBq/L or 10^{-7} mol/L). Preliminary experiments (lipid concentration of 1 mM, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.025 M of encapsulated DTPA, T=65°C) showed that the encapsulation kinetic was rapid, a stable encapsulation yield being obtained after about 1 hour. This time was fixed for all the experiments.

Complexation studies between In and the liposomes.

They were performed in dialysis bags (Microcon Millipore, 3 kDa) composed of two compartments of 0.5 mL (compartment 1) and 1 mL (compartment 2). Once the compartments filled with the indium solution, liposomes (10^{-4} M) were added in compartment 1. The tubes were then shaken and kinetic studies showed that 24 hours of contact were

necessary to reach equilibrium conditions. Preliminary results showed a strong adsorption of liposomes at the surface of the dialysis tubes. The concentration of indium in compartment 1 at equilibrium was thus calculated according to the relation:

$$[\text{In}]_1 = \frac{1.5 \times [\text{In}]_{\text{total}} - 1 \times [\text{In}]_2}{0.5}$$

Where $[\text{In}]_{\text{total}}$, $[\text{In}]_1$ and $[\text{In}]_2$ are the total concentration of indium added in the system and the indium concentrations in compartments 1 and 2, respectively.

Chelex-100.

It was used to monitor ^{212}Pb encapsulation, to purify ^{212}Pb solution and to label the liposomes with indium. Chelex-100 was first washed according to Biesuz et al [13] with 5 M HNO_3 . About 7 g of Chelex-100 was loaded on 1.5x8 cm polypropylene columns and pre-equilibrated with the medium of interest. 0.5 mL of the solution was then injected at the top of the column and the elution was made at a speed of 2 mL/min. It was checked that the liposomes were stripped from the column without significant retention (< 2 %).

Water / octanol extraction.

2 mL of the organic phase was pre-equilibrated with the aqueous medium (2 mL) before ^{212}Pb addition. After 12 hours of stirring, both phases were separated and samples were withdrawn for activity measurements.

Analytical tools

UV-spectra were recorded on a UV-visible UV-2401 PC spectrophotometer from Shimadzu. Organic carbon analyses were done on a TOC- V_{CSH} apparatus supplied by Shimadzu. ^{212}Pb purity was verified by gamma ray spectroscopy with a high purity germanium (HPGe) detector from Canberra. ^{212}Pb activities in the encapsulation experiments were measured by liquid scintillation counting using a Packard 2550 TR/AB Liquid Scintillation analyzer with the Ultima Gold AB scintillation liquid. Indium analysis was performed by ICP-MS using a PQ Excell apparatus provided by VG Elemental (sensitivity limit of 0.1 ppb).

Quantitative analysis

The PHREEQC program [14] was used to simulate the reactions occurring in the studied systems. An input file describing the experimental conditions (medium composition, pH, E and temperature) is created and the species distribution at equilibrium was calculated using the thermodynamic database Llnl (Lawrence Livermore National Laboratory). All the equilibrium constants in the database were extrapolated at zero ionic strength using the Truncated Davies equation [15].

Results and discussion

Pre-labeling of DTPA by In

The objective was to complex indium with DTPA-tagged liposomes, the indium–DTPA complex being the bispecific antibody recognition site for pretargeting. This step was performed prior to ^{212}Pb encapsulation to avoid any complexation between ^{212}Pb and DTPA ligands which would limit the encapsulation yield. The complexation isotherm measured as a function of indium concentration is reported in figure 1.

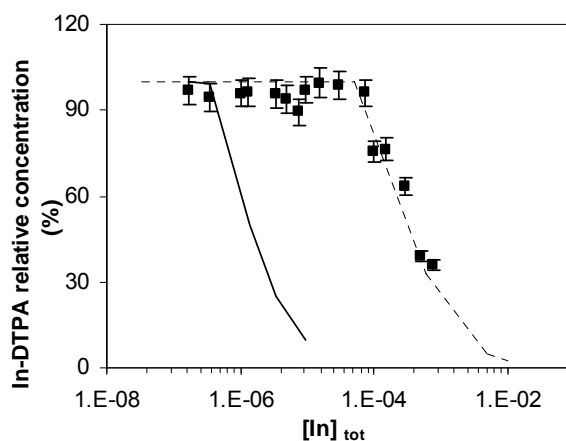


Figure 1: Complexation of indium by DTPA-tagged liposomes.

Lipid concentration = $6 \cdot 10^{-5}$ M, pH = 7.4 ($2 \cdot 10^{-3}$ M, HEPES), 0.1 M NaCl. Squares are experimental data. The lines give the number of interacting sites 10^{-6} M and $2.5 \cdot 10^{-4}$ M for the solid and dashed lines respectively.

Under the studied experimental conditions, the DTPA-tagged liposome saturation starts in the presence of indium concentrations above 10^{-4} M. This is translated by a decrease

in indium complexation. The calculation of data by a Langmuir-type model [16] gives a number of interacting sites of $2.5 \cdot 10^{-4}$ M (dashed line in figure 1), whereas a value of 10^{-6} M was predicted based on the liposome composition (solid line in figure 1). This result indicates the presence of other binding sites at the liposome surface. These sites may be attributed to deprotonated phospholipides P-OH (about 47 for 1 DTPA) and neutral NH_2 or C=O functional groups. In the following, these latter sites and DTPA-tagged liposomes will be designed as non-specific and specific sites, respectively.

It was necessary to find a method to remove non-specifically bound indium (while leaving indium bound to specific sites) as it could compete with ^{212}Pb encapsulation or may be toxic *in vivo*. The method was defined in conditions where indium was in excess (100 for 1 DTPA) and is based on the well-known strong kinetic stability of DTPA complexes with trivalent metal ions [17], i.e. once complexed, the kinetic of de-complexation is very slow. The solution ($[\text{lipids}] = 10^{-2}$ M, $[\text{In}] = 1.5 \cdot 10^{-2}$ M in 0.1 M NaCl), after 20h equilibrium, was passed through a Chelex-100 column at a flow rate of 2 mL/min allowing an efficient retention of free indium and indium bound to the non-specific sites while indium complexed with DTPA-tagged liposomes was eluted from the column. Conditions were obtained where indium concentration measured in the eluted solution corresponded, within experimental errors, to the concentration of DTPA in the DTPA-tagged liposome preparation. We showed as well that another passage of the “purified” solution through the Chelex-100 column did not lead to any significant further indium release. The two experimental observations indicate that the purification process is optimum and lead to indium-DTPA labeled liposomes.

Active encapsulation

According to literature data [4], active encapsulation of metal ions should be obtained by the formation of a lipophilic complex which crosses the membrane of the liposome and by trapping them in the aqueous internal liposome compartment by forming a charged complex with strong chelating agent (figure 2).

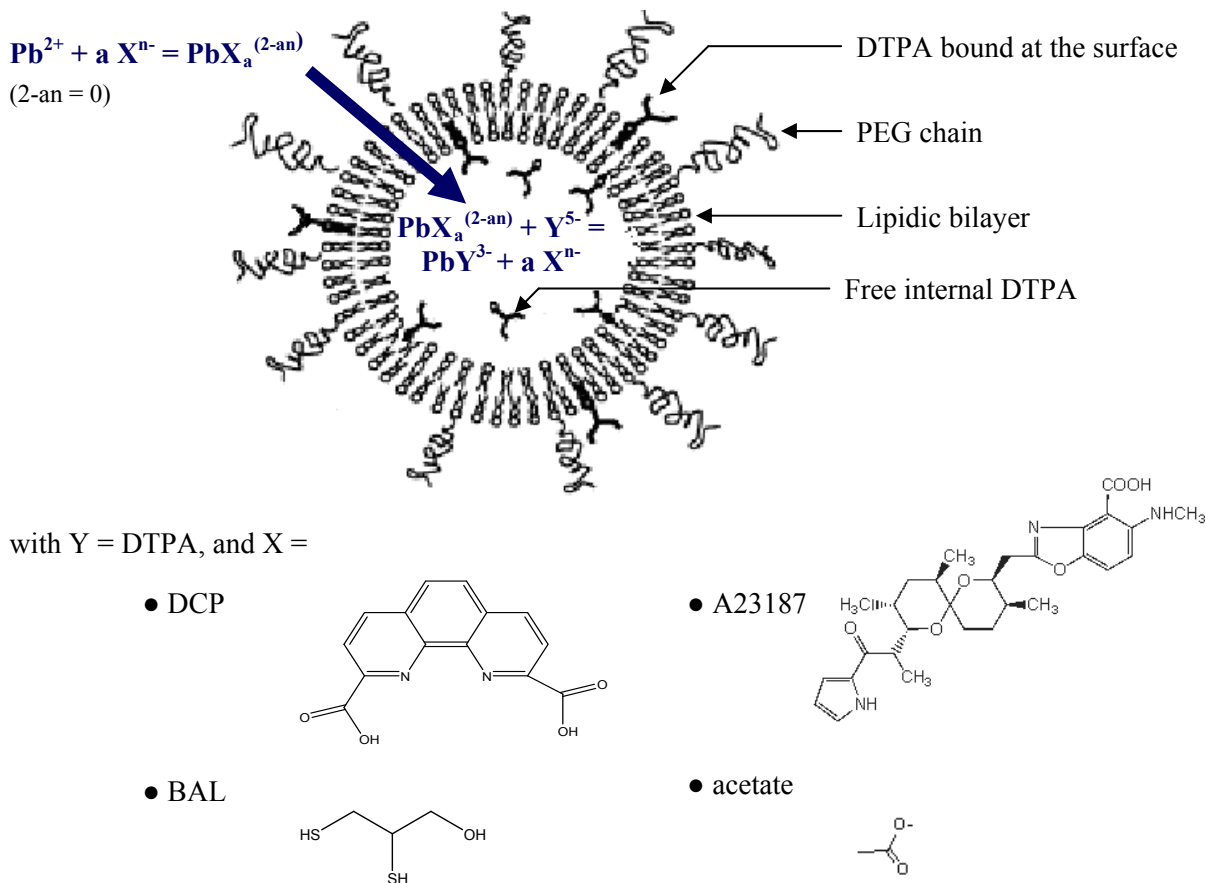


Figure 2: Scheme of the encapsulation; X

^{212}Pb presenting an affinity for the non-specific sites, it was necessary to define a methodology allowing us to distinguish the encapsulated lead with the one adsorbed at the external surface of the liposomes. The same method as that used to prepare indium-labeled liposomes was used. In a dynamic system, we make the hypothesis that the lead adsorbed at the liposome surface is quickly adsorbed by the sites of Chelex-100, while the incorporated Pb is eluted with the liposomes. This is indirectly shown in Table 1 where 97% of Pb is not eluted in conditions where the encapsulation is supposed negligible (liposome A, ambient temperature). The method must also retain lead in the solution and complexed to the ligand used for the encapsulation. This was checked for two temperatures in labeling solution containing no liposomes (Table 2): if one excepts the system containing A23187, Pb is retained by Chelex-100. For A23187, about 12 % passed through the column showing the presence of a relatively kinetically-stable Pb-A23187 complex. In the presence of liposomes, this amount was systematically subtracted from the content of ^{212}Pb eluted to get the percentage of encapsulated lead.

Method optimization

Several parameters can affect the encapsulation [21, 22, 23]: the pH of the external and internal compartments, the nature and concentration of the ligands used for the encapsulation, and the temperature of the experiment. DTPA was selected as the encapsulated ligand used to trap ^{212}Pb in the internal compartment of the liposome [21]. The labeling pH was fixed by default to 7.4 based on the work of Tilcock et al [21]. All other parameters were varied to optimize the labeling protocol in terms of time, yield and specific activity.

Temperature effect.

The temperature plays a crucial role in the encapsulation of radionuclides in liposomes [22]. This is illustrated in figure 3.

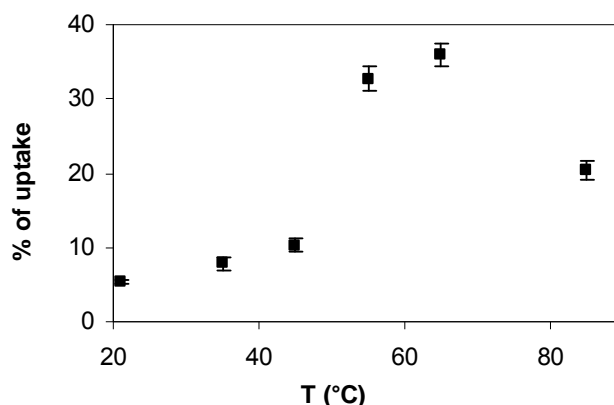


Figure 3: Effect of the temperature on ^{212}Pb encapsulation in liposomes. [Lipid] = 10^{-3} M, pH = 7.4 ($2 \cdot 10^{-3}$ M, HEPES), 0.1 M NaCl, 10^{-5} M CH_3COO^- .

Below 55°C , the encapsulation yield is weak with less than 10% of lead encapsulated. It increases above 55°C to reach a maximum value of 35 % for $T = 70^\circ\text{C}$. This is related to the phase transition temperature (T_m) of the lipids which occurs at 74°C for our liposomes [24]. This results in a decrease of the phospholipidic thickness and the membrane permeability which facilitate the encapsulation of ^{212}Pb . The more the temperature is close to the phase transition temperature, the more the encapsulation is facilitated. However a decrease of encapsulation is observed above 80°C . At 85°C , the temperature is well above the T_m of the lipids; the bilayer becomes disorganized (rotation, flip-flop ...) and much more fluid [8]. As a result, the molecules to encapsulate enter in the inner compartment of the liposomes, and come out just as easily. This may explain the decrease of encapsulation.

DTPA Effect.

According to Tilcock et al [21], DTPA has a crucial role to play, i.e. due to its high complexation constant for Pb, it complexes Pb and form an anionic complex which remains in the internal compartment. The question raised here is whether the internal DTPA moieties of the DTPA-tagged liposomes could play this role without encapsulation of free DTPA. To assess this possibility, the encapsulation was studied for different composition of liposomes and the results are reported in Table 1.

Without encapsulated DTPA (liposome A), a significant encapsulation was observed at 65°C (24.6 %) while no encapsulation occurs at ambient temperature. This result indicates that the encapsulation is done naturally because of the dynamic of the surface which makes the organic phospholipidic bilayer temporary permeable. However, a higher encapsulation was observed in the presence of internal free DTPA (liposome B). DTPA is therefore an important driving force. This is notably confirmed at ambient temperature with a significant encapsulation (69.7 %) whereas no encapsulation was observed without internal DTPA. The presence of surface DTPA in addition to free internal DTPA does not improve the yield at 65°C. This is coherent with the fact that surface DTPA (about 700 par liposome) is much lower than internal free DTPA (about 12000 per liposome). However, a significant difference is observed at ambient temperature between liposomes B and D (69.7 vs 12.9). We can imagine that bound DTPA hampers the encapsulation at ambient temperature for sterical reasons. Finally, in agreement with the above considerations, the presence of surface DTPA (liposome C) allows a higher encapsulation at 65°C than liposome A. The encapsulation yield is however increased in the presence of internal free DTPA. In the following, internal DTPA (0.025 M) was systematically added. A higher value was shown to induce a precipitation during liposome preparation.

Nature of X.

The encapsulation is for a part linked to the lipophilicity of the ligand used for the encapsulation [23]. Different compounds were tested at ambient and 65°C (figure 2). An experiment was done without ligand, for comparison. When the equilibrium constants are known, Pb speciation in solution was calculated at 25°C to help the understanding of the experimental data. The results are given in Table 2.

Table 2: Effect of the ligand X on the encapsulation; experiments realized with liposome D for X = acetate, DCP (1,10-phenantroline-2,9-dicarboxylic acid), BAL (2,3-dimercapto-1-propanol), and A23187 (see Table 1 and figure 2).

composition of external medium	T(°C)	lead distribution in solution ^a	% of lead eluted; no liposome present ^b	Encapsulation yield (%) ^c
Pb	21 ± 2	81% Pb ²⁺ ; 18% Pb(OH) ⁺ ; 1% Pb(OH) ₂ [18]	0.9 ± 0.2	9.1 ± 0.7
	65 ± 1		1.1 ± 0.2	45.7 ± 1.8
Pb-acetate	21 ± 2	99% Pb(Ac) ₃ ⁻ ; 1% Pb(Ac) ₂ [18]	0.7 ± 0.2	5.3 ± 0.6
	65 ± 1		0.5 ± 0.2	46.7 ± 1.9
Pb-DCP	21 ± 2	100% Pb(DCP) [19]	0.6 ± 0.2	3.9 ± 0.6
	65 ± 1		0.5 ± 0.2	36.5 ± 1.7
Pb-BAL	21 ± 2	no data available	1.2 ± 0.2	5.1 ± 0.7
	65 ± 1		0.5 ± 0.3	36.5 ± 1.6
Pb-A23187	65 ± 1	96% Pb(A23187) ⁺ [20]	12.0 ± 0.1	15.0 ± 1.1

^a calculated at 25°C, ^{b, c} [Pb] = 10⁻⁹ M, [X] = 10⁻⁵ M; ^c [Lipid] = 10⁻³ M

A23187 was chosen because it is used for the efficient encapsulation of trivalent metal ions [19]. However, the percentage of ²¹²Pb encapsulated is weak and amount to nearly 15%. This may be explained by the strong complexation (Table I) allowing DTPA not to compete with A23187 for Pb²⁺ in the internal volume. This observation may also be explained by the kinetic stability of the Pb-A23187 complex formed (log K = 6.49) [20], as already discussed in the part "active encapsulation" which does not allow DTPA to trap ²¹²Pb in the internal compartment. Thus, it cannot be concentrated in the internal compartment and its concentration should not be higher than the one in the external compartment; considering the ratio between internal and external compartments of 0.06, an encapsulation yield around 6 % is expected, in agreement with the weak value experimentally measured. Finally, a last possibility may be related to the charge + of the complex which is predicted based on literature data [20]. The yield of encapsulation appears much higher and similar for BAL, acetate and DCP, the two later forming neutral complex with Pb²⁺. Surprisingly, it equals, within experimental errors, with the one obtained without ligand. This result indicates that the ligand has no effect and that the passage of ²¹²Pb across the membrane does not occur *via* the diffusion of the neutral complex PbX.

To assess the latter assumption, the system containing acetate was better studied in the model water / octanol system where octanol simulate the liposome membrane [25]. If a

diffusion process occurs, the complex must be partially soluble in octanol. The acetate concentration was varied to change the concentration of PbAc_2 in the aqueous solution from 0% ($[\text{Ac}]_{\text{tot}} = 10^{-6} \text{ M}$) to 9.3% ($[\text{Ac}]_{\text{tot}} = 0.1 \text{ M}$). We then expect an increase in lead extraction in the organic phase when acetate concentration increases. However, the result showed that about 2% of lead was extracted in the presence or absence of acetate, and irrespective of acetate concentration. A similar study was performed in the presence of liposomes for different acetate concentrations. Here also, a constant encapsulation was observed, i.e. 65 ± 5 (lipid concentration of $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, lead concentration of 10^{-9} M , $T = 65^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.4$), for all acetate concentration studied ($10^{-5} - 0.1 \text{ M}$). The result, in complement to those got from the DTPA study, confirm that the ligand has no role in the encapsulation. This latter may be explained by a physical encapsulation arising from the dynamic of the membrane, which makes it partially permeable, and notably at 65°C . In the following, no ligand was used for ^{212}Pb encapsulation.

Specific activity.

Both the number of lead encapsulated (and specific activity) and the encapsulation yield are key parameters for the definition of the labeling protocol. In the optimized conditions ($\text{pH} = 7.4$, internal DTPA concentration of $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $T = 65^\circ\text{C}$), the encapsulation was studied as a function of liposome and lead concentrations. The results are reported in figure 4.

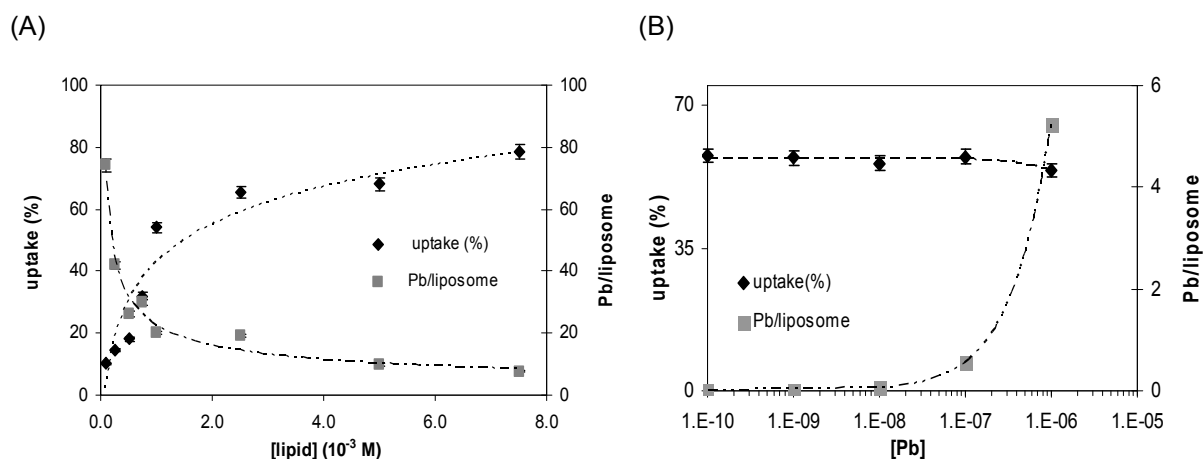


Figure 4: Study of the encapsulation as a function of liposome ($[\text{Pb}] = 10^{-7} \text{ M}$) (A) and Pb ($[\text{lipids}] = 7.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) concentrations (B). Experimental conditions: $\text{pH} = 7.4$ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ HEPES), 0.1 M NaCl, $T = 65^\circ\text{C}$, $[\text{DTPA}]_{\text{in}} = 25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. The lines are tendency curves.

On the one hand, for one given lead concentration, the more the lipid concentration, the more the encapsulation yield, the less the number of lead in the internal compartment. On the other hand, for one given liposome concentration, the more the lead concentration, the more the number of lead encapsulated while no effect on the encapsulation yield was observed. For a typical application in targeted radionuclide therapy, activities of several hundred MBq are necessary corresponding to concentration of ^{212}Pb around 10^{-7} M. Under such conditions, by fixing the lipid concentration to $2.5 \cdot 10^{-3}$ M, a concentration typically got from the production protocol, an encapsulation yield of about 75 % can be obtained using the optimized protocol with a mean value of 2–3 lead atoms per liposome.

Encapsulation in the In-labeled-PEG-liposomes

The methodology previously optimized was tested on PEG-liposomes using the two steps approach. Preliminary experiments showed that lead interaction with PEG chains, if it occurs, does not interfere with the determination of the encapsulation yield, i.e. lead mixed with PEG chains is retained in the Chelex-100 column. Encapsulation yields of 52 and 78.5 % were obtained for a lipid concentration of 10^{-3} M at ambient temperature and 65°C , respectively. These values appear higher than those obtained with the non-PEG-liposomes, i.e. 5 and 44 %. This shows that the PEG chains, in addition to make the liposomes stealth, facilitate ^{212}Pb encapsulation. The value at 65°C appears in close agreement with the one reported by Henriksen et al [4] obtained for related PEG-liposomes under similar conditions (80 %). This result indicates that the indium-DTPA complexes at the liposome surface do not hamper the labeling efficiency.

Conclusions

A two-step preparation process is proposed for indium-tagged liposomes loaded with ^{212}Pb : the first step involves the labeling of surface-DTPA liposomes with indium while the other one corresponds to ^{212}Pb encapsulation. Several parameters were tested to optimize the encapsulation (temperature, concentrations of lipids, Pb, and DTPA, and different lipophilic chelate...). The results indicate that the origin of the encapsulation is related to the dynamics of the surface, which makes the membrane partially permeable. The process is optimum at 65°C . No ligand was then necessary to allow the passage of ^{212}Pb from the external to the

liposome internal compartment: a similar yield was observed for all chelating agents tested and close to the one measured without chelating agent. This indicates that a significant improvement is observed when DTPA is present in the internal compartment. By forming a strong complex with Pb, it allows a concentration of the metal ion. The optimized conditions allow the encapsulation of 2–3 lead ions with a yield of 85 % under conditions relevant for nuclear medicine application. Comparison with literature data shows that the pre-labeling with indium does not affect the encapsulation yield. Further studies are on going to check that the results are still valid in the presence of several MBq of ^{212}Pb , and that the encapsulation is stable in biological media will also be studied.

Acknowledgements

We thank AREVA for providing the batch of ^{228}Th . Financial support from the ANR VecRIT (PCV07_185075) and the European Commission (EC grant HEALTH-F2-2007-201962 to the FP7 collaborative project TARCC (Targeted Alpha-Radionuclides to Combat Cancer)) is also gratefully acknowledged.

References

1. Hassfjell, S., Brechbiel, M.W.: *Chem. Rev.* **101**, 2019 (2001).
2. Morgenstern, A., Abbas, K., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C.: *Curr. Radiopharm.* **1**, 135 (2008).
3. Mirzadeh, S., Kumar K., Gansow O.: *Radiochim. Acta* **60**, 1 (1993).
4. Henriksen G., Schoultz B., Hoff P., Larsen, R.: *Radiochim. Acta* **91**, 109 (2003).
5. Mougine-Degraef M., Bourdeau C., Jestin E., Saï-Maurel C., Bourgeois M., Le Saëc P., Thédrez P., Gestin J.F., Barbet J., Faivre-Chauvet A.: *Int. J. Pharm.* **344**, 110 (2007).
6. Kraeber-Bodéré F., Rousseau C., Bodet-Milin C., Ferrer L., Faivre-Chauvet A., Champion L., Vuillez J.P., Devillers A., Chang C.H., Goldenberg D.M., Chatal J.F., Barbet J.: *J. Nucl. Med.* **47**, 247 (2006).
7. Sofou, S., Thomas, J., Lin, H.-Y., McDevitt, M., Scheinberg, D., Sgouros, G.: *J. Nucl. Med* **45**, 253 (2004).
8. Mougine-Degraef, M. Thèse de doctorat de l'Université de Nantes (2004).
9. Stavila, V., Davidovich, R., Gulea, A., Whitmire, K.: *Chem. Reviews* **250**, 2782 (2006).
10. Duzgunes, N.: *Methods in enzymology*, vol. 391, Liposomes part E, Elsevier (2005).
11. Narbutt, J., Bilewicz, A.: *Appl. Radiat. Isot* **49**, 89 (1998).

12. Van Der Walt, T.N., Coetzee, P.P.: *Talanta* **36**, 451 (1989)
13. Biesuz, R., Alberti, G., Pesavento, M.: *J. Solution Chem.* **37**, 527 (2008).
14. Parkhurst, D.L., Appela C.A.J.: User's guide to PHREEQC - a computer program for speciation, batch reaction, one dimensional transport, and inverse geochemical calculations. USGS Report No 99-4259 (1999).
15. Davies C.W., *Ion association*, Washington D.C., Butterworths (1962).
16. Grenthe, I., Puigdomenech, I.: *Modelling in aquatic chemistry*, Royal Institute of Technology Stockholm (1997).
17. Smith, R. M., Martell, A. E., Motekaitis, R.J.: *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 8.0 for Windows* (2004).
18. Melton, D. L., VanDerveer, D. G., Hancock, R.: *Inorg. Chem.* **45**, 9306 (2006)
19. Chapman, C. J., Puri, A. K., Taylor, R. W., Pfeiffer, D. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 44 (1990).
20. Ivanov, P., Bontchev, G., Bozhikov, G., et al: *Appl. Radiat. Isot* **58**, 1 (2003).
21. Tilcock, C., Ahkong, Q., Parr, M.: *Invest. Radiol.* **3**, 242 (1991).
22. Henriksen, G., Schoultz, B., Michaelsen, T., Brulard, S., Larsen, R.: *Nucl. Med. Biol.* **31**, 441 (2004).
23. Choi, H., Hwang, K.: *J. Nucl. Med.* **28**, 91 (1987).
24. Lorin, A., Flore, C.; Thomas, A., Brasseur, R.: *Agron. Soc. Environ.* **8**, 163 (2004).
25. Friedel, J., Marr, I., Muller H.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **350**, 74 (1994).

4. Etude de stabilité ; application d'un appareil d'Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation couplé à un détecteur γ

Dans le cadre d'étude *in vivo*, il est nécessaire que l'encapsulation du ^{212}Pb dans les liposomes soit stable au cours du temps. Cependant le sérum humain possède de nombreux agents complexants (protéines, ligands organiques ou inorganiques) [28], susceptibles de modifier la rétention du ^{212}Pb dans le compartiment interne des liposomes. L'objectif de cette étude consiste donc à suivre l'évolution de la rétention du ^{212}Pb dans les liposomes *in vitro*, dans des conditions se rapprochant le plus possible des conditions *in vivo*. Le sérum humain a été choisi comme milieu modèle d'étude. La stabilité de l'encapsulation du ^{212}Pb dans le compartiment interne des liposomes a également été vérifiée en milieu NaCl.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour étudier la stabilité d'une encapsulation dans des liposomes. Les techniques par exclusion stérique (PD-10) sont les méthodes les plus couramment employées car faciles à mettre en œuvre expérimentalement. Ces méthodes ne sont toutefois pas des méthodes directes en une étape. Deux étapes sont en effet nécessaires ; lorsque les liposomes radiomarqués sont mis à incuber dans le sérum, la première étape consiste à ajouter un agent complexant (EDTA) dans le milieu. L'EDTA étant un complexant fort de nombreux cations métalliques, cette étape va permettre de complexer le radioisotope qui ne serait pas retenu par les liposomes. La deuxième étape consiste à réaliser ensuite la séparation Pb-liposome / Pb-ligand.

Dans cette étude, nous proposons l'utilisation d'une méthode, en une seule étape, via une autre technique chromatographique : l'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) [39,61]. Le principe général de cet appareil est présenté dans la deuxième partie, chapitre IV. Brièvement, cette technique consiste à séparer les constituants d'un mélange, en fonction de leur taille, par l'application d'un champ de force perpendiculaire à la direction d'élution. L'Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4) est apparu comme pouvant être une technique adaptable à notre étude. En effet, d'une part de nombreuses études ont porté sur l'application d'un système AF4 pour l'étude de liposomes [62-64]. Ces résultats ont montré que les liposomes pouvaient être facilement analysés par AF4. D'autre part, lors d'étude de stabilité, les liposomes sont mis à incuber dans du sérum humain, or les composés constituant le sérum possédant des tailles bien différentes de celles des liposomes (7 nm pour les protéines vs 100 nm pour les liposomes), leurs signaux ne devraient pas interférer sur celui des liposomes, et donc sur leur analyse.

L'étude de la rétention du ^{212}Pb dans le compartiment interne des liposomes est donc envisageable par cette technique. En effet, si ^{212}Pb reste encapsulé dans les liposomes, le signal γ du ^{212}Pb coïncidera avec celui des liposomes. En revanche, en cas de non rétention, le ^{212}Pb pourra être complexé soit par les composés de faibles poids moléculaires du sérum, soit par les métalloprotéines. A notre connaissance, aucune étude ne porte sur la spéciation du Pb en milieu biologique. Toutefois, d'après Yakovlev, le Pb présenterait une forte affinité pour l'albumine ; le ^{212}Pb , libéré des liposomes, serait donc principalement associé à la fraction protéinique, qui comme nous venons de l'expliquer, ne devrait pas interférer avec le signal des liposomes. Le suivi du ^{212}Pb a été réalisé par spectrométrie γ , par le couplage du système AF4 avec un détecteur de rayonnements gamma. Cette technique AF4 / γ est, à notre connaissance, la première de ce genre à être développée. Une étude en parallèle sera réalisée par dialyse.

Les principaux objectifs de cette étude sont :

- de réaliser le couplage AF4/ γ pour permettre le suivi du ^{212}Pb ;
- de vérifier l'intégrité des liposomes au cours des différents marquages, et l'effet que ceux-ci ont sur la taille des liposomes ;
- de suivre la rétention du ^{212}Pb dans les liposomes ;
- de suivre la rétention des radioisotopes fils dans les liposomes.

Les résultats obtenus, par dialyse et AF4, ont montré qu'après 24 h d'incubation en milieu sérique, plus de 85% du ^{212}Pb est retenu dans les liposomes. Le couplage AF4 / γ est apparu comme étant un nouvel outil analytique pour étudier la rétention de radioisotopes dans des liposomes. Le marquage de surface et l'encapsulation dans le compartiment interne ne modifie pas la taille des liposomes. Il a également été montré, expérimentalement et de manière théorique que les radioisotopes fils restent encapsulés dans les liposomes. Ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

5. Article 3

Cet article vient d'être soumis pour publication dans le journal *Analytica Chimica Acta*. Les numéros des figures, tableaux et références de ce chapitre renvoient à ceux de l'article.

**Application of Asymmetric Flow Field-Flow
Fractionation (AF4) coupled to gamma rays detector
for the *in vivo* ^{212}Pb / ^{212}Bi generator**

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals based on ^{212}Pb are of interest for using in targeted alpha therapy, as an *in vivo* generator of α -particle emitting ^{212}Bi . Indium–DTPA–tagged liposomes were studied in the present work as carriers of *in vivo* ^{212}Pb / ^{212}Bi generator. The purpose of this study was to investigate the retention of ^{212}Pb in the internal compartment of liposomes, after an active encapsulation on preformed liposomes. Retention of radionuclides in liposomes was evaluated *in vitro* at 37°C in 0.1 M NaCl and in human serum. Two methods were tested to evaluate the radiolabeling stability. In a first hand, an indirect dialysis method was used. On the other hand, ^{212}Pb encapsulation was followed after size fractionation by Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation (AF4) coupled with a gamma rays. This coupling AF4/ γ -rays detector is the first one, to our knowledge, that has been developed. In human serum, more than 85% of retention of radioactivity is obtained after 24 h of incubation at 37°C. Dialysis experiments combined with theoretical calculations show that all decay products remain encapsulated in the core of the liposome. The combination of AF4 with the γ -rays detector appears to be a powerful tool for the quality control of liposome size, and together with an efficient tool to study the retention of radioactive metal into the internal compartment of lipidic vesicles.

KEYWORDS

Asymmetrical Flow Field–Flow Fractionation / gamma-rays detector / liposomes / $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ / *in vivo* generator.

GLOSSARY

AF4: Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation

DLS: Dynamic Light Scattering

DOTA: 1,4,7,10–tetraazacycloDodecane–1,4,7,10–TetraAcetic acid

DSPC: 1,2-DiStearoyl-glycero-3-PhosphoCholine

DSPE-DTPA: 1,2-DisStearoyl-glycero-3-PhosphoEthanolamine-DiethyleneTriamine-Penta-Acetic acid

DTPA: DiethyleneTriamine PentaAcetic acid

EDTA: Ethylene DiamineTetraAcetic acid

HEPES: 2-[4-(2-HydroxyEthyl)-1-Piperazine]EthaneSulfonic acid

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy

MALS: MultiAngle Light Scattering

RI: Refractive Index

SEC: Size-Exclusion Chromatography

SRIM: Stopping and Range of Ions in Matter

TWEEN[®] 20: polyethoxic sorbitan laurate

INTRODUCTION

²¹²Bi is a potentially interesting α -emitting radionuclide for targeted alpha therapy [1]. The principle is based on the stable binding of alpha emitting radionuclides to specific carrier molecules, such as peptides or antibodies that bind to cancer molecules [2]. The challenge is to deliver the radioactive atoms to the target with the objective to find the right balance between toxicity and anti-tumour effect. Considering its short half-life ($T_{1/2} = 60.6$ min), ²¹²Bi could only be used in the case of the labeled carrier molecule, that would rapidly accumulated in the target tumor. To expand the range of applications, an interesting method is to use its parent, ²¹²Pb which, with a longer half-life ($T_{1/2} = 10.6$ h), decays *in vivo* to ²¹²Bi. The challenge consists to keep ²¹²Bi bound to the vector after the ²¹²Pb decay.

Data in the literature show that the classical chelation approach, used to bind the *in vivo* generator ²¹²Pb / ²¹²Bi to the carrier molecules, does not work [3]. Although the chelating agent used (DOTA) is known to form strong complexes with both Bi and Pb, a significant part of Bi (~35 %) is released from the carrier molecule after the radioactive decay ²¹²Pb / ²¹²Bi and results in the formation of highly ionized daughter atoms from Auger emission [3]. An interesting alternative is to use liposomes [4]. Once ²¹²Pb is encapsulated in its internal compartment, the phospholipidic membrane prevents Bi release whether if the liposome size is large enough, but still small to allow its clearance into the body. For targeted radiolabeled liposomes, the size of the liposome is very important [5]. The ability of liposomes to extravasate and penetrate into diseased issues is directly correlated with their size. If the

average size is too large (e.g. > 250 nm), it will be rapidly removed from the circulation and have a poor accumulation at the targeted site. Liposomes, used for targeted alpha therapy application, are typically 100–150 nm in diameter since this size range increases their time of circulation while retaining adequate aqueous volume for drug delivery. Usually an appropriate size is recognized to be 100 nm. Liposomes with a diameter of about 100 nm are well internalized and very efficient to deliver their content [6].

The approach studied in the present work with 100nm–liposomes is designed to treat residual cancer diseases with a two step pretargeting strategy (Affinity Enhancement System) [7]. The liposomes used present at their surface DTPA chelating agents that are recognized, once complexed with indium, by the pretargeted bispecific anti–tumor x anti–indium–DTPA antibody. In a recent work, we have developed a labeling protocol for the loading of ^{212}Pb into the In–DTPA–liposomes [7]. Briefly, a two–step preparation process is proposed for indium–tagged liposomes loaded with ^{212}Pb : the first step involves the labeling of surface–DTPA liposomes with indium while the other one corresponds to ^{212}Pb encapsulation. From our previous [7], it was shown that the optimized conditions allow the encapsulation of 2–3 Pb ions with a yield of 85 % under conditions relevant for nuclear medicine application ([lipids] = $2.5 \cdot 10^{-3}$ M, ^{212}Pb ~100 MBq).

For targeted alpha therapy, it is necessary that the radiolabeling be stable in *in vitro* and *in vivo* conditions. Indeed, the release of the radionuclide from the carrier molecules *in vivo* might causes toxicity to normal tissues. The aim of the present work consists in studying the *in vitro* stability of ^{212}Pb encapsulation in the internal compartment of the liposomes, under human serum conditions. Different methods can be used. Chromatographic techniques by size exclusion, on a PD–10 or on Separose CI–4B columns, are the most commonly used as easy to employ [6]. However these techniques are not a one–step method: first, a complexing agent (e.g. EDTA) is added to the liposome–serum mixture; this is necessary to complex no retained radiometal. The second step consists then in achieving the separation liposome–metal to ligand–metal.

In this study, we purpose the use of a one–step method via another–like chromatographic method: Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4). Since several years, AF4 is used as an alternative to size–exclusion chromatography (SEC). SEC, while theoretically capable of resolving size populations, suffers from particle–pore wall interactions, the difficulty of working with pore structures sufficiently large to handle large

particles or polymers and the difficulty to find an appropriate mobile phase for the elution, whereas AF4 is able to separate particles ranging from a few nanometers (~ 1 nm) to a few micrometers (~ 100 μm). A complementary study is carried out by the technique of dialysis membranes. This further study will allow to check the retention of daughter radionuclides in liposomes.

Material and methods

Reagents

All reagents were of analytical grade. Sodium chloride and HEPES were purchased from Sigma Aldrich. Nanosphere size standards were purchased from Duke Scientific. Cholesterol was purchased from Sigma Aldrich, and phospholipids from Avanti Polar. Human serum was provided from Lonza (Walkersville, US). All solutions were prepared using Milli-Q water and all experiments were conducted at room temperature (monitored to be $21 \pm 2^\circ\text{C}$).

Liposomes synthesis

Liposomes were synthesized as described in [8], and are composed of 68% DSPC, 30.5 % cholesterol and 1.5 % DSPE-DTPA. The various constituents were mixed in chloroform / methanol (9/1 v/v) mixture in a 10 mL round bottom flask. A lipid film was obtained by evaporation of the solvent in a rotary evaporator. The hydration of the lipid film was performed by addition of 1 mL of the aqueous phase composed of NaCl (0.1 M), HEPES (2.10^{-3} M) and DTPA (0.025 M) at pH 7.4. After treatments by ultrasounds for 2 min, to reduce vesicles size without destroy them, liposomes were calibrated in size by extrusion on polycarbonate membranes to obtain an average diameter of 100 nm [6]. The size and polydispersity index were systematically checked by dynamic light scattering (DLS) with the Autosizer 4700 apparatus (Malvern Instrument SA) [8]. After this step, the size of the resulting liposomes is 109 ± 2 nm (polydispersity index = 0.119).

Liposomes, prepared in the presence of 25 mM DTPA for the encapsulation [7], were further purified to remove non encapsulated DTPA by membrane filtration (Centrisat, 20 kDa). The purification step was monitored by UV-spectrophotometry *via* the analysis, of the filtrate, of the Bi-DTPA complex ($\epsilon[\text{Bi-DTPA}]^{2-} = 8758 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ at $\lambda=278$ nm). The Bi-DTPA complexation constant ($\log K = 35.5$, $I = 0$) is high enough for allowing a quantitative complexation to the free ligand present in solution [9].

Elution of the $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ generator

450 kBq of ^{228}Th was provided by AREVA in 2006. A $^{228}\text{Th} / ^{212}\text{Pb}$ generator was prepared according to Narbutt and Bilewicz [10] using DOWEX–50x8 cation exchanger (50–100 mesh, 5 g). ^{228}Th was adsorbed on the resin in 0.01 M HCl, while ^{212}Pb was eluted from the column using 1 M HCl. With time (~ 2 years), some problems of purity were observed, probably due to radiation damage of the resin. Experiments have shown that about 45 % of the ^{212}Pb eluted from the generator are not, at pH 5, in a cationic form Pb^{2+} . It can be complexed by certain impurities from the resin. These Pb species do not react as Pb^{2+} ; another purification step was necessary and was performed using Chelex–100 (50-100 dry mesh, 8 g) [11]. ^{212}Pb sorption (~ 30 kBq) was done at pH 5 in an acetate pH buffer solution [12]. After washing (about 25 mL), ^{212}Pb was desorbed from the column with 5 M HNO_3 . The solution was then evaporated to dryness and the residue dissolved with 5 mM HCl to obtain a stock solution of 15 kBq/mL. Radiopurity and radioactivity content were checked before use.

Experimental methodologies

Surface labeling

For the membrane labeling, 0.01 M of In in 0.5 mL of NaCl (0.01 M)-HEPES (2.10^{-3} M), was added to 1.5 mL of the liposome suspension (0.01 M), and pH was subsequently adjusted to 7.4. The mixture was shaken for 12 h at room temperature. Then labeled liposomes were separated from free and non-specific indium. This step was performed by a column of Chelex–100 resin. The Chelex–100 was preliminary conditioned at pH 7.4 in solution of NaCl (0.01 M)-HEPES (2.10^{-3} M). The solution of In/liposomes was deposited on the column and eluted with NaCl (0.01 M)-HEPES (2.10^{-3} M), pH 7.4. In these conditions, all free and non-specific adsorbed indium were retained on the resin. Labeling efficiency was checked by ICP–MS analysis, i.e. the number of In corresponds to the number of DTPA at the surface which can be calculated from the liposome composition.

Loading of ^{212}Pb into liposome

All experiments were performed in solution of NaCl (0.01 M) buffered with 2.10^{-3} M HEPES, pH 7.4 [13]. The desired quantity of Pb ($^{212}\text{Pb} \sim 15$ kBq, and 10^{-7} M of natural Pb) was added to a vial containing the liposomes. Natural Pb was added to reproduce conditions relevant in nuclear medicine (~100 MBq/L or 10^{-7} M). ^{212}Pb was only used as a tracer (10^{-12} M). The mixture was incubated at 65°C for 1 hour. Separation of labeling liposomes from

radionuclides present in the external solution was performed by a column of Chelex resin. The solution of Pb/liposomes was deposited on the resin and eluted with 15 mL of a solution of NaCl (0.01 M)–HEPES ($2 \cdot 10^{-3}$ M). The labeling efficiencies were determined by counting the activity, by liquid scintillation, in the liposome suspension before and after the separation.

Stability studies

Stability studies of radiolabeled liposomes were done in dialysis membranes (Microcon Millipore, 3 kDa) composed of two compartments of 0.5 mL (compartment 1) and 1 mL (compartment 2) separated by a cellulose membrane (Figure 1).

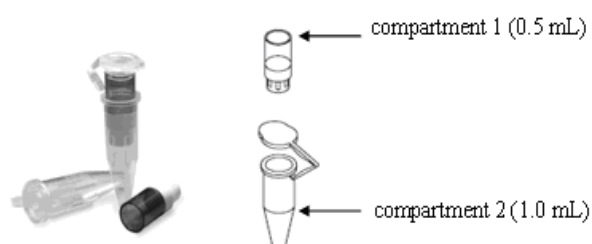


Figure 1: Representation of dialysis bags used for stability studies

It was preliminary checked that this membrane allows the permeation of low molecular weight compounds, like ^{212}Pb , and retains liposomal form. The stability of ^{212}Pb encapsulation was monitoring into two medias: the first is a solution of NaCl (0.1 M) buffered à pH 7.4 ($2 \cdot 10^{-3}$ M HEPES); the second is a solution of human serum. Compartment 2 was filled with 1 mL of the media, and compartment 1 with 200 μL of radiolabeled liposomes ($2 \cdot 10^{-3}$ M of lipids, and 3 kBq of ^{212}Pb) incubated in 300 μL of the media. The tubes were incubating at 37°C . At different time intervals (from 1 to 72 h), compartment 1 was separated from compartment 2, and each compartment was analysed by liquid scintillation analysis and gamma ray spectroscopy as far as ^{212}Pb radioactivity is concerned. For AF4 analyses, liposomes ($2 \cdot 10^{-3}$ M) loaded with ^{212}Pb were directly incubated in human serum, at 37°C . Considering the specific activity of the radiolabeled liposomes, the period of the ^{212}Pb , and the sensitivity of the on-line γ detector, the contact time was limited to 25 h.

Analytical tools

UV–spectra were recorded on a UV–visible UV–2401 PC spectrophotometer from Shimadzu. ^{212}Pb purity was verified by gamma ray spectroscopy with a high purity germanium (HPGe) detector from Canberra. ^{212}Pb activities were measured by liquid scintillation counting using a Packard 2550 TR/AB Liquid Scintillation analyzer with the

Ultima Gold AB scintillation liquid. Indium analysis was performed by ICP–MS using a PQ Excell apparatus provided by VG Elemental (sensitivity limit of 0.1 ppb in HNO₃ 2% v/v).

Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation system

The general principles of the Field–Flow Fractionation methods are described in details elsewhere [14]. Briefly, the separation takes place in a thin ribbon like separation channel in which a laminar carrier flow with a laminar flow velocity distribution is exposed to a perpendicular cross flow field. The colloids are then driven to the bottom of the channel, while diffusion causes them to be distributed at characteristic heights above the channel wall. Due to their higher diffusion coefficient, smaller particles diffuse back into the channel faster than larger particles and, therefore, leave the channel earlier. By opposition to “classical” chromatographic techniques, major advantages of the method are the absence of a stationary phase, thus, limiting the effects of an interaction between the samples components and the equipment surfaces [15], and the large choice of eluting solvents.

The eluant was passed through a vacuum degasser into the Flow Box P2.1 (ConSensus, Ober-Hilbersheim, Germany), and then through a 0.22 µm on-line filter (Millipore (U.K.) Ltd, Watford) into the Control-Box V3 valve box (ConSensus) before entering the AF4 channel (ConSensus, Ober-Hilbersheim, Germany).

The dimensions of the channel were 320 x 100 x 145 mm. A cellulose membrane, with a M_w –cutt–off of 5 kDa, and a 350 µm spacer were employed. For comparison with “classical” chromatographic techniques, the spacer thickness is comparable to the length of a column used in size exclusion chromatography, while the cutt–off of the membrane corresponds to the pore size of the SEC chromatographic column. The sample was injected through an injection valve with a sample loop volume of 100 µL. The channel outlet was connected both to the Valve Box and the detectors. The AF4 devise is coupled on line with a MALS, a RI and a UV detector at a wavelength of 256 nm. The flow rates were controlled employing the WinFFF_Control software (ConSensus, Ober-Hilbersheim, Germany). The carrier solution consists of 5.10⁻³ M NaCl solution, containing 0.001 % of TWEEN[®] 20. Separation conditions were adjusted for allowing separation of colloids from 30 to 240 nm. A series of polystyrene particles of different size (33 ± 1.4 nm, 59 ± 2 nm, 73 ± 2 nm, 100 ± 4 nm, 240 ± 6 nm) were used for size calibration. Each polystyrene suspension is certified by the supplier (Duke Scientific). Dispersions (10 mg/mL) were freshly prepared before injection in carrier solution. The channel flow rate decreases linearly from 1 mL/min to 0.7

mL/min in 20min, whereas the cross-flow decreases from 0.5 mL/min to 0 (Figure 2). From the channel, the effluent is directed through the detectors for monitoring the liposomes and the polystyrene particles.

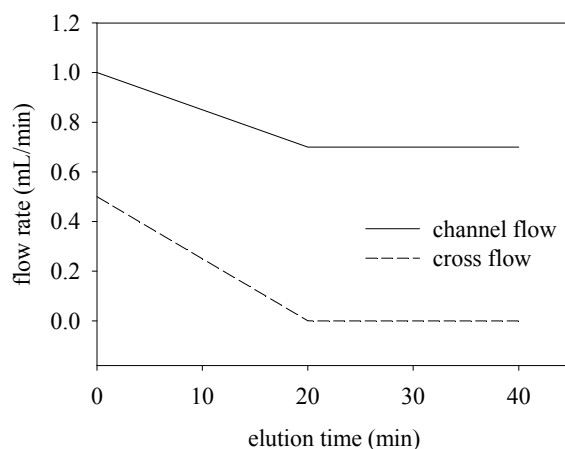


Figure 2: Channel flow and cross-flow profiles during elution

Fractionation of polystyrene particles – calibration

In order to examine the retention time–diameter relationship, solution of monodisperse polystyrene particles were used as samples. Standard particles of five sizes were used for size calibration (33 nm / 59 nm / 73 nm / 100 nm / 240 nm). Polystyrene (PS) particles solutions were injected separately. Each sample was injected three times. The fractograms obtained by AF4 and the calibration curve are shown in Figure 3. Mean value variations of the peak positions for each polystyrene particles vary by less than 3%. The size to retention time relationship is described by a linear regression obtained by the least squares method, following the Equation 1.

$$d = 17.77 \times t_R - 88.45 \text{ with } r^2 = 0.989 \quad \{1\}$$

where d is the hydrodynamic diameter (nm), t_R the retention time (min) and r^2 the correlation coefficient.

In the particles size range studied (33 to 240 nm), linear calibration curve is obtained. At the middle of the calibration curve, corresponding to an average size of 101 nm, a good measure of the precision is obtained. Consequently, for the liposomes, with a medium diameter of 109 nm, the error of the measure is minimized.

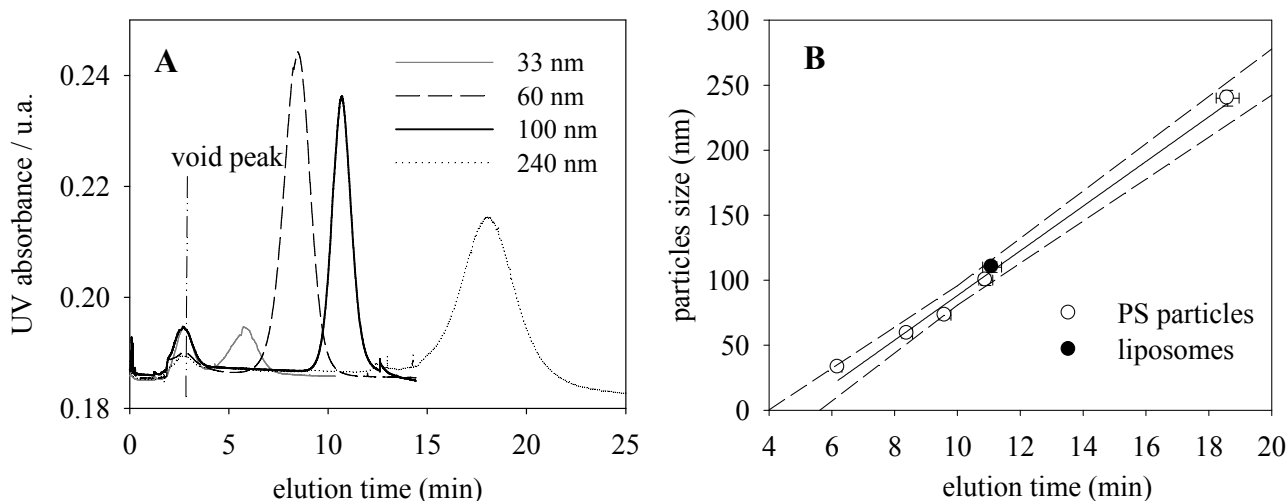


Figure 3: AF4 elugrams of PS particles solutions (A) and the calibration curve describing the colloids size as a function of the elution time (N=3) (B). Black line represents the correlation line, while dotted lines represent the 95% confidence interval. The standard deviation was estimated to be 0.13.

On-line AF4/gamma detector coupling

A gamma rays detector (GabiStar, Raytest) was coupled on-line with the other detectors. The combination of a Flow Field-Flow Fractionation method with a gamma rays detector allows the on-line monitoring of ^{212}Pb . This combination is, to our knowledge, the first of its kind to be achieved. The detector is composed of a sodium iodide crystal probe (16 x 40 x 50 mm), protected by a lead shielding, and coupled to a monitor. This one is an instrument for parameter dialog, entry and result presentation. The detection energy window is set between 50 and 1630 keV. The probe is equipped with a sample loop of 250 μL , allowing a good detection at low radioactivity levels (< 200 Bq). Before the coupling, it was previously checked that the flow rate obtained at the output of the AF4 apparatus was compatible to the flow rate needed for a good spread in the γ probe loop. Owing to the similar flow rate of the AF4 channel and typical flow need for the gamma detector, the GabiStar detector input can be connected directly to the RI detector outlet via appropriate PEEK tubing.

The counter monitoring the radioactive channel is continuously sampled every 0.1 s. The information of counts per time is transferred to the monitor, which converts the digital format to an analog output format of 0 – 1 V. The output signal can be easily adapted to the required chromatographic conditions. In our case, the Dark_Control_V1.0.20 software allows the registration of signals from different detectors of the AF4 apparatus. The chromatograms

are displayed live on screen. The γ detector is recorded on the software allowing to monitor its signal. The records of the signals are carried, with the same temporal trigger, on the same acquisition window. This allows a rapid comparison between the elugrams from the different detectors.

Results and discussion

Stability study by the means of AF4 coupled with a gamma rays detector

Liposomes size characterization

Liposomes are currently of interests for its pharmaceuticals applications as potential drug delivery systems [16]. Among the various physicochemical properties of liposomes, size of the vesicles is an important factor in the liposome properties *in vivo* [5]. Techniques that are currently used to characterize the vesicles size are electron microscopy, dynamic light scattering [17], and size–exclusion chromatography [18]. Since couple years, characterization of the Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation for liposomes has shown its ability and efficiency [19-20]. During their preparation, liposomes were calibrated in size by extrusion on polycarbonate membranes to obtain an average diameter of 100 nm. This size was checked by dynamic light scattering with an average diameter of 109 ± 2 nm. In order to estimate the effect on the size of the labeling of liposomes (at the surface with indium, and in the core with ^{212}Pb), Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation was used to study the size distribution. In addition, the ^{212}Pb retention into the internal compartment of the liposomes was also studied by the means of the coupling with the γ –rays detector.

The liposome samples were injected into the channel within the same flow condition as used for the polystyrene standards. Figure 4(A) shows the elugrams obtained for liposome preparation. The experimental conditions are identical to those reported for the polystyrene particles, and thus, particles, which have the same diameters, should be eluted at the same time. As shown in Figure 4(A), liposomes are eluted at time retention of 11.1 ± 0.3 min ($N = 3$). Mean value variations of the peak positions for liposomes vary by less than 2 %. A good repeatability is obtained. Considering the calibration curve from Equation 1, the liposome size is of 110 ± 1.5 nm (Figure 3). This value is in good agreement with this obtained by dynamic light scattering (i.e. 109 ± 2 nm). Our experimental conditions appear to be appropriate for liposomes analyses. Recovery rate of liposomes was established by comparing the area on the UV absorbance fractogram after elution with this obtained by direct injection

of liposomes without passing on the channel. A recovery for liposomes of $84.1 \pm 5 \%$ is obtained. Sorption of the liposomes to the cellulose membrane and other equipment surfaces can explain the 15% of no restored liposomes. Taking account to this sorption, future analyses can be quantitative.

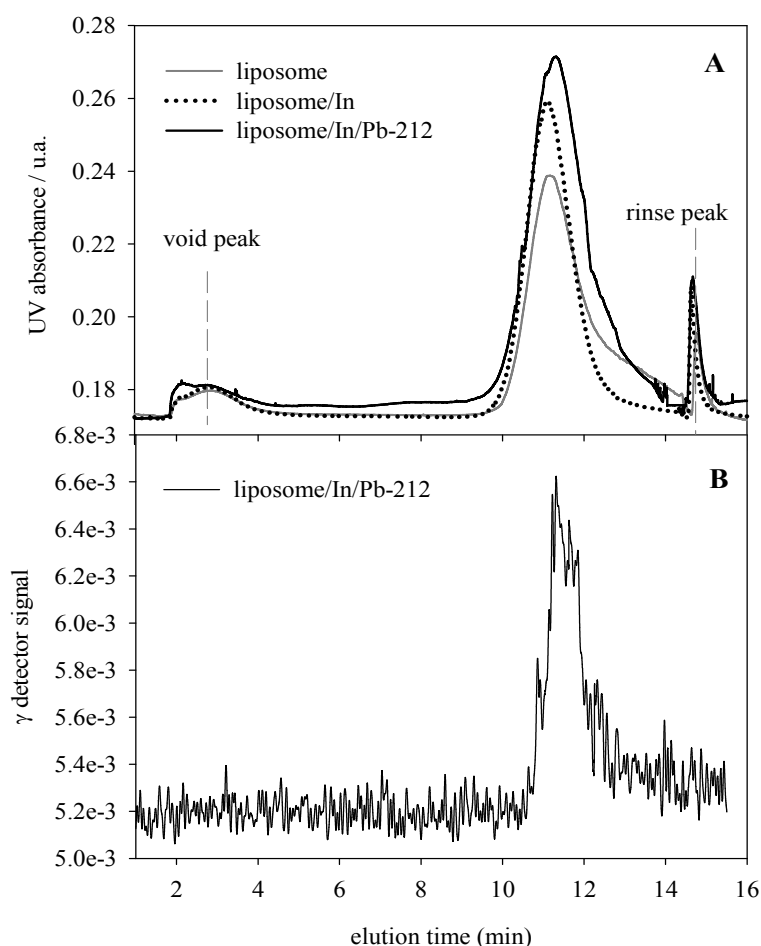


Figure 4: Fractograms of liposomes following the two steps of liposomes labeling (A) and γ signal (B) obtained from the elution of liposomes loaded with ^{212}Pb .

As explained previously (see Introduction part), for targeted alpha therapy, the liposome size is an important point. The labeling of the lipidic vesicles must not modify its size. In a previous work, we have developed a two-step preparation process to label liposomes. The first step involves the labeling of surface-DTPA liposomes with indium while the other one corresponds to the ^{212}Pb encapsulation. The differential size distributions of empty liposomes, indium-DTPA tagged liposomes, and indium-DTPA tagged liposomes loaded with ^{212}Pb are shown in Figure 4(A).

All liposomes have monodisperse size distribution. As shown in Figure 4(A), the mean diameter of the liposomes does not change very much from 110 ± 1.5 nm for empty liposome to 109 ± 1.7 nm ($N = 3$) for In-liposome, and 112 ± 2.1 nm ($N = 4$) for In-liposome loaded with ^{212}Pb . These results indicate that the labeling of liposomes with In and ^{212}Pb does not modify its initial size; no swelling was observed. In order to follow the retention of ^{212}Pb into the internal compartment of the liposomes, the γ -rays of ^{212}Pb was monitoring by the γ -rays detector coupled to the AF4. Figure 4(A) shows the elution profile of the liposomes themselves whereas Figure 4(B) represents the γ -rays signal in an energy window chosen to monitor ^{212}Pb . From these elugrams, it was calculated that 86.3 ± 6 % of the ^{212}Pb are bound to the liposomal fraction. The recovery of ^{212}Pb is quite comparable with the liposome recovery.

Stability studies by AF4 coupled with the γ -rays detector

To study the stability of ^{212}Pb encapsulation in human serum, it was necessary to ensure that serum components do not disturb the AF4 liposome signal. Theoretically, considering the principle of the fractionation of an AF4 system and the composition of the serum [21], no compound should interfere with the liposome signal. Indeed, the serum is composed of proteins (e.g. transferrin, albumin,..) and of a low-molecular weight fraction (organic and inorganic ligands, e.g. citrate, carbonate, phosphate, ...). These components, with a molecular weight lower than 500 Da, should be either eluted in the void peak, or eliminated by the cross-flow. Moreover most of these compounds do not present UV fingerprint. Consequently, this part of the serum should not interfere with the liposome signal. Nevertheless, for the proteins fraction, with a molecular weight over than 65 kDa, they could be seen in the elugram when performing AF4 analysis of liposomal fractions in the serum. Yohannes et al [22] have reported experimental conditions typically used for the analysis of albumin: a channel flow of 1 mL/min and a cross-flow of 4 mL/min. By comparison of these conditions to our method, the proteins will be probably not eluted in the time scale studied (30 min). In order to check the last hypotheses, an elution of a serum solution was performed on the AF4 channel. No signal was detected (elugram not shown). Therefore, in our experimental conditions, AF4 can be used to evaluate the ^{212}Pb retention in the internal compartment of the liposomes, under human serum condition. Experimental results, in human serum, are shown in Figure 5, for incubation time less than 24 h. This study of stability is not possible over a period more than 24 h, considering the few activity of ^{212}Pb from the

$^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ generator (15 kBq) and ^{212}Pb decay ($t_{1/2} = 10.6$ h). After this time, the radioactivity concentration will be too low for allowing a monitoring of the ^{212}Pb , and the γ signal becomes too noisy. As shown in Figure 5, more than 85% of ^{212}Pb is retained in the internal compartment of the liposomes after 24 h of incubation in human serum. To complete this study, further experiments were performed by dialysis.

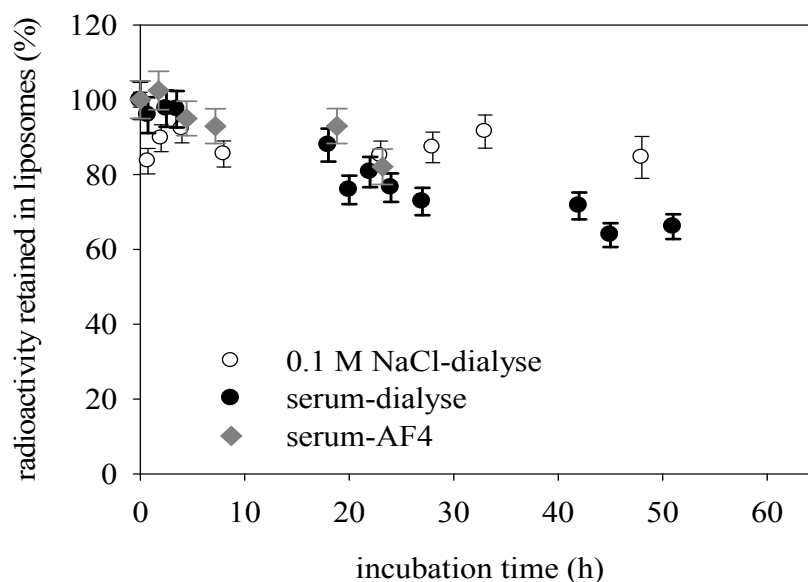


Figure 5: Retention of radioactivity in liposomes following by AF4 coupled with the γ -rays detector (diamond points) and from dialysis experiments (round points) as a function of incubation time at 37°C (N=2).

Stability studies monitored by dialysis

Retention of radioactivity by liposomes

The stability of radiolabeled liposomes was determined by monitoring total radioactivity release from vesicles at different times, in 0.1 M NaCl and in blood serum. The prepared liposomes (3.5 mL), after removing free ^{212}Pb , were splitted into samples of 200 μL . The so-obtained samples were placed in compartment 1 of the dialysis system described previously (see section Experimental methodology). At fixed time intervals, the aliquots were taken and separated from compartment 2. Radioactivity was analysed in each compartment. The results of stability of radiolabeled indium-DTPA-tagged liposomes are shown in Figure 5. In 0.1 M NaCl, only about 15% of the radioactivity was released after 48 h. In the case of the incubation in human serum, 60% and 55% of total radioactivity was retained into the internal compartment of the liposomes after 48 h and 72 h of incubation respectively. The result show that one component of the serum contributes to radioactivity release. The

identification of the responsible component and the corresponding mechanism are not the scope of the present work.

The radioactivity release is reasonable for an *in vivo* application. Indeed, the liposomes used in this study have an *in vivo* biologic period of 14 h [8], which is long enough for allowing them to reach the cancer cells. During this period, the encapsulation must be stable, and the release of radioactivity must be very low. About 90% of the total radioactivity is retained into the liposomes after 14 h of incubation in human serum (Figure 4). This result is similar to those published in the literature [23-24].

Retention of ^{212}Pb and decay daughters by liposomes

The use of an *in vivo* generator involves that the chemical binding of the daughter radionuclides is analogous to the parent one. The daughter radionuclide is thus not released from the original position, avoiding toxicity to normal tissues. In the case of the *in vivo* generator $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$, it is particularly important that the liposome retains the ^{212}Pb and the ^{212}Bi , this one being the therapeutic radionuclide and the more toxic by the emission of α -particle of high energy ($E = 6.05 \text{ MeV}$). The retention of ^{208}Tl , formed at 36 % in the α decay of the ^{212}Bi , is of less importance. Indeed, with a half-life of 3.0 min, a β^- decay emitting few energy ($E = 1.7 \text{ keV}$) and leading to stable Pb, its toxicity is less important.

Theoretical approach:

If ^{212}Pb is initially entrapped within the aqueous compartment of liposomes, the daughters are expected to be retained within the liposomes. However some loss is unavoidable, if the recoil distance travelled by daughter atoms, on decay of the parent, is on the same order of the liposome size. The feasibility of our liposomes to keep encapsulated the ^{212}Pb and its daughters for cancer therapy was first investigated by a theoretical approach. To evaluate the theoretical limits of daughter entrapment, Sofou et al have developed a model using nuclear theory and geometry [5]. With this model, unilamellar liposomes were considered, and each encapsulated radionuclide was distributed uniformly within the aqueous compartment. Each decay has a fixed probability for daughter ejection. The total probability of ejection is calculated by averaging the ejection probability over the possible locations of the radionuclide. The recoil distance for each daughter radionuclides were established using software Stopping and Range of Ions in Matter (SRIM) [25]. For a β^- decay, we consider that the recoil distance is negligible ($<2 \text{ nm}$). For the α decay, ^{212}Bi to ^{208}Tl , a recoil distance of

78 nm has been determined. Using this model, a 100 nm–liposomes allows to keep 97% of the ^{212}Bi in the cavity. However, only 6% of ^{208}Tl , formed after the α decay of ^{212}Bi , is predicted retained by the liposomes.

Experimental approach:

In order to investigate the retention of ^{212}Pb and its daughters in the vesicles during *in vitro* serum incubation, the stability of ^{212}Pb / ^{212}Bi / ^{208}Tl labeled indium–DTPA–tagged liposomes was checked by γ –spectroscopy. ^{212}Pb was quantified by measurement of its 238.6 keV γ -ray. To quantify ^{212}Bi and ^{208}Tl , the 727.0 keV and 538.1 keV γ -rays were measured respectively. Experimental results of the measured radioactivity could be compared to theoretical values, calculated considering the following equations [26]:

$$a_0(t) = A_0 \exp(-\lambda_0 t) \quad \{2\}$$

$$a_1(t) = \frac{A_0 \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_0} [\exp(-\lambda_0 t) - \exp(-\lambda_1 t)] \quad \{3\}$$

$$a_2(t) = A_0 \lambda_1 \lambda_2 \left[\frac{\exp(-\lambda_0 t)}{(\lambda_2 - \lambda_0)(\lambda_1 - \lambda_0)} + \frac{\exp(-\lambda_1 t)}{(\lambda_2 - \lambda_1)(\lambda_0 - \lambda_1)} + \frac{\exp(-\lambda_2 t)}{(\lambda_0 - \lambda_2)(\lambda_1 - \lambda_2)} \right] \quad \{4\}$$

Where $a_0(t)$, $a_1(t)$ and $a_2(t)$ are the radioactivity of ^{212}Pb , ^{212}Bi and ^{208}Tl , respectively ; A_0 is the initial radioactivity of ^{212}Pb ; and λ_0 , λ_1 , λ_2 are the radioactive decay constant of ^{212}Pb , ^{212}Bi and ^{208}Tl respectively.

Results are shown in Figure 6. The percentage of ^{212}Pb retention can be determined by the ratio of measured ^{212}Pb activity on the theoretical value obtained by Equation 2. Until 24 h of incubation, the ^{212}Pb activity retained in liposomes was > 90%. As explained before, the ^{212}Pb release is suitable for a clinical application. The theoretical values of ^{212}Bi were calculated according to Equation 3. In case of non retention of ^{212}Bi into the internal compartment of the liposomes, the experimental results will be lower than theoretical values. For the clarity of the figure the theoretical values of ^{208}Tl , calculated from Equation 4, are not shown. However, the curve is superimposed to the one of ^{212}Bi . Experimental results were in agreement with calculations. With experimental errors, 95% of the ^{212}Bi and ^{208}Tl activities were retained in the liposomes. ^{212}Bi and ^{208}Tl radioactivity were well retained in the lipidic vesicles. A good retention is observed for all radionuclides. Similar results were obtained by

Henriksen et al for the ^{212}Pb and ^{212}Bi [4]. Contrary to theoretical predictions, ^{208}Tl is well retained in the internal compartment of liposomes. The hydrophobic region of liposomal membranes provides a good barrier to prevent loss of radionuclides.

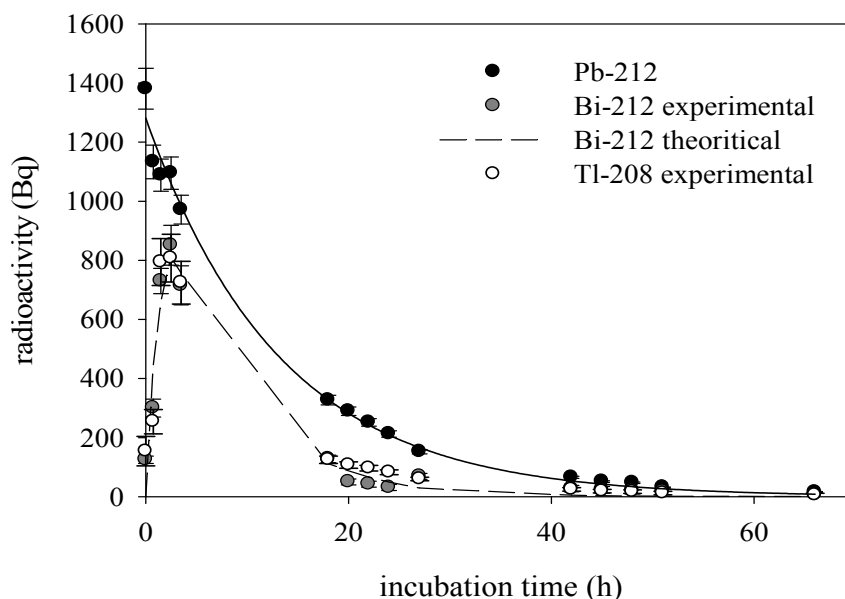


Figure 6: Retention of radioactivity in liposomes, from dialysis experiments, of ^{212}Pb labeled liposomes in human serum, as a function of incubation time at 37°C ; and retention of the radionuclides daughter in liposomes.

CONCLUSION

This work demonstrates a new approach to study the retention of radioactive metal into the internal compartment of lipidic vesicles. The liposomes used in this study have an *in vivo* biologic period of 14 h. During this period, the encapsulation must be stable. We have showed by dialysis and AF4/ γ that this is the case, as about 90% of the radioactivity is retained into the liposomes after 14 h of incubation in human serum. We showed as well that all decay products remain encapsulated in the core of the liposome. The retention of ^{212}Pb was high; more than 85% of radionuclides were retained in liposomes after incubating for 24 h at 37°C in human serum. This result decreased to 55% after 72 h of incubation, probably due to the binding of the radioisotope to serum components. Dialysis experiment showed that an effective retention of ^{212}Bi after β^- decay of ^{212}Pb is achievable. This coupling AF4/ γ -rays detector which is the first one, to our knowledge, that has been developed, appears as a new analytical powerful tool that could reach numerous applications in the nuclear and radiopharmaceutical fields.

Acknowledgements

We thank Dr. Ferid Haddad for theoretical calculations made from Sofou model. We also thank AREVA for providing the batch of ^{228}Th , and financial support from the ANR VecRIT (PCV07_185075). The European Commission (EC grant HEALTH-F2-2007-201962 to the FP7 collaborative project TARCC (Targeted Alpha-Radionuclides to Combat Cancer)) is also gratefully acknowledged.

References

- [1] S. Hassfjell, M.W. Brechbiel, *Chem. Rev.* 101 (2011) 2019-2023.
- [2] A. Morgenstern, K. Abbas, F. Bruchertseifer, C. Apostolidis, *Curr. Radiopharm.* 1 (2008) 135-143.
- [3] S. Mirzadeh, K. Kumar, O. Gansow, *Radiochim. Acta* 60 (1993) 1-10.
- [4] G. Henriksen, B. Schoultz, P. Hoff, R. Larsen, *Radiochim. Acta* 91 (2003) 109-113.
- [5] S. Sofou, J. Thomas, H.-Y. Lin, M. McDevitt, D. Scheinberg, G. Sgouros, *J. Nucl. Med* 45 (2004) 253-260.
- [6] G. Henriksen, B.W. Schoultz, T.E. Michaelsen, O.S. Bruland, R.H. Larsen, *Nucl. Med Biol.* 31 (2004) 441-449.
- [7] A. Le Du, M. Mougín-Degraef, E. Botosoa, A. Rauscher, A. Faivre Chauvet, J. Barbet, G. Montavon, *Radiochim. Acta* (being published)
- [8] M. Mougín-Degraef, Thèse de doctorat de l'Université de Nantes (2004).
- [9] P. S. Edgaonkar, M. atchayya, P. R. Subbaraman, *Indian J. Chem.* 13 (1975) 400-402.
- [10] J. Narbutt, A. Bilewicz, *Appl. Radiat. Isot* 49 (1998), 89-91.
- [11] T.N. Van Der Walt, P.P. Coetzee, *Talanta* 36 (1989) 451-455
- [12] R. Biesuz, G. Alberti, M. Pesavento, *J. Solution Chem.* 37 (2008) 527-541.
- [13] C.P. Tilcock, Q.F. Ahkong, M. Parr, *Invest. Radiol.* 26 (1991) 242-247.
- [14] W. Fraunhofer, G. Winter, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 369-383.
- [15] M. Bouby, H. Geckeis, T.N. Manh, J-I. Yun, K. Dardenne, T. Schäfer, C. Walther, J-I. Kim, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 97-104.
- [16] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8 (2004) 163-176.
- [17] F.R. Hallett, J. Watton, P. Krygsman, *Biophys. J.* 59 (1991) 357-362.

- [18] C. Grabielle-Madelmont, S. Lesieur, M. Ollivon, J. Biochem. Biophys. Methods 56 (2003) 189-217.
- [19] S. Hupfeld, D. Ausbacher, M. Brandl, J. Sep. Sci 32 (2009) 1465-1470.
- [20] M. Moon, I. Park, Y. Kim, J. Chromatogr. A 813 (1998) 91-100.
- [21] E. Ansoborlo, O. Pratt, P. Moisy, C.D. Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, V. Moulin, Biochim 88 (2006) 1605-1618.
- [22] G. Yohannes, S. Wiedmer, M. Elomaa, M. Jussila, V. Aseyev, M-L. Riekkola, Anal. Chim. Acta 675 (2010) 191-198.
- [23] M. Mougín-Degraef, C. Bourdeau, E. Jestin, C. Saï-Maurel, M. Bourgeois, P. Remaud-Le Saëc, P. Théderz, J-F. Gestin, J. Barbet, A. Faivre-Chauvet, Int. J. Pharm. 344 (2007) 110-117.
- [24] A. Bao, B. Goins, R. Klipper, G. Negrete, W. Phillips, J. Nucl. Med. 44 (2003) 1992-1999.
- [25] J. F. Ziegler, J. P. Biersack, M. D. Ziegler, SRIM The Stopping Range of Ions in matter (2008).
- [26] P. Courrière, Physique et biophysique pharmaceutiques, vol. 2, Masson (1990).

Chapitre 2 : Le générateur Uranium-230 / Thorium-226

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les radioisotopes utilisés pour la radiothérapie α ciblée doivent respecter certains critères tels que leur période radioactive, les coûts de production, ... Malheureusement, seuls quelques radioisotopes, émetteurs de particules α , possèdent des propriétés physiques et chimiques appropriés à une application en thérapie. Le ^{213}Bi est, actuellement, l'isotope le plus intéressant pour la radiothérapie α [7]. Celui-ci est produit à l'aide d'un générateur d' $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ [54]. De ce fait, la production du ^{213}Bi va être limitée par celle d' ^{225}Ac , ainsi que de la période de celui-ci ($t_{1/2} = 10$ jours). Actuellement, l' ^{225}Ac ne peut être produit qu'en quantité limitée (environs 1 Ci par an) par séparation chimique à partir d'une source de ^{229}Th . La production actuelle du ^{213}Bi ne permettrait le traitement que d'une centaine de patients par an.

Ces inconvénients vont sérieusement limiter la progression des études sur la radiothérapie α ciblée. Afin de faire progresser ces recherches, des nouveaux radioisotopes ont été proposés [65]. Ceux-ci doivent présenter les caractéristiques suivantes : être produits par des voies de production simple, en quantité et pureté suffisantes, se complexer de façon stable sur l'agent vectorisant, et avoir une période radioactive adaptée à une utilisation en thérapie.

L'utilisation du thorium-226 et de son radionucléide père, l'uranium-230, ont ainsi été proposés pour des applications médicales [65]. Leurs caractéristiques de décroissance (radiations et demi-vies) et leur capacité à être facilement couplé à une molécule biologique vectrice, font de ces radioisotopes, des candidats particulièrement bien adaptés pour une utilisation thérapeutique. Plusieurs voies de production ont été développées pour l' ^{230}U , et donc pour le ^{226}Th [66,67]. Actuellement à l'étude, l'intérêt thérapeutique de ces radioisotopes doit encore être évalué.

I. Etude bibliographique

1. L' ^{230}U et le ^{226}Th en médecine nucléaire

1.1. Généralité

L' ^{230}U et le ^{226}Th sont des radioisotopes émetteurs de particules α , de périodes respectives de 20,2 jours et de 31 minutes. La chaîne de décroissance de l' ^{230}U est représentée en figure 22.

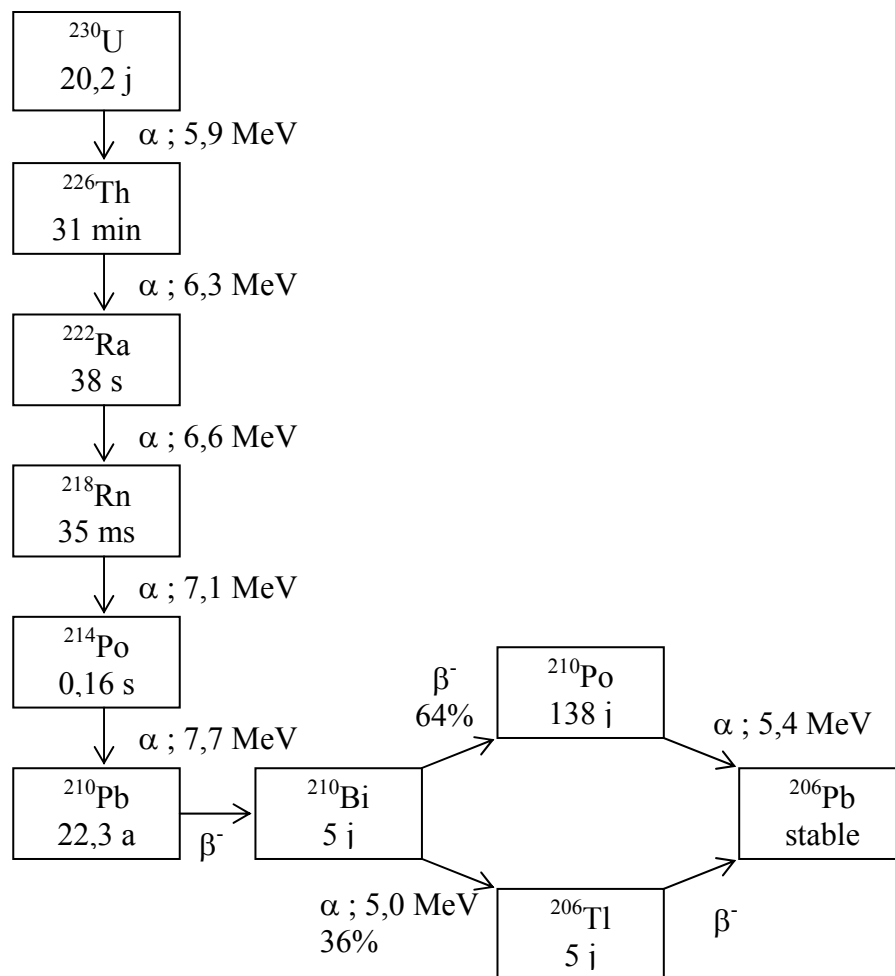


Figure 22: Schéma de décroissance de l' ^{230}U

Le ^{226}Th représente une alternative du ^{213}Bi particulièrement intéressante. En effet, alors que le ^{213}Bi ne va émettre qu'une seule particule α , avec une énergie maximale de 8,4 MeV, le ^{226}Th , de part sa chaîne de décroissance, émettra quatre particules α , avec une énergie cumulée de 27,7 MeV. La dose délivrée au niveau des cellules tumorales sera donc

nettement plus importante avec l'utilisation du ^{226}Th que du ^{213}Bi . Un autre avantage du ^{226}Th réside dans le fait que tous les radioisotopes fils du ^{226}Th possèdent des périodes radioactives courtes, cela va considérablement limiter leur diffusion dans l'organisme, et limiter ainsi la distance entre le radionucléide et la cellule cible.

De même que le ^{213}Bi , du fait de sa courte période ($t_{1/2} = 46 \text{ min}$), le ^{226}Th ne pourra être utilisé que dans les cas où :

- les tumeurs sont facilement accessibles ;
- le vecteur diffuse rapidement dans l'organisme ;
- le ^{226}Th est administré par injections localisées au niveau des tumeurs.

Tout comme le ^{213}Bi , le ^{226}Th peut donc être employé directement après couplage sur une molécule vectrice ou sous la forme d'un générateur *in vivo* via l'utilisation de son radionucléide père, l'uranium-230. De même que l' ^{225}Ac , précurseur du ^{213}Bi (figure 23), l' ^{230}U peut être utilisé directement en thérapie ou simplement servir de source pour la production du ^{226}Th . Dans ce cas, l' ^{230}U est fixé sur un générateur, par exemple une résine échangeuse d'ions, qui permettra l'élution sélective du ^{226}Th . La demi-vie de l' ^{230}U ($t_{1/2} = 20,2 \text{ jours}$) va ainsi permettre l'utilisation du générateur sur plusieurs semaines.

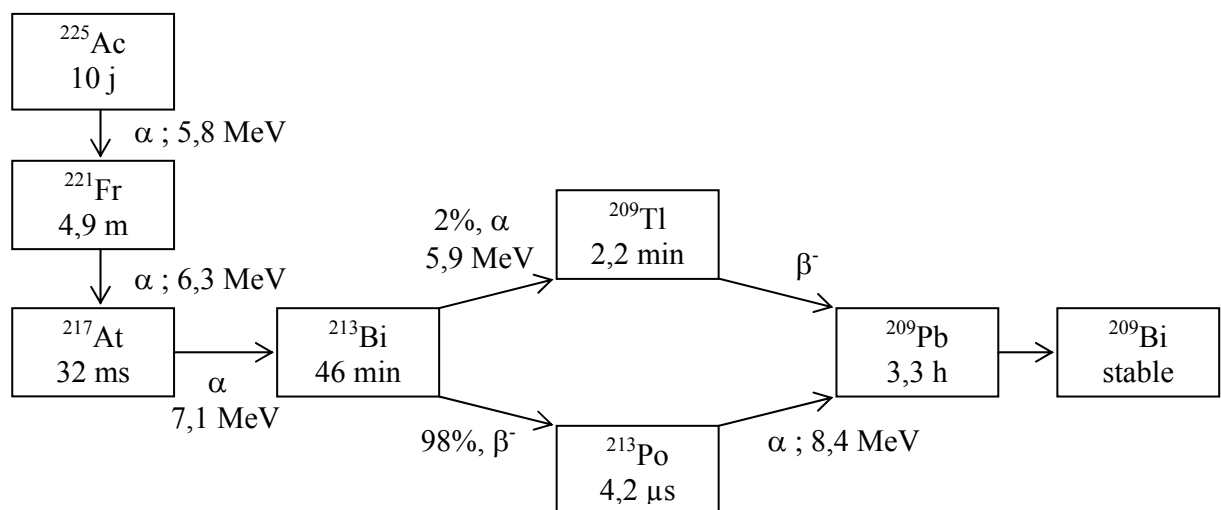


Figure 23 : Chaîne de décroissance de l' ^{225}Ac

Le générateur $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$ représente également une bonne alternative au générateur $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$. L'utilisation du générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$ va permettre l'émission de 5 particules α , avec une énergie cumulée de 33,6 MeV, alors que l'utilisation du générateur $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$ ne permettra l'émission que de 4 particules α , avec une énergie cumulée de 25.1 MeV.

1.2. Production de l' ^{230}U et du ^{226}Th

Différentes méthodes peuvent être employées afin de produire l' ^{230}U , et donc le ^{226}Th , que ce soit à partir de thorium-232 ou de protactinium-231 [65-67].

a. Production à partir du thorium-232

La première voie de production a été proposée par Koua Aka et al en 1995 [68], et est basée sur l'irradiation d'une source de thorium-232. Cette irradiation est effectuée avec des protons d'énergie appropriée afin d'obtenir la réaction $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa}$. Le ^{230}Pa obtenu est un émetteur β (β^+ et β^-) possédant une demi-vie de 17,4 jours, sa chaîne de décroissance permettra de produire à 8,4% l' ^{230}U .

Deux autres alternatives sont possibles pour la production d' ^{230}U à partir du ^{232}Th :

- à partir de la réaction $^{232}\text{Th}(d,4n)^{230}\text{Pa}$ [67]. L' ^{230}U est ensuite obtenu par décroissance du ^{230}Pa . L'irradiation par deutéron permet d'obtenir le même rendement de production que par irradiation de proton. L'énergie du faisceau incident se situera sur une gamme d'énergie entre 20 et 35 MeV.

- à partir de la réaction $^{232}\text{Th}(\alpha,6n)^{230}\text{U}$. L' ^{230}U peut être produit directement par irradiation avec des particules alpha. L' ^{230}U est ainsi produit de façon directe. L'énergie incidente du faisceau de particules est ajustée entre 50 et 70 MeV, et plus précisément entre 53 et 65 MeV. La production directe de l' ^{230}U va permettre une nette amélioration du rendement (25 fois plus importante).

b. Production à partir du protactinium-231

L' ^{230}U peut être produit directement à partir des réactions suivantes : $^{231}\text{Pa}(p,2n)^{230}\text{U}$ et $^{231}\text{Pa}(d,3n)^{230}\text{U}$. L'énergie du faisceau incident est située entre 13 et 17 MeV. Des rendements de 60% peuvent ainsi être obtenus

2. Approches de vectorisation

La décroissance *in vivo* de l' ^{230}U , par l'émission d'une particule α de 5,9 MeV, va induire au ^{226}Th une énergie cinétique, dite de recul, de 103 keV. En considérant une énergie de liaison thorium-oxygène d'environ 9,1 eV (878,6 kJ.mol⁻¹) et une énergie de liaison thorium-azote d'environ 5,9 eV (577,4 kJ.mol⁻¹), l'énergie de recul impartie au ^{226}Th est suffisamment importante pour rompre une liaison.

Par conséquent, le ^{226}Th , formé après décroissance de l' ^{230}U , ne sera pas retenu par le vecteur. De même que pour le générateur *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$, une approche par encapsulation et une par chélation, à double ligand, peuvent être envisagées. Dans le deuxième cas, plusieurs agents chélatants peuvent être utilisés, tels que les ligands multidentates contenant des groupements HOPO. Le DTPA et ses analogues sont également des ligands de choix.

Approche par encapsulation

L'approche par encapsulation dans des liposomes peut être envisagée. Afin de vérifier la faisabilité de cette méthode, une approche théorique va dans un premier temps être réalisée. Le modèle développé par Sofou et al (2003) [32] va nous permettre d'évaluer théoriquement l'efficacité de rétention des radio-isotopes fils dans le compartiment interne des liposomes en fonction de la taille de ceux-ci. Le principe de ce modèle est décrit dans la partie 2, chapitre III.2. Les distances de recul imputées aux radioisotopes fils sont considérées dans ce modèle, et doivent donc être déterminées afin de l'utiliser. Ces valeurs ont été calculées à l'aide du logiciel SRIM (tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques physiques des isotopes issus de la décroissance de l'U-230

radioisotopes	période	Energie de recul (keV)	Distance de recul (nm)
Th-226	31 min	103	84,0
Ra-222	38 s	112	89,1
Rn-218	35 ms	118	91,3
Po-214	164 μs	131	99,3
Pb-210	22,3 a	145	108,2

En utilisant ces données et le modèle de Sofou [32], une rétention de 90 % de l'activité totale est obtenue en utilisant un liposome possédant un diamètre moyen de 6700

nm. En considérant uniquement l' ^{230}U et le ^{226}Th , une taille de 1300 nm est nécessaire pour une rétention de 90% du ^{226}Th . Dans les deux cas, la taille requise pour les liposomes est trop élevée. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, pour des applications médicales, le diamètre des liposomes ne doit pas excéder 200 nm. L'approche par encapsulation n'est donc pas envisageable pour le générateur $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$.

Approche par chélation

L'approche par chélation implique la fixation d'un ou plusieurs ligands sur un vecteur, permettant la complexation de l' ^{230}U mais également de son radioisotope fils, le ^{226}Th , et ce de façon stable afin d'éviter une dislocation du ^{226}Th du vecteur. Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement à la chélation du ^{226}Th , qu'il soit utilisé par injection directe ou via l'utilisation du générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$.

De nombreux agents de chélation ont été reportés dans la littérature pour complexer le ^{226}Th , radioisotope qui nous intéresse dans le présent travail. Les actinides, de degré d'oxydation supérieur à +3, possèdent une densité de charge élevée et sont peu polarisables. Selon la théorie HSAB, ils sont considérés comme des acides durs. Ils interagissent préférentiellement avec des bases dures comme les ions fluorures et les molécules oxygénées, pour former des liaisons à caractère ionique. Les agents de complexation, couramment cités dans la littérature sont les suivants [65]: le DTPA et ses dérivés (CHX-DTPA, ...); le DOTA et ses dérivés; ou bien les ligands multidentates contenant des groupements catecholate, catecholamide, ou hydroxy-pyridinone. Certains de ces ligands sont par ailleurs utilisés pour la décorporation du Th. Cependant, pour l'utilisation du générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$, aucun de ces ligands n'est adapté à la complexation de l'U(VI). Il faudra donc considérer un système où le vecteur portera deux ligands, un pour fixer l' ^{230}U , et un deuxième pour complexer le ^{226}Th , formé après décroissance. Ce système, à double ligands, semble d'autant plus adapté à notre étude que, comme nous l'avons expliqué précédemment, du fait d'une énergie de recul importante, le ^{226}Th ne sera pas retenu par le vecteur.

Dans la suite de ce travail, nous nous focaliserons sur l'étude du DTPA, comme agent chélatant du Th(IV), par une approche directe et indirecte. Les principaux objectifs de cette étude consistent à :

- Etudier la spéciation du Th(IV) dans le sérum humain. Celle-ci a, à notre connaissance, été très peu étudiée. Il semblerait à priori, d'après Peter et al, que la transferrine soit la protéine principale à considérer dans la spéciation. Cependant aucun paramètre thermodynamique, décrivant l'interaction Th(IV)-protéines, n'a été reporté dans la littérature. Or, afin de décrire la spéciation du Th(IV), ces paramètres doivent être connus.
- Etudier la complexation Th(IV)-DTPA en milieu sérique.

II. Evaluation du DTPA comme agent complexant pour le ^{226}Th

1. Objectif

Le DTPA est connu pour être un bon agent chélatant du Th(IV). L'objectif de cette étude consiste à estimer l'efficacité de ce ligand pour des applications en radiothérapie α ciblée du ^{226}Th , que ce soit par injection directe du ^{226}Th ou sous la forme du générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$. Cette étude nécessite dans un premier temps de décrire quantitativement l'interaction du Th(IV) avec les agents complexants présents dans le sérum. Deux approches ont été utilisées : une approche expérimentale et une approche théorique. Des études par spectroscopie UV différentielle, par ultrafiltration et par chromatographie liquide haute performance à échange anionique ont été réalisées afin de quantifier l'interaction du Th(IV) avec les composants du sérum. Les résultats expérimentaux ont pu être modélisés par la loi d'action de masse, afin d'établir un modèle théorique permettant de décrire la spéciation du Th(IV) en milieu sérique. Une forte interaction a été observée entre la transferrine et le Th(IV), par la formation d'un complexe ternaire faisant intervenir deux carbonates, comme anions synergiques.

Le modèle établi a permis d'estimer l'efficacité du DTPA comme agent complexant du Th(IV). Bien que la complexation Th(IV)/DTPA soit forte ($\log K = 30,3$), le ligand (10^{-6} M) ne peut pas complexer le Th(IV) lorsque celui-ci est en solution dans le sérum humain. Des études expérimentales ont confirmé ces résultats. Il s'est avéré que cette inefficacité n'était pas liée à une compétition entre le DTPA et la transferrine, mais à une forte compétition pour le DTPA entre le Th(IV) et les cations majeurs divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+})

présents dans le sérum. Le DTPA n'étant pas suffisamment sélectif, il ne peut être utilisé pour le générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$.

2. Article 4

Cet article vient d'être soumis pour publication au journal *Journal of Inorganic Biochemistry*. Les numéros des figures, tableaux et références de ce chapitre renvoient à ceux de l'article.

**Is DTPA a good competing chelating agent for
Th(IV) in human serum and
suitable in targeted alpha therapy?**

ABSTRACT

The interaction between thorium and human serum components was studied using difference ultraviolet spectroscopy (DUS), ultrafiltration and high-pressure-anion exchange chromatography (HPAEC) with external inductively conducted plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis. Experimental data are compared with modelling results based on the law of mass action. Human serum transferrin (HSTf) interacts strongly with Th(IV), forming a ternary complex including two synergistic carbonate anions. This complex governs Th(IV) speciation under blood serum conditions. Considering the generally used Langmuir-type model, values of $10^{33.5}$ and $10^{32.5}$ were obtained for strong and weak sites, respectively. We showed that trace amounts of diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) cannot complex Th(IV) in the blood serum at equilibrium. Unexpectedly this effect is not related to the competition with HSTf but is due to the strong competition with major divalent metal ions for DTPA. However, Th-DTPA complex was shown to be stable for a few hours when it is formed before addition in the biological medium; this is related to the high kinetic stability of the complex. This makes DTPA a potential chelating agent for synthesis of ^{226}Th -labeled biomolecules for application in targeted alpha therapy.

Keywords: thorium; targeted alpha therapy, speciation, transferrin, DTPA

Table of Abbreviations :

DTPA	diethylene triamine pentaacetic acid
HSTf	human serum transferrin
HSA	human serum albumin
TAT	targeted alpha therapy
DUS	difference ultraviolet spectroscopy
HPAEC	high-pressure-anion exchange chromatography

NTA	nitrilotriacetic acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ICP-MS	inductively conducted plasma - mass spectrometry

1. Introduction

The quantitative description of the interactions of thorium (IV) with blood serum components is of high relevance for the rational design of molecules suitable for *in vivo* chelation of thorium in medical applications [1, 2] or for decorporation in case of accidental ingestion [3-5]. In the first case, the chelating agent is used to couple the radionuclide to tumor selective carrier molecules to target and destroy cancer cells [6]. Here the Th(IV)-chelate complex is formed *in vitro* before application to the patient. The alpha emitters ^{226}Th ($t_{1/2}=31$ min) and ^{227}Th ($t_{1/2}=18,7$ days) are promising radionuclides for application in targeted alpha therapy (TAT) [1, 2, 7]. In the second case, the ligand should target the unwanted metal ion *in vivo* and form soluble complexes which can be excreted via the kidneys.

Thorium distribution in rats serum was studied by Peter and Lehmann in 1981 [8]. By the means of chromatographic studies and competition experiments with iron, the authors reported that the binding site of Th(IV) was the iron-binding site of transferrin (HSTf). Similar behaviour was reported for different actinides (IV) including Pu(IV) from various *in vivo* and *in vitro* studies [3, 9-11]. The interaction between Th(IV) and HSTf was further studied by Harris et al. [12] by using difference ultraviolet spectroscopy (DUS). As in the iron-transferrin complex, two Th(IV) ions are bound to HSTf protein at the physiological pH. Two and one tyrosine groups were proposed to coordinate to thorium in strong C-terminal and weak N-terminal sites, respectively. In conclusion, HSTf appears as the main component governing Th(IV) speciation in blood serum [13]. An estimation of the complexation constants can be obtained by extrapolation from the empirical law presented by Sun et al. [14]. However, to the best of our knowledge, they have never been experimentally measured. Furthermore, one recent study showed no interaction between Th(IV) and HSTf [15], these results being rather conflicting with the others.

The first objective of the present paper is to complete available literature data to

give a better comprehensive view of Th(IV) speciation in blood serum. The interaction of Th(IV) with HSTf has been studied by Difference ultraviolet spectroscopy (DUS) to determine complexation constants. The effect of human serum albumin (HSA) on Th(IV) speciation in the blood serum, the second important metallo-protein present in the biological medium, has been also estimated. Based on these parameters, and including literature data of thermodynamic constant of Th(IV) complexation with low molecular weigh organic and inorganic ligands, a model calculation was performed to describe Th(IV) interactions in blood serum. The reliability of the simulation is considered regarding the published *in vivo* experimental speciation results [8] and the experimental data from the speciation studies realized by High Pressure Anion Exchange Chromatography (HPAEC) with inductively conducted plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection.

In addition, the developed model is used in combination with *in vitro* studies performed by ultrafiltration, to assess the efficiency of diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) to form stable complexes with Th(IV) under blood serum conditions. DTPA is the chelate recommended for the decorporation of Th(IV) [16]. It is not toxic for humans and forms a strong complex with Th(IV) [17, 18]. According to the “hard and soft (Lewis) acids and bases” (HSAB) theory [19], it presents nitrogen and oxygen atoms suitable for the complexation of the “hard” Th(IV) cation and it is well preorganised for the coordination of spherical cations. Furthermore, it can be easily attached to a biological vector; this is a pre-requisite in TAT and may be useful in chelation therapy. The obtained results are discussed to assess the potential use of DTPA as a chelating agent for TAT with ^{226}Th .

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Human serum transferrin (HSTf, apo-transferrin human $\geq 98\%$, Sigma) was purified by size-exclusion chromatography on a PD-10 column using 0.1 M NaCl / $2 \cdot 10^{-3}$ M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) at pH 7.4 as an eluent. HSTf concentration was determined spectrophotometrically at $\lambda = 280$ nm using $93000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ as a molar extinction coefficient [20]. Human serum albumin (HSA, albumin from human serum

$\geq 96\%$, Sigma) was used as received. Human serum was supplied by Lonza and was diluted in 0.1 M NaCl solution buffered at pH 7.4 equilibrated with 1 % CO₂ gas. Th(IV) stock solution was prepared by dilution of a standard solution of ²³²Th (²³²Th(NO₃)₄(H₂O)₄) (from Prodis) to obtain a final concentration of 2.10⁻³ M. Other chemicals were analytical grade. HSTf, HSA and carbonate stock solutions were freshly prepared before use.

2.2. Samples preparation

Solutions were prepared with ultrapure water (MilliQ, 18 MΩ cm). All experiments were performed in solution of pH 7.4 ± 0.1 and ionic strength of 0.1 (NaCl) buffered with 2.10⁻³ M (HEPES) at room temperature (20 ± 2 °C). Samples in the absence of carbonate were prepared in a glove box under 100% nitrogen atmosphere. Samples in the carbonate system were prepared in a glove box under 99/1% nitrogen/carbon dioxide atmosphere. For the complexation study realized as a function of carbonate concentration, the carbonate ion was added to the solution prepared under 100% nitrogen atmosphere. The samples were then kept closed during the experiment to prevent equilibration with atmospheric CO₂. For the complexation study realized as a function of phosphate or nitrilotriacetic acid (NTA) concentration, the samples were prepared under normal atmosphere. Inorganic carbon concentration was determined at equilibrium by total organic carbon analysis (TOC).

2.3. Analytical tools

pH measurements were performed using a PHM220 from MeterLab. Inorganic carbon analyses were done on a TOC-V_{CSH} apparatus supplied by Shimadzu. Thorium analyses were performed by ICP-MS using a XSeries 2 provided by Thermo Fisher (sensitivity limit of 0.1 ppb). UV-spectra were recorded on a UV-visible UV-2401 PC spectrophotometer from Shimadzu. The centrifugation experiments were performed using a centrifuge RC6 from Thermo Fisher at 27000 g. The HPAEC device was a Dionex UltiMate3000 system consisting of a DGP-3600 MB pump, an AS3000 auto-sampler, a TCC-3200B column oven and a diode array DAD-3000 detector. The stationary phase was a Dionex AS20 anionic exchange column (2 mm diameter x 25 cm length), with an AG20 guard column (2 mm diameter x 5 cm length). The AS20 consists of a hydrophilic polymer grafted with quaternary alkanol ammonium ions. The total capacity represented by both columns is 79 microequivalents.

2.4. Difference ultraviolet spectroscopy (DUS)

DUS is the most widely used technique to evaluate metal binding to HSTf [21]. Metal complexation was estimated from the absorbance measurements using the difference spectra of the metal–protein complexes vs. unmetallated apo–protein. Experimental conditions are reported in Table 1. The peak area in the range 220–270 nm were monitored to describe and to quantify Th(IV)–HSTf interaction. Equilibrium is established when the absorbance does not change during an interval of 2 hours. The error associated to the absorbance was estimated as 0.03 based on repetitive experiments. The main advantage of the method is that the absorbance signal of HSTf is not influenced by the signals of other ligands which might interact with Th(IV) (e.g. carbonate). The interactions of HSA, DTPA and citrate with Th(IV) were studied using competitive method with HSTf [22].

Table 1: Experimental conditions

Method	[Th(IV)] (M)	[HSTf] (M)	carbonate	Experiment	Figure
DUS	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	atmosphere	NTA titration	1(B)
	$2 \cdot 10^{-6}$	10^{-6}	atmosphere	phosphate titration	not shown
	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	0 - 0,05 M	carbonate titration	2(B)
	10^{-6} - $3,5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	Th(IV) titration	2(D)
	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	competition with HSA ($5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-4} M)	3
	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	competition with DTPA ($7,5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-4} M)	5
	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	competition with citrate ($7,5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-4}$ M)	5
HPEAC	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	Th(IV)-HSTf interaction	4(A,D)
	$2 \cdot 10^{-5}$	-	p(CO ₂) 1%	Th(IV)-HSA ($6 \cdot 10^{-5}$ M) interaction	4(A,D)
	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	competition with HSA ($6 \cdot 10^{-5}$ M)	4(B,E)
	$2 \cdot 10^{-5}$	-	p(CO ₂) 1%	Th(IV)-serum interaction	4(C,F)
ultra-filtration	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	p(CO ₂) 1%	Th(IV) speciation in serum	not shown
	$2 \cdot 10^{-7}$	-	p(CO ₂) 1%	<i>in vitro</i> studies in human serum with DTPA	6

2.5. Ultrafiltration

This technique was used for Th / HSTf (1% CO₂) and Th / serum (1% CO₂) systems to differentiate the fraction of thorium bound to low– and high–molecular weight compounds. Experiments were performed in dialysis bags (Microcon Millipore, 3 kDa) and the separation

was done by centrifugation at 27000 g. Thorium concentration in the filtrates was determined by ICP–MS analysis. A blank was systematically done in parallel to assess the amount of Th(IV) adsorbed on the membrane. It was assumed that the separation time (typically 30 minutes) was not sufficient to perturb equilibrium conditions and that the concentration of Th(IV) in the filtrate represented the concentration of Th(IV) associated to the low-molecular weight compounds (e.g. OH⁻, CO₃²⁻).

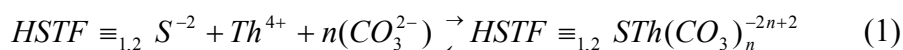
2.6. HPAEC analysis

The eluent at pH 7.4 was a solution of 0.1 M NaCl buffered with 2.10⁻³ M phosphate buffered saline (PBS, that as 10-fold concentrate, contains 0.1 M of sodium phosphate (Na₃PO₄) and 9% of NaCl) equilibrated with 1 % CO₂ gas controlled by bubbling. The choice of 1 % CO₂ will be explained latter. Samples and eluent were prepared in a glove box under 99/1% nitrogen/carbon dioxide atmosphere. The anion exchanger was pre-equilibrated with the eluent before starting the experiments. Samples were injected into the column through a 50 μL sample loop injector, with a flow rate of 350 μL.min⁻¹. Proteins and serum were detected spectrophotometrically at 280 nm. Th(IV) concentration was determined from collected fractions by ICP–MS analysis.

2.7. Modelling

Computer simulations were performed with the PHREEQC program [23]. Stability constants for metal ion complexes in solution are reported in Table 2 and were taken from NEA–OECD compilation [24] (complexation of Th(IV) with inorganic ligands), IUPAC [17], NIST database [18] (Th(IV) / DTPA) and from [25] for citrate and [26] for NTA. The pKa values of sulphates and phosphates ions given by PHREEQC database were taken into account. The constants given in the NIST database at an ionic strength (I) of 0.1 M were extrapolated at zero ionic strength using the truncated Davies equation [27].

The complexation of Th(IV) with HSTf was described with the model proposed by Montavon et al. [28]. The interaction between Th(IV) and HSTf was described by using two binding sites at the protein surface (HSTF≡₁S and HSTF≡₂S). Any metal ion considered [21], the stability constants for interaction with the binding sites differ by approximately one unit of their log K value, the difference being probably related to outer–sphere effects [22]. This ratio of 10 for K was set as a fixed parameter in the fitting of our experimental data. Consequently, the formation of the complex has been described as:



Where $HSTF \equiv_{1,2} S$ and $HSTF \equiv_{2,2} S$ represent the strong and weak binding sites, respectively, and the charge of -2 relates to the two deprotonated tyrosine groups.

Table 2: Formation of complexes between Th(IV) and low-molecular-weight ligands; equilibria relevant in the experimental conditions of this work and associated constants used for the modelling. Acid-base properties of the ligands can be found in the references. All constants are given at an ionic strength of $I=0$, 25°C. The values in *italic* are recalculated using the truncated Davies equation [26].

	species	equilibrium reaction	logK	Ref
inorganic ligands	$Th(OH)_4$	$Th^{4+} + 4 OH^- = Th(OH)_4$	-17.4	[24]
	$(Th)_4(OH)_{12}^{+4}$	$4Th^{4+} + 12H_2O = (Th)_4(OH)_{12}^{+4} + 12H^+$	-26.6	[24]
	$Th(OH)_2(CO_3)_2^-$	$Th^{4+} + 2OH^- + 2 CO_3^{2-} = Th(OH)_2(CO_3)_2^-$	36.8	[24]
	$Th(H_2PO_4)_2^{+2}$	$Th^{4+} + 2H_3PO_4 = Th(H_2PO_4)_2^{+2} + 2H^+$	6.2	[24]
	$ThSO_4^{+2}$	$Th^{4+} + SO_4^{-2} = ThSO_4^{+2}$	6.2	[24]
	$ThCl^{+3}$	$ThCl^{+3}$	1.7	[24]
	$Th(NO_3)^{+3}$	$Th^{4+} + NO_3^- = ThNO_3^{+3}$	1.3	[24]
citrate ion	ThL^+	$Th^{4+} + L^{-3} = ThL^+$	15.7	[25]
DTPA	ThL^-	$Th^{4+} + L^{-5} = ThL^-$	32.9	[18]
	$ThLH$	$ThL^- + H^+ = ThLH$	2.37	[18]
	$ThLOH^{-2}$	$Th^{4+} + L^{-5} + H_2O = ThLOH^{-2} + H^+$	23.6	[18]
	ThL^+	$Th^{4+} + L^{-5} = ThL^+$	33.1	[17]
NTA	ThL^+	$Th^{4+} + L^{-3} = ThL^+$	17.1	[26]
	ThL_2^{-2}	$ThL^+ + L^{-3} = ThL_2^{-2}$	14.2	[26]

Alternatively modelling was also performed using the Langmuir-type model generally used in the literature. The model takes into account the metal ion speciation and the presence of two binding sites at the protein surface:



The constants $\log K_1=19.3$ and $\log K_2=18.2$ have been extrapolated from the empirical expression given in [29] and derived from the work presented in [14]. A similar

Langmuir–type model was used to describe Th(IV)/HSA interaction with the consideration of one binding site.

In conclusion, for the two studied systems Th(IV)/HSTf and Th(IV)/HSA, there is only one unknown parameter (complexation constant) to be determined. The fitting of experimental data was done “by hand”.

3. Results and discussion

3.1. Binding of Th(IV) to protein

3.1.1. Binding of Th(IV) to HSTf

Complexation of Th(IV) with HSTf did not occur under physiological–type conditions (pH=7.4, 0.1 M NaCl) when precaution was taken for avoiding equilibrium with atmospheric CO₂. HSTf was not able to compete with OH⁻ in the main Th(OH)₄ and (Th)₄(OH)₁₂⁺⁴ forms. To complex Th(IV), a synergistic anion was therefore considered in the present work, starting with the NTA, the one used by Harris et al. and Jeanson et al in previous studies [12, 15]. The second one corresponds to carbonate, CO₃²⁻ being the synergistic anion allowing the complexation with iron and other metal ions [21]. Finally, the third one is HPO₄²⁻, phosphate ions being present in the blood serum and being known to be a strong complexing agent for Th(IV) in environmental samples [30].

Complexation as a function of NTA concentration has been first investigated. The complexation kinetic was very slow; more than 4 days were necessary to reach equilibrium between Th(IV) and HSTf. The experimental data are presented in Figure 1. The complexation with HSTf starts above 10⁻⁶ M to reach a maximum of complexation at about 10⁻⁴ M, corresponding to an absorbance at 242 nm of 0.28. The start of this increase coincides with the significant formation of Th(L)₂²⁻ species (L=deprotonated NTA) in the absence of HSTf (figure 1A). Our data are coherent with the one reported by Harris et al. (figure 1B). Above 10⁻⁴ M, the decrease in absorbance indicates dissociation of the Th–HSTf complex arising from the increasing competition between free NTA and HSTf for Th(IV) as NTA concentration increases.

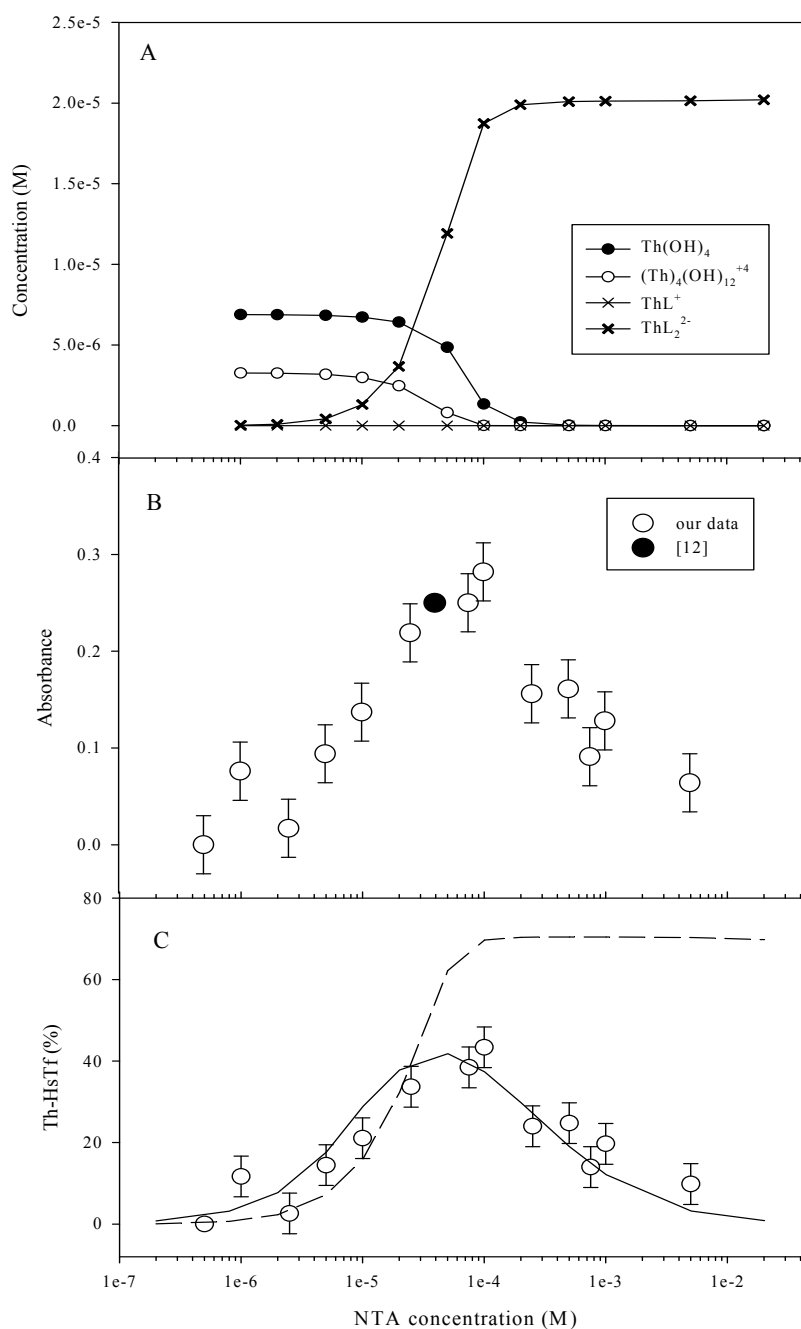


Figure 1: Complexation of Th(IV) as a function of NTA concentration. Experimental conditions and parameters used for the modelling with low-molecular weight compounds are summarized in Tables 1 and 2, respectively. (A) Th(IV) speciation calculated in the absence of HSTf. (B) Absorbance measured as a function of NTA concentration and comparison with literature data [12]. (C) Comparison between experimental data and modelling considering one NTA (solid line; $\log K_1 = 31$, $\log K_2 = 30$) and two NTA (dotted line; $\log K_1 = 41$, $\log K_2 = 40$) acting as synergistic anions. L^{3-} stands for deprotonated NTA.

Complexation as a function of carbonates concentration has been investigated in a second step. Kinetic of complexation was more rapid than in the presence of NTA (30 hours vs 4 days). The experimental data are presented in Figure 2B. In the carbonate concentration

range from 0 to 10^{-4} M, no complexation between Th(IV) and HSTf has been observed. The complexation with HSTf starts for a carbonate concentration above 10^{-4} M, until a plateau is reached corresponding to an absorbance of 0.47. It is worth saying that the complexation coincides with the significant formation of the ternary complex $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ in the absence of HSTf (figure 2A).

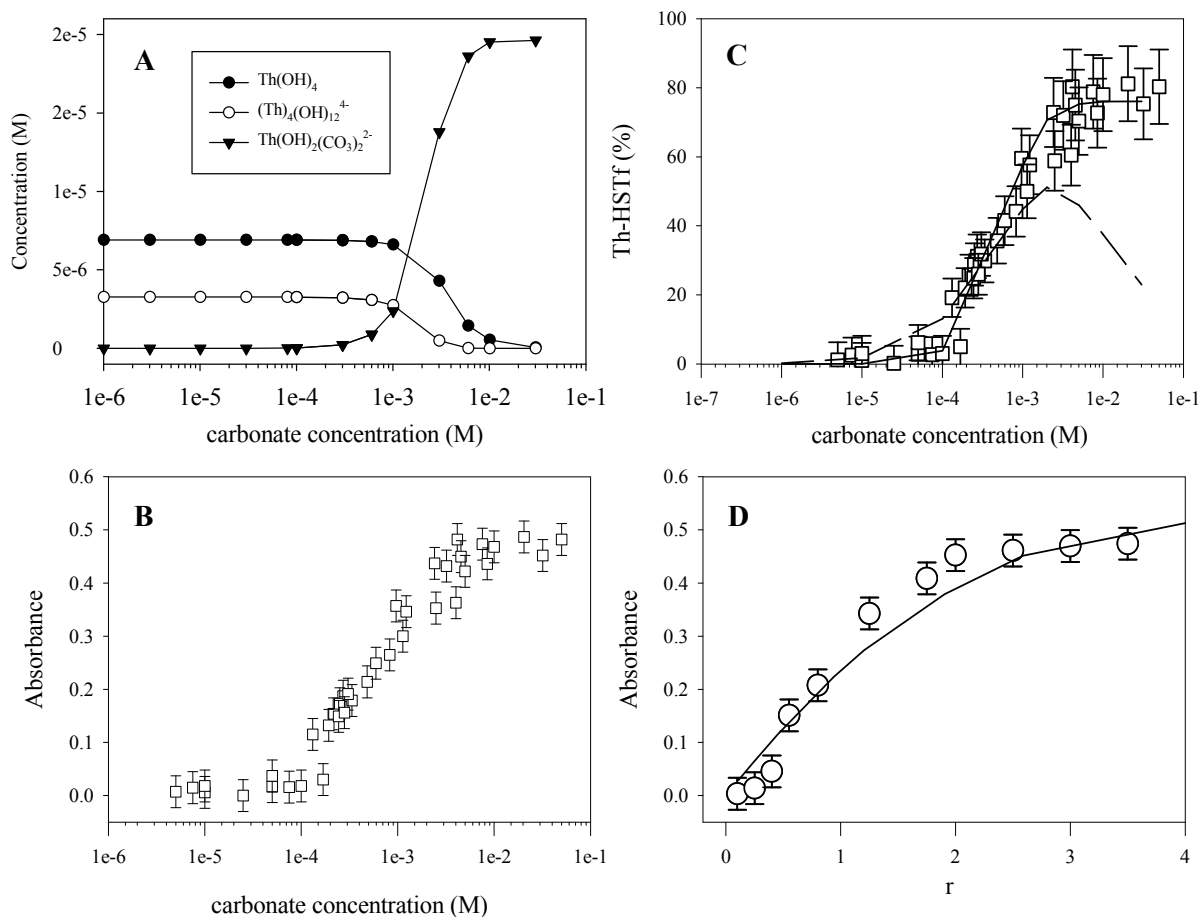


Figure 2: Complexation of Th(IV) by HSTf in the presence of carbonates. Experimental conditions and parameters used for the modelling with low-molecular-weight compounds are summarized in Tables I and II, respectively. (A) Th(IV) speciation calculated in the absence of HSTf. (B) Absorbance measured as a function of carbonate concentration. (C) Comparison between experimental data and modelling considering one carbonate (dotted line; $\log K_1 = 27$, $\log K_2 = 26$) and two carbonates (solid line; $\log K_1 = 33.5$, $\log K_2 = 32.5$) acting as synergistic anions. (D) Absorbance measured as a function of the ratio (r) between total Th and HSTf concentrations. The line represents the simulation made with $\log K_1 = 33.5$, $\log K_2 = 32.5$ and $(\Delta\epsilon_{\text{obs}}) = 60 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Complexation as a function of phosphate concentration has also been studied. In the concentration range from 0 to 10^{-2} M, no complexation was observed between Th(IV) and HSTf even after 2 weeks of equilibration (data not shown). Unlike NTA and carbonate, phosphate does not act as synergistic anion.

A quantitative analysis of experimental data obtained with NTA and carbonates was done as follows: the shape of the curves was reproduced by varying the values of the complexation constants between Th(IV) and HSTf and the conversion of absorbance in concentration was done considering a proportionality according to the Lambert–Beer–law (Figures 1C and 2C). In the case of NTA system, we considered the possible formation of ThL_2^{2-} , the main species existing under our conditions. A curve similar to that experimentally observed in the presence of carbonate is predicted with the occurrence of a plateau for the highest NTA concentrations studied. The decrease of complexation observed above NTA concentration of 10^{-4} M can be quantitatively explained considering the complexation of HSTf with one Th(IV) and one ligand L^{3-} . A good agreement between the experiment and the modelling was obtained with $K_1 = 10^{31}$ and $K_2 = 10^{30}$, provided that the maximum of complexation / absorbance observed corresponds to 40 % of Th(IV) complexed to the protein (figure 1C).

For the carbonate series, we first considered the formation of a ternary complex involving one carbonate ion, as it is the case for Fe(III) or U(VI) [21, 28]. The increase of complexation can be relatively well reproduced till a carbonate concentration of 10^{-3} M with stability constants of $\log K_1 = 27$ and $\log K_2 = 26$ for strong [31] and weak sites, respectively. At higher carbonate concentrations, the fraction of HSTf bound to Th(IV) is expected to decrease, due to increasing competition of carbonate with HSTf for Th(IV) complexation leading to the complex $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ (dotted line in Figure 2C). A much better agreement was obtained with two carbonate ions acting as synergistic anions: both the increase of the curve and the plateau were well described by simulation with $\log K_1 = 33.5$ and $\log K_2 = 32.5$. This complexation might result from the complexation of the existing species $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ after release of two hydroxide groups. It is important to notice, that the agreement between the experiment and the theory is good provided that we consider 24% of Th(IV) not bound to the protein on the plateau (figure 2C). This was confirmed experimentally by ultrafiltration experiments; 17 ± 2 % of Th(IV) passed through the membrane and was therefore not bound to the protein.

The analysis of the data shows that the nature of the ternary complexes and the associated stability constants rely on the quantitative description of Th(IV) interaction with low-molecular weight compounds. We can finally calculate for the complexes 2:1 Th(IV):HSTf apparent absorptivities normalized with respect to HSTf concentration ($\Delta\varepsilon_{\text{obs}}$)

of $= 60 \pm 7$ and $65 \pm 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for carbonate and NTA systems, respectively. The value obtained for the carbonate system was used to simulate the titration curve of HSTf with Th (Figure 2D). The determination of similar values, within experimental errors, is in agreement with the fact that the absorption band is linked to the interaction of the metal ion to the phenolic groups of the tyrosine residues which is expected similar in the two studied systems. The difference in type and number of synergistic anions coordinated in the first coordination sphere do not contribute to the extinction coefficient.

Interaction of Th(IV) with HSTf, compared to the interaction U(VI)-HSTf or Fe(III)-HSTf, seems to be different. First, two carbonates are necessary to bind to Th(IV), whereas only one synergistic ion is necessary for most the metal ions, like Fe(III) or U(VI). Secondly, kinetics of complexation at HSTf surface are slow for Th(IV), whereas they are rapid for Fe(III) or U(VI) (only 20 min for U(VI) binding vs 30 h for Th(IV)) [28, 31]. It is worth saying that the absence of complexation between Th(IV) and transferrin observed by Jeanson et al [15] is certainly due to a kinetic problem; Th and HSTf were contacted only for a few hours. Several parameters may explain these differences between Th(IV) and Fe(III) binding. The ionic radius, for example, being much higher for Th ($r = 105 \text{ pm}$) than for Fe ($r = 65 \text{ pm}$) [32], the penetration of Th(IV) into the lobe of the protein may be more difficult resulting into slower kinetics. Moreover, the coordination number is 8 for Th(IV), whereas it is of 6 for Fe. In both the N- and C-terminal binding sites of HSTf, the metal ion is coordinated by four groups: two tyrosines, one histidine, and one aspartic acid providing four coordination sites for the metal. Th(IV) with a coordination number of 8, needs to complete its coordination sphere with four other coordinating groups, e.g. by two synergistic carbonates, in a bidentate mode of coordination. Fe, to complete its coordination sphere, needs only one carbonate. The occurrence of only one synergistic anion coordinated in the presence of NTA may result from steric effects, NTA being larger than carbonate.

The experiments reported in the following part have been realized at a carbonate concentration of $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (1 % CO_2), where maximal complexation between Th(IV) and HSTf occurs.

3.1.2. Binding of Th(IV) to HSA

The interaction between Th(IV) and HSA has been studied using the DUS competition method in the presence of HSTf. This method is applicable for $[\text{HSA}] < 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, corresponding to about one eighth of the HSA concentration found in human serum. Above

HSA concentrations of $8 \cdot 10^{-5}$ M, the DUS competition method was no more applicable because the signal to noise ratio became too low. Experimental data are shown in Figure 3. In this range of HSA concentration, no significant complexation between Th(IV) and HSA was observed; although the absorbance of the Th(IV)-HSTf complex shows a decreasing trend with increase of [HSA], the decrease was not significant within experimental errors. The data show that interaction of Th(IV) with HSTf is stronger than with HSA: in the presence of eight times more HSA than of HSTf, Th(IV) remains bound to HSTf.

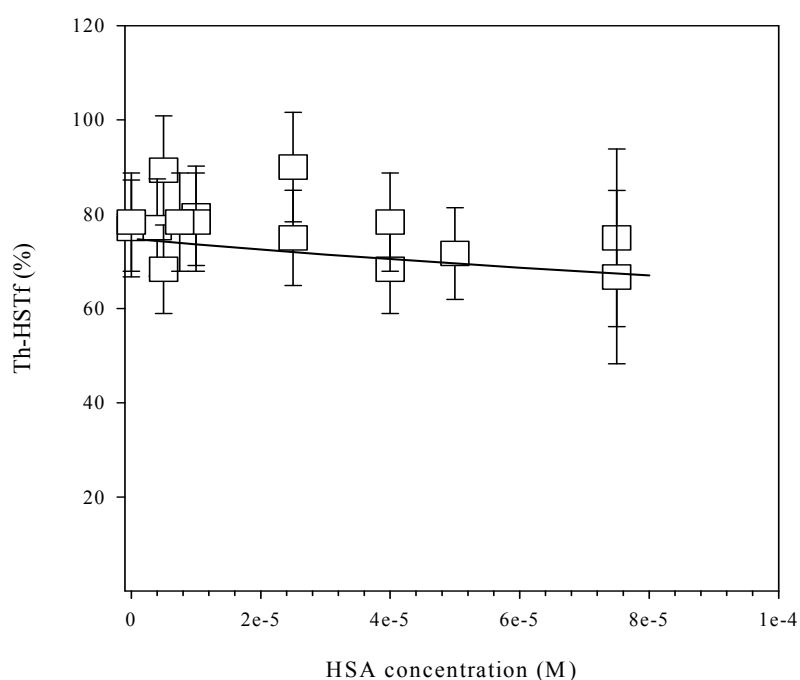


Figure 3: Competition between HSTf and HSA followed by DUS. Experimental conditions and parameters used for the modelling with low-molecular weight compounds are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Th(IV)/HSTf interaction was described considering two carbonates bound with $\log K_1 = 33.5$ and $\log K_2 = 32.5$. Th(IV)/HSA interaction was described using a Langmuir-type model with $K = 10^{17.5}$.

3.2. Th(IV) speciation in human serum

As mentioned in the introduction, the behaviour of Th in the presence of proteins and in serum has been studied by HPAEC with external ICP-MS analysis. Usual hyphenated techniques of speciation of trace elements in biological environment were reviewed by Lobinski et al. [33]. The data with good sensitivity were obtained, more often, by using the size-exclusion or reversed phase HPLC chromatography allowing species separation. Having also interest to identify free Th or complexed Th chemical forms, we have been working on anion-exchange chromatography with the detection done by ICP-MS general method.

On the basis of the results presented in the previous section, we expect that Th(IV) is mainly interacting with HSTf in human serum. An attempt to confirm this result is presented in this section both experimentally by HPAEC and theoretically.

3.2.1. HPAEC–ICP–MS results

Under non-perturbing conditions (the eluent corresponds to a physiological-type medium; pH=7.4, 0.1 M NaCl), the method allows the separation of HSA and HSTf proteins: HSTf is not retained (elution time = 2.5 min) while HSA is eluted as a broad peak at 10.5 min. The method has been tested for Th(IV) speciation in blood serum using physiological-type media.

Figure 4 shows UV- and ICP–MS–chromatograms obtained with the different samples described in Table 1. Experiments were first realised in physiological-type media where the $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ complex is the major Th(IV) species in solution. Only 0.5 % of Th(IV) could be eluted and no significant peak has been attributed to $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ or detected in the time scale studied (1h30). A cleaning method with acidic solution (1 M HCl) was used to eliminate not restored Th(IV) after each experiment. The origin of this strong interaction is not known, but it will modify the equilibrium conditions controlling Th(IV) speciation in the injected solutions, as shown below.

For the injection of the solution of Th(IV) pre-equilibrated with HSTf, the Th(IV) peak was detected at the position corresponding to the one of HSTf (Figure 4A,D). This corresponds to the direct signature of the complex formed and identified by DUS. However, only 6% of Th(IV) could be recovered (96% of this fraction being present with HSTf), while 80% of Th(IV) was initially bound to HSTf in the injected solution. A similar result was obtained in the presence of HSA, Th(IV) being eluted at the retention time of HSA between 10 and 15 min (Figure 4A,D). 0.5% of the total concentration was recovered; 80% of this Th(IV) was found to be bound to HSA. Both Th(IV)–HSTf and Th(IV)–HSA complexes can therefore be identified by HPAEC. The interaction strength between Th(IV) and the proteins is strong enough for avoiding a complete sorption of $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ by equilibrium displacement on the resin. The percentage of eluted Th(IV) being less in the presence of HSA than in the presence of HSTf indicates that the stability constant is higher for HSTf than for HSA, in agreement with the results of the previous section.

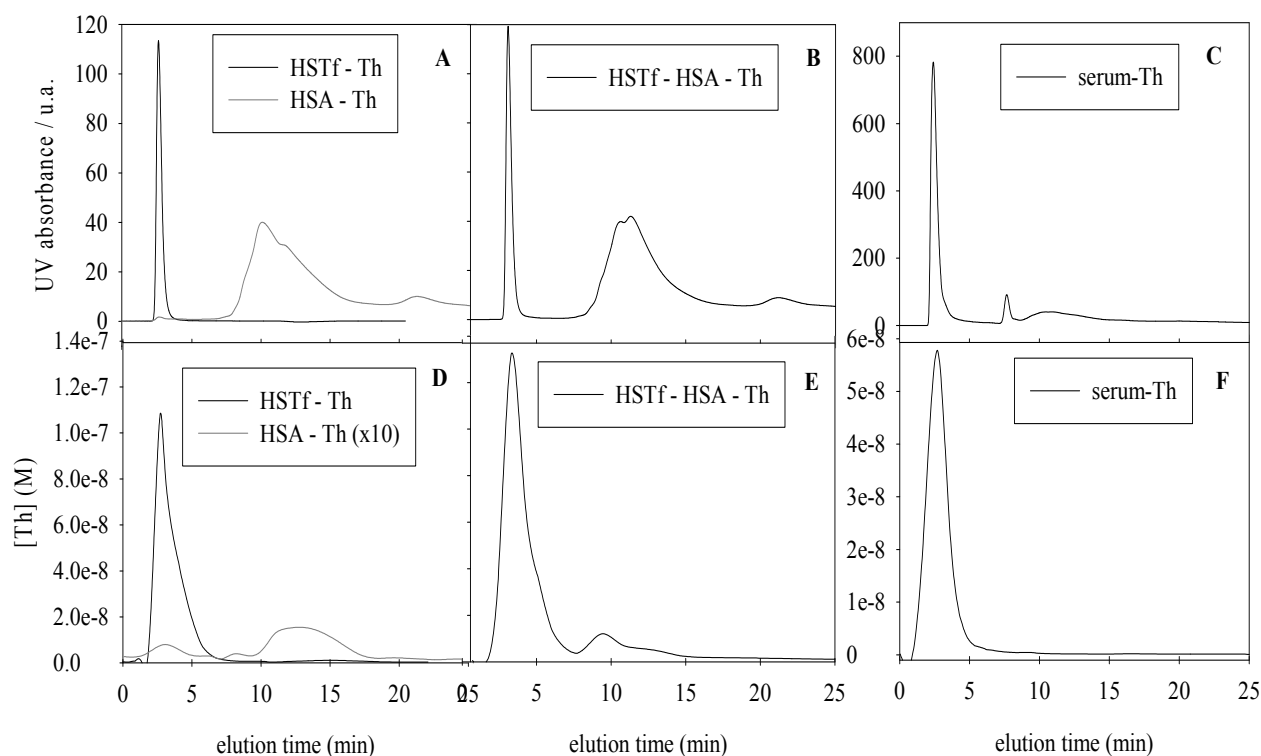


Figure 4: UV- (A,B,C) and ICP-MS- (D,E,F) chromatograms determined by HPAEC. See Table 1 for the experimental conditions. Eluent = 0.1 M NaCl, $2 \cdot 10^{-3}$ M PBS, pH 7.4, 1% CO_2 .

Th(IV) was next mixed with both proteins (HSTf and HSA) (Figure 4B,E). HSTf and HSA concentrations were fixed to mimic proteins concentrations in human serum (see Table 1). As in previous experiments, only a few percent of Th(IV) were eluted (10.5 %). 85% of Th(IV) content was found to be bound to HSTf, the rest was in interaction with HSA (15%). This distribution can be quantitatively calculated using the complexation constants describing Th(IV)/HSTf interaction and considering a complexation constant of $10^{17.5}$ for describing Th(IV)/HSA interaction. This estimated value was next used for the treatment of DUS experimental data (Figure 3A). As shown in Fig 3A, a slight decrease of the percentage of the Th(IV)-HSTf is predicted as the HSA concentration increases, although this trend could not be experimentally proven because of too high uncertainties associated to the absorbance measurements.

Th(IV) speciation was next studied in human blood serum corresponding to the “real” biological system. After equilibration in the biological media for 24 hours, Th(IV) was eluted at the retention time between 3 and 5 min (9% eluted). Th(IV) appears to be well in interaction with HSTf, nevertheless no interaction with HSA was determined contrary to the

observation in the synthetic system of Th(IV)/HSTf/HSA. This result is in agreement with Peter and Lehmann's work reported that the Th was bound to HSTf in the serum of rat [8].

3.2.2. Modelling

Both data obtained *in vivo* as well as the results of our study identify HSTf as the key component governing Th(IV) speciation in blood serum. Similar to the study published on speciation of uranium in human blood serum [34], we wanted to verify these experimental results for trace concentrations of Th(IV) (10^{-9} M) in a predictive way by using the law of mass action principle. Due to the complexity of the human serum, the following simplifications were considered on the basis that the interaction strength of given serum components with Th(IV) will depend on their concentrations as well as on their equilibrium complexation constants:

(i) all relevant inorganic ligands were taken into account (hydroxide, carbonate, phosphate, chloride, sulphate, nitrate) with the constants given in Table 2;

(ii) for the low-molecular-weight organic components, only the citrate ion was considered (Table 2) as it is present in human serum at a relatively high concentration (1.6×10^{-4} M) and has a relatively high stability constant for Th(IV) complexation [25];

(iii) both HSTf and HSA proteins were considered with the constants given in Figures 2 and 3 captions;

(iv) given the high affinity of iron for HSTf, we can safely consider that trace concentrations of Th(IV) can not compete with Fe(III) for HSTf binding sites. The number of available HSTf binding sites was therefore set to 70 % of the total capacity, corresponding to the fraction of HSTf not loaded with ferric ion [35];

(v) Ca was considered as a competitive metal ion for HSA sorption sites [28].

In agreement with experiments performed with blood serum, 99.9 % of Th(IV) is predicted bound to the protein pool, 99% being attached to HSTf. A less good agreement was obtained using Th(IV)/HSTf constants extrapolated from the relation of Sun et al. [14] reviewed by Ansoborlo et al. [29] ($\log K_1=19.3$ and $\log K_2=18.2$): the model predicted 48 % of Th(IV) under the form $\text{Th}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2^{-2}$, the rest being bound to HSTf. This shows that the extrapolation is misleading in the present case resulting in an underestimation of Th(IV)/HSTf interaction. The values to be used and which can be

recalculated from our data according to Eq. (2) are $\log K_1 = 21.2$ and $\log K_2 = 20.2$. All the results show that HSTf is the key component governing Th(IV) speciation in blood serum.

3.3. Potential of DTPA as chelating agent for Th(IV) in blood serum

3.3.1. Theoretical considerations

The DTPA ability to complex Th(VI) under biological conditions was first studied by DUS experiment in the physiological-type model medium (pH=7.4, 0.1 M NaCl) in the presence of HSTf. Complexation of Th(IV) with citrate was studied for comparison. The results of the titration curves are given in Figure 5.

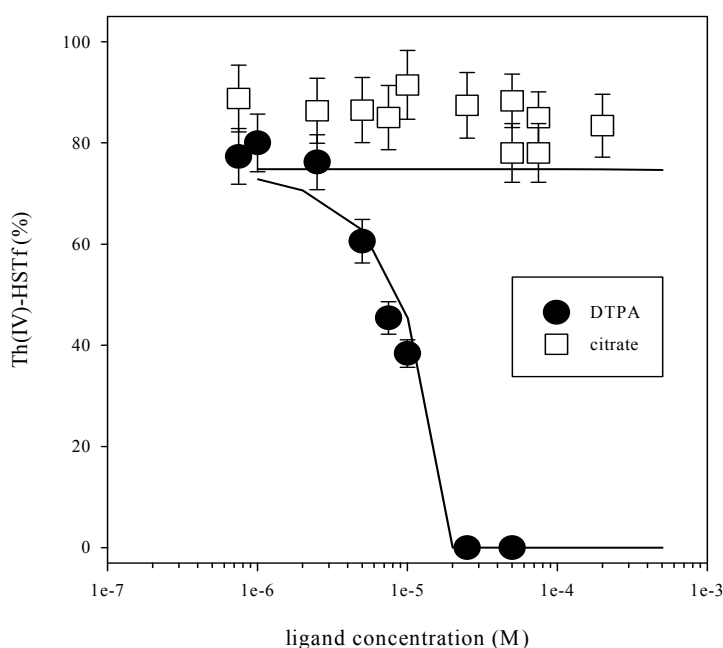


Figure 5: Competition between HSTf and DTPA and citrate followed by DUS. Experimental conditions and parameters used for the modelling with low-molecular-weight compounds are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Th(IV)/HSTf interaction was described considering two carbonates bound with $\log K_1 = 33.5$ and $\log K_2 = 32.5$.

Whereas the citrate ion cannot compete with HSTf for Th(IV) in the whole range of ligand concentration studied (10^{-6} M – $3.5 \cdot 10^{-4}$ M) (see Th(IV)–citrate constant in Table 2 and complexation constants previously determined with HSTf), DTPA starts to complex Th(IV) at the concentration of 10^{-6} M to reach conditions where 100% of Th(IV) is complexed with DTPA. An attempt of quantification was also done for the DTPA series. Since the recent NEA-OECD database does not propose any stability constant for Th/DTPA interaction, we have used two different quantitative models. The first one involves one complex ThL^- with $\log K$ of 33.1 ($I=0$) [17] whereas the second one considers different species proposed in the

NIST database [18], i.e. ThL^- , ThHL and ThOHL^{2-} with thermodynamic constants recalculated at $I=0$ (Table 2). The ThL^- is the major species under studied experimental conditions. A good agreement between the experiment and the calculation was obtained for $\log K(\text{ThL}^-) > 10^{29}$. This is in agreement with published constants and this allows an indirect validation of the complexation constants quantifying the interaction between Th(IV) and HSTf. We will next use the data from [17] for the simulations.

DTPA is a stronger chelating agent than citrate and its strong affinity for Th(IV) explains the application of this ligand as a decorporation agent [16]. Note that hydroxypyridone ligands appear more efficient than DTPA for *in vivo* decorporation of Th(IV) [4, 5]. In such an application, the amount of chelating agent is relatively important allowing to reach high concentrations at the injection points (about 0.01 M after injection of 200 mL of saline buffer considering a common dose of 30 $\mu\text{mol/kg}$ body mass and a 70 kg person) and after dilution in the blood ($\sim 4 \cdot 10^{-4}$ M for 5 L of blood volume) [36]. According to our simple model developed for the serum, the efficiency of complexation is predicted *in vivo* in both conditions with 100 % of Th(IV) bound to DTPA considering trace concentrations of Th(IV) (10^{-9} M). Taking into account the amount of ligand injected, we have neglected competition effects with trace metal ions but we have considered a possible competition with major cations using the $\text{DTPA}/\text{M}^{2+}$ ($\text{M}^{2+}=\text{Mg}^{2+}$, Fe^{2+} , Ca^{2+}) constants and “free” blood concentrations (i.e. not bound to proteins) given in [18], and [29], respectively. The complexation with Th(IV) can thus occur and the complex can be eliminated naturally when used immediately after the contamination.

The quantitative analysis show that the complexation becomes inefficient ($\sim 1\%$ complexed) for a DTPA concentration of $\leq 10^{-5}$ M. It is worth saying that this inefficiency is not related to the HSTf vs DTPA competition but to the increasing competition with the divalent Fe^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} ions as the ligand concentration decreases. When the Th(IV)/M(II) competition was not considered, the complexation remained efficient for trace DTPA concentration (10^{-9} M) with 71 % of Th(IV) complexed with DTPA. For TAT application, the concentration of injected chelate is usually about 10^{-9} M reaching a value around $5 \cdot 10^{-11}$ M after dilution in the blood serum. Taking into account this concentration, DTPA will be inefficient to complex Th(IV) *in vivo*.

3.3.1. *In vitro* studies

In vitro experiments have been carried out to assess the reliability of the above predictions. Th(IV) speciation was followed by ultrafiltration allowing the separation between low-molecular (i.e. DTPA) and high-molecular (i.e. HSTf) weight compounds. Considering the sensitivity of the ICP-MS and the dilution required for the analysis, Th and DTPA concentrations were fixed at $5 \cdot 10^{-7}$ M and 10^{-6} M, respectively. The concentrations are weak enough to expect an inefficient Th(IV) complexation (see the above section).

Experimental results are shown in Figure 6. In the first experiment, Th(IV) is pre-equilibrated with serum before addition of DTPA. In agreement with the prediction, DTPA cannot catch Th(IV) in the blood serum. In the second experiment, DTPA was pre-equilibrated with Th(IV) in 0.1 M NaCl before addition in the human serum. The Th–DTPA complex appears surprisingly stable. This is explained by the strong kinetic stability of Th–DTPA complex: the reaction time is not sufficient to reach equilibrium conditions in the time scale studied (till five hours). Five hours correspond to about 10 half-lives of ^{226}Th , the time for the radionuclide to “disappear”. Therefore, although DTPA cannot complex Th(IV) *in vivo*, it may be efficient to carry the radionuclide in TAT, when the biological molecule is being labelled before injection.

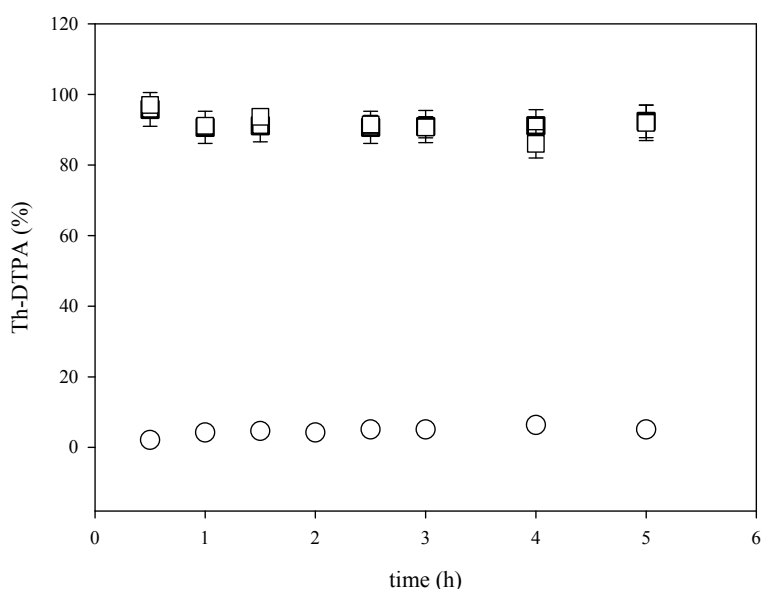


Figure 6: Stability of Th–DTPA complex in the serum followed by ultrafiltration as a function of the time. DTPA and Th concentration were fixed at 10^{-6} and $5 \cdot 10^{-7}$ M, respectively. (□) Th–DTPA was pre-equilibrated before addition in the serum. (O) Th was added in the serum containing DTPA.

4. Conclusion

HSTf governs Th(IV) speciation in the blood serum. This was shown both experimentally and theoretically. Using the generally used Langmuir-type model, values of $10^{21.2}$ and $10^{20.2}$ were obtained for strong and weak sites, respectively. Although DTPA appears to be a good decorporation agent, the thermodynamic predicts that its concentration used in TAT is not sufficient to allow an efficient complexation of Th(IV). This inefficiency is surprisingly not related to the competition with HSTf but is related to the strong competition with major divalent metal ions for DTPA. However, the high kinetic stability of Th–DTPA complex allows use of the ligand for synthesis of ^{226}Th labeled biomolecules, when the complex is formed before injection. Studies on the stability and cytotoxicity of ^{226}Th –DTPA–antibody constructs *in vitro* and *in vivo* are ongoing.

5. Acknowledgment

We thank the financial support for Alicia Le Du provided by the region Pays de la Loire (project PRORRIM 2), and the “Ecole des Mines de Nantes”.

References

- [1] J. Dahle, J. Borrebaek, T.J. Jonasdottir, A.K. Hjelmerud, K.B. Melhus, O.S. Bruland, O.W. Press, R.H. Larsen, *Blood*, vol. 110, 2007, pp. 2049-2056.
- [2] A. Morgenstern, O. Lebeda, J. Stursa, F. Bruchertseifer, R. Capote, J. McGinley, G. Rasmussen, M. Sin, B. Zielinska, C. Apostolidis, *Analytical Chemistry*, vol. 80, 2008, pp. 8763-8770.
- [3] E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, V. Moulin, F. Taran, T. Bailly, R. Burgada, M.H. Henge-Napoli, A. Jeanson, C. Den Auwer, L. Bonin, P. Moisy, *Comptes Rendus Chimie*, vol. 10, 2007, pp. 1010-1019.
- [4] G.N. Stradling, *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 53, 1994, pp. 297-304.
- [5] G.N. Stradling, *Journal Of Alloys And Compounds*, vol. 271, 1998, pp. 72-77.
- [6] G. Sgouros, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, 2008, pp. 1402-1406.
- [7] A. Morgenstern, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, R. Capote, T. Gouder, F. Simonelli, M. Sin, K. Abbas, *Applied Radiation And Isotopes*, vol. 66, 2008, pp. 1275-1280.

- [8] E. Peter, M. Lehmann, *International Journal Of Radiation Biology*, vol. 40, 1981, pp. 445-450.
- [9] D.M. Taylor, *Journal Of Alloys And Compounds*, vol. 271, 1998, pp. 6-10.
- [10] I. Llorens, C. Den Auwer, P. Moisy, E. Ansoborlo, C. Vidaud, H. Funke, *Febs Journal*, vol. 272, 2005, pp. 1739-1744.
- [11] D.M. Taylor, J.R. Duffield, D.R. Williams, L. Yule, P.W. Gaskin, P. Unalkat, *European Journal Of Solid State And Inorganic Chemistry*, vol. 28, 1991, pp. 271-274.
- [12] W.R. Harris, C.J. Carrano, V.L. Pecoraro, K.N. Raymond, *Journal Of The American Chemical Society*, vol. 103, 1981, pp. 2231-2237.
- [13] J.B. Vincent, S. Love, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, pp. in press.
- [14] H.Z. Sun, M.C. Cox, H.Y. Li, P.J. Sadler, *Metal Sites In Proteins And Models*, vol. 88, 1997, pp. 71-102.
- [15] A. Jeanson, M. Ferrand, H. Funke, C. Hennig, P. Moisy, P.L. Solari, C. Vidaud, C. Den Auwer, *Chemistry-A European Journal*, vol. 16, pp. 1378-1387.
- [16] M. Ammerich, J. Blanc, H. Boll, M. Bourguignon, P. Carli, E. Carosella, X. Castagnet, C. Challeton de Vathaire, P. Chappé, J. Chicorp, J.M. Cosset, L. Court, R. Ducouso, A. Facon, J.B. Fleutot, C. Généau, J.M. Giraud, P. Goldstein, P. Gourmelon, N. Helfer, G. Herbelet, H. Kolodié, L. Lachenaud, J. Lallemand, D. Maison, J.C. Martin, R. Masse, P. Massiot, I. Mehl-Auget, F. Ménétrier, P. Menthonnex, s. Origny, J. Pasnon, D. Peton Klein, B. Quesne, G. Romet, C. Rougy, J.M. Saponi, D. Schoulz, J.N. Talbot, C. Telion, M. Van Rechem, D. Vilain, C. Vrousos, *Guide National "Intervention médicale en cas d'événement nucléaire ou radiologique"*, Version 3.6, Autorité de sûreté nucléaire, 2008.
- [17] G. Anderegg, F. Arnaud-Neu, R. Delgado, J. Felcman, K. Popov, *Pure And Applied Chemistry*, vol. 77, 2005, pp. 1445-1495.
- [18] R.M. Smith, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, *Version 8.0 for windows*, 2004.
- [19] R.G. Pearson, *Journal Of The American Chemical Society*, vol. 85, 1963, pp. 3533-&.
- [20] N.D. Chasteen, L.K. White, R.F. Campbell, *Biochemistry*, vol. 16, 1977, pp. 363-368.
- [21] H.Z. Sun, H.Y. Li, P.J. Sadler, *Chemical Reviews*, vol. 99, 1999, pp. 2817-2842.
- [22] S.J.A. Fatemi, F.H.A. Kadir, G.R. Moore, *Biochemical Journal*, vol. 280, 1991, pp. 527-532.
- [23] D.L. Parkhurst, C.A.J. Appelo, *USGS report n° 99-4259*, 1999.
- [24] M. Rand, J. Fuger, I. Grenthe, V. Neck, D. Rai, *Chemical Thermodynamics of Thorium*, vol. 11, OECD Nuclear Energy Agency, 2008.

- [25] A.R. Felmy, H. Cho, D.A. Dixon, Y.X. Xia, N.J. Hess, Z.M. Wang, *Radiochimica Acta*, vol. 94, 2006, pp. 205-212.
- [26] L. Bonin, D. Guillaumont, A. Jeanson, C. Den Auwer, M. Grigoriev, J.C. Berthet, C. Hennig, A. Scheinost, P. Moisy, *Inorganic Chemistry*, vol. 48, 2009, pp. 3943-3953.
- [27] C.W. Davies, in: Butterworths (Ed.), Washington D.C., 1962.
- [28] G. Montavon, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, U. Repinc, A. Morgenstern, *Journal Of Inorganic Biochemistry*, vol. 103, 2009, pp. 1609-1616.
- [29] E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, V. Moulin, *Biochimie*, vol. 88, 2006, pp. 1605-1618.
- [30] C. Ekberg, A. Knutsson, Y. Albinsson, P.L. Brown, *Radiochimica Acta*, vol. 99, pp. 31-35.
- [31] R. Pakdaman, F.B. Abdallah, J.M.E. Chahine, *Journal Of Molecular Biology*, vol. 293, 1999, pp. 1273-1284.
- [32] R.D. Shannon, *Acta Crystallographica Section A*, vol. 32, 1976, pp. 751-767.
- [33] R. Lobinski, C. Moulin, R. Ortega, *Biochimie*, vol. 88, 2006, pp. 1591-1604.
- [34] H.A. Krebs, *Annual Review Of Biochemistry*, vol. 19, 1950, pp. 409-430.
- [35] H.Y. Li, P.J. Sadler, H.Z. Sun, *European Journal Of Biochemistry*, vol. 242, 1996, pp. 387-393.
- [36] M.H. Henge-Napoli, G.N. Stradling, D.M. Taylor, *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 87, 2000, pp. 9-9.

Conclusion générale

Avec 8 000 nouveaux cas par an en France, l'incidence des lymphomes non hodgkiniens (cancers diffus non opérables touchant les lymphocytes B et T) a doublé en dix ans. Elle est passée de 5,8 cas / 100 000 hab. en 1980, à 12,1 cas / 100 000 hab. en 1990. Le traitement de ces cancers a connu un changement considérable depuis plusieurs années avec le développement de la radiothérapie ciblée. Au cours de la dernière décennie, on a vu augmenter progressivement l'intérêt pour les radioisotopes hautement radiotoxiques émetteurs de particules α . Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux radioisotopes émetteurs de particules α potentiellement intéressants pour la radiothérapie α ciblée : le ^{212}Bi et le ^{226}Th . Du fait des propriétés qu'ils présentent, tous deux peuvent être utilisés sous forme de générateurs *in vivo*. Les générateurs $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ ont donc été étudiés au cours de ce travail. Le choix du mode de vectorisation, le plus adapté à ces générateurs, a été discuté tout au long de ce mémoire, en testant deux approches, l'une par chélation et l'autre par encapsulation.

La première partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude du générateur $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$. Deux approches de vectorisation ont été étudiées. La première consiste en une approche par chélation. Le CHX-A-DTPA a été choisi comme agent complexant. Celui-ci a été couplé sur une protéine, l'IgG, permettant de simuler la présence d'un vecteur. Les constantes de complexation décrivant l'interaction du Bi avec le DTPA, le CHX-A-DTPA, et le CHX-A-DTPA couplé à la protéine ont été déterminées. Des valeurs similaires ($\log K \sim 35,2$; $I = 0$) ont été obtenues pour ces trois constantes. Ces résultats montrent d'une part, comme il était supposé dans la littérature, que le DTPA et le CHX-A-DTPA possèdent bien des constantes de stabilité similaires pour la complexation du Bi. D'autre part, ils mettent en évidence que le couplage du CHX-A-DTPA sur l'IgG n'affecte pas ses propriétés de complexation, puisque la

constante de complexation reste inchangée. Ceci a été démontré, au niveau moléculaire, par des expériences en SLRT avec l'utilisation du curium

Des études réalisées *in vitro*, dans le but de tester l'efficacité du DTPA à complexer le Bi en milieu sérique, ont montré que malgré sa forte constante de complexation, le Bi restait complexé aux protéines. Cette inefficacité n'était pas liée à une compétition entre la transferrine et le DTPA, mais à une compétition entre le Bi et les cations majeurs présents dans le sérum. Le DTPA n'est pas suffisamment sélectif pour recomplexer le Bi après libération dans l'organisme, il ne peut être utilisé pour le générateur *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$.

Afin de poursuivre ce travail, d'autres ligands pourront être testés. La double approche mise en place au cours de cette thèse peut être utilisée pour estimer l'efficacité d'autres agents chélatants pour la complexation du Bi(III) dans des conditions sériques. On pourra ainsi faire des prédictions pour trouver le meilleur candidat. A l'aide des modèles établis, on peut également définir certains critères que devra respecter le ligand :

- D'une part, afin que la complexation entre le Bi(III) et le ligand soit prédominante (> 90%) par rapport à celle du Bi(III) avec les protéines dans des conditions pour la radiothérapie ciblée, on devra tenir compte du rapport suivant :

$$\log K(\text{Bi} - \text{ligand}) \geq 28.7$$

- D'autre part, afin que la compétition entre le Bi(III) et le Fe(II) deviennent négligeable (complexation Bi(III)/ligand > 90%), le rapport suivant devra être respecté :

$$\frac{\log K(\text{Bi} - \text{ligand})}{\log K(\text{Fe} - \text{ligand})} \geq 3$$

La deuxième approche développée consiste en l'encapsulation du ^{212}Pb dans des liposomes. La composition de ceux-ci a été définie de façon à pouvoir les vectoriser *in vivo*. Ce travail a permis de mettre au point une méthode de marquage en deux étapes. La première consiste à marquer la surface des liposomes avec de l'indium, afin de permettre leur vectorisation, tandis que la deuxième consiste en l'encapsulation active du ^{212}Pb dans le compartiment interne des liposomes. Durant cette étude, le ^{212}Pb a uniquement été utilisé en tant que traceur radioactif. Les résultats obtenus ont montré que les paramètres clés influençant le taux d'encapsulation sont la température et la concentration en DTPA. Bien que le mécanisme d'encapsulation du ^{212}Pb ne soit pas clairement défini, il semblerait qu'il se

fasse par diffusion du Pb à travers la bicouche, du fait d'une certaine perméabilité de la membrane. Les conditions optimisées, pour des conditions applicables en radiothérapie, permettent l'encapsulation de 2/3 cations Pb^{2+} par liposome, avec un rendement de l'ordre de 75%.

Afin de vérifier la stabilité de l'encapsulation du ^{212}Pb et du ^{212}Bi , des études de rétention ont été effectuées. Les résultats obtenus par dialyse ont montré une bonne rétention du ^{212}Pb dans le compartiment interne des liposomes : une rétention supérieure à 90% est observée après 24 h d'incubation dans le sérum humain. Le suivi de ces expériences par un spectromètre γ haute résolution, a permis de vérifier que les radioisotopes fils du ^{212}Pb sont également retenus par la membrane lipidique des liposomes. L'utilisation d'un Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, couplé au détecteur de rayonnements γ , s'est avérée être un nouvel outil analytique intéressant pour l'étude des liposomes radiomarqués. Le développement de ce système pourra également trouver de nombreuses applications dans le domaine nucléaire.

La suite envisageable de ce travail serait la réalisation :

- (1) d'études de stabilité, dans un premier temps, *in vitro*, avec une activité en ^{212}Pb de l'ordre de 100 MBq, dans le but de confirmer les études réalisées au cours de ce travail ;
- (2) d'études de radiolyse, afin d'estimer l'effet de rayonnements α sur la stabilité des liposomes ;
- (3) d'études *in vivo* sur petits animaux afin d'estimer l'efficacité thérapeutique du générateur $^{212}Pb / ^{212}Bi$ pour le traitement de lymphomes non hodgkiniens.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude du générateur $^{230}U / ^{226}Th$. L'utilisation de liposomes n'étant pas envisageable pour ce générateur, une approche par chélation a été choisie. Une première étude a consisté à étudier la spéciation du Th(IV) en milieu sérique. Il a été montré, expérimentalement et par modélisation qu'en milieu sérique, plus de 99% du Th(IV) est complexé à la transferrine. En adéquation avec les résultats de Peter et Lehmann [41], la transferrine est apparue comme étant la protéine du sérum humain gouvernant la spéciation du Th(IV). La deuxième étape de cette étude a consisté à estimer l'efficacité du DTPA comme agent chélatant pour le ^{226}Th . Les études réalisées ont montré

que, bien que le DTPA soit un bon agent décorporant pour le Th(IV), les concentrations injectées dans le cadre d'une radiothérapie ne sont pas suffisamment importantes pour permettre une complexation efficace du Th(IV). Il s'est avéré que cette inefficacité n'était pas liée à une compétition entre le DTPA et la transferrine, mais à une forte compétition pour le DTPA entre le Th(IV) et les cations majeurs divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) présents dans le sérum. Le DTPA n'étant pas suffisamment sélectif, il ne peut être utilisé pour le générateur *in vivo* $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$.

Plusieurs perspectives sont envisageables pour poursuivre ce travail. De même que pour le Bi, la méthodologie établie dans le cadre de cette thèse, décrivant la spéciation du Th(IV) dans le sérum, pourra être utilisée pour estimer l'efficacité d'autres agents chélatants pour la complexation du Th(IV) dans des conditions sériques. Cette étape permettra de faire une première sélection de ligands. Pour réaliser cette sélection, on devra dans un premier temps considérer les paramètres ci-dessous. Ces paramètres ont été établis par simulation.

- D'une part, afin que la complexation entre le Th(IV) et le ligand soit prédominante (> 90%) par rapport à la complexation du Th(IV) avec la transferrine dans des conditions pour la radiothérapie α ciblée, la constante de complexation devra être :

$$\log K(\text{Th} - \text{ligand}) \geq 28,6$$

- D'autre part, afin que la compétition entre le Th(IV) et le Fe(II) deviennent négligeable (complexation Th(IV)/ligand > 90%), le rapport suivant devra être respecté :

$$\frac{\log K(\text{Th} - \text{ligand})}{\log K(\text{Fe} - \text{ligand})} \geq 2,2$$

De façon générale, l'approche développée au cours de ce travail pourra être mise à profit pour l'étude des autres générateurs *in vivo*, potentiellement intéressants pour la radiothérapie interne (Tableau 2, p.29). L'approche par encapsulation dans des vésicules artificielles, type liposomes, semble particulièrement prometteuse pour la vectorisation des générateurs *in vivo*. Il semblerait toutefois qu'elle ne soit pas applicable aux générateurs pour lesquels la décroissance du radioisotope père se fasse par l'émission d'une particule α , du fait de la forte énergie de recul imputée au radioisotope fils.

Références bibliographiques

- [1] Zimmermann, R. 2006. La médecine nucléaire : la radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie.
- [2] Brechbiel, M. 2007. targeted alpha-therapy: past, present, future? *Dalton Trans.* 21: 4918-4928.
- [3] Imam, S. K. 2001. Advancements in cancer therapy with alpha-emitter: a review. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 51: 271-278.
- [4] Ehrlich, P., C. A. Herta, and K. Shigas. 1904. Uber einige verwendungen der naphthochinosuflsaure. *Z. Physiol Chem* 61: 379.
- [5] Bloomer, W. D., R. Lipsztein, and J. F. Dalton. 1985. Antibody-mediated radiotherapy. *Cancer* 55: 2229-2233.
- [6] Goldenberg, D. 2002. Targeted Therapy of Cancer with Radiolabeled Antibodies. *J. Nucl. Med* 43: 693-713.
- [7] Supiot, S., F. Thillays, E. Rio, M. A. Mahé, and F. J. Barbet. 2007. Le point sur les avancées récentes de la radio-immunothérapie alpha. *Cancer radiothérapie* 11: 252-259.
- [8] Couturier, O., S. Supiot, M. Degraef-Mougin, A. Faivre-Chauvet, T. Carlier, J. F. Chatal, F. Davodeau, and M. Cherel. 2005. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32: 601-614.

- [9] Hassfjell, S. P., M. Brechbiel. 2001. The Development of the α -Particle Emitting Radionuclides ^{212}Bi and ^{213}Bi , and Their Decay Chain Related Radionuclides, for Therapeutic Applications. *Chem. Rev.* 101: 2019.
- [10] Fitzsimmons, F., R. Atcher. 2007. Synthesis and evaluation of a water-soluble polymer to reduce Ac-225 daughter migration. *J Label Compds Radiopharm* 50: 147-153.
- [11] Mausner, L. F., R. F. Straub, and S. C. Srivastava. 1989. The in-vivo generator for radioimmunotherapy. *J Labelled Compds Radiopharm* 26: 117.
- [12] Allen, T. M., E. H. Moase. 1996. Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 21: 117-133.
- [13] [Larsen, R., G. Henriksen.] 2001. Radioactive therapeutic liposomes.
- [14] Shechter, E. 1993. Biochimie et biophysique des membranes.
- [15] Israelachvili, J. N. 1992. Intermolecular and surface forces.
- [16] Lipowsky, R., E. Sackmann. 1995. Structure and dynamics of membranes.
- [17] Bangham, A. D., M. M. Standish, and J. C. Watkins. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.
- [18] Lorin, A., C. Flore, A. Thomas, and R. Brasseur. 2004. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* - 8: 163.
- [19] Rappolt, M., G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, and H. Amenitsch. 2000. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *Eur. Biophys.* 29: 125-133.
- [20] Cevc, G. 1991. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry* 30: 7186-7193.
- [21] Cevc, C. 1999. Lipid vesicles and membrane fusion. *Adv. Drug Del. Rev.* 38: 207-232.

- [22] Gaber, M. H., N. Z. Wu, K. Hong, S. K. Huang, M. W. Dewhirst, and D. Papahadjopoulos. 1996. Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int. J. Radiation Onc. Biol. Phys.* 36: 1177-1187.
- [23] Houslay, M. D. 1982. Dynamics of biological membranes.
- [24] Lee, C. H., P. Petrov, and H. G. Dobereiner. 1999. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir* 15: 8543-8546.
- [25] Finkelstein, A. 1987. Water movement through Lipid Bilayer, Pores and Plasma Membranes, Theory and reality.
- [26] Stein, W. D. 1990. Channels, Carriers and Pumps. An introduction to membrane Transport.
- [27] Stein, W. D. 1989. Transport and diffusion across cell membranes.
- [28] Ansoborlo, E., O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, and V. Moulin. 2006. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* 88: 1605-1618.
- [29] Krebs, H. A. 1950. Chemical composition of blood serum and plasma. *Annual Review of Biochemistry* 19: 409-430.
- [30] Sun, H., H. Li, and Sadler P.J. 1999. Transferrin as a metal ion mediator. *Chem. Rev.* 99: 2817-2842.
- [31] Parkhurst, D. L., C. A. J. Appelo. 1999. User's guide to PHREEQC - a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations.
- [32] Sofou, S., B. J. Kappel, J. S. Jaggi, M. R. McDevitt, D. A. Scheinberg, and G. Sgourous. 2007. Enhanced Retention of the α -Particle-Emitting Daughters of Actinium-225 by Liposome Carriers. *Bioconjugate Chemistry* 18: 2061.

- [33] Kirkland, J. J., W. W. Yau. 1983. Simultaneous determination of particle size and density by sedimentation field flow fractionation. *Anal. Chem.* 55: 2165-2170.
- [34] Giddings, J. C., J. Ho. 1995. Accurate Measurement of Density of Colloidal Latex Particles by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Langmuir* 11: 2399-2404.
- [35] Liu, M. K., P. Li, and J. C. Giddings. 1992. Separation of particles in aqueous suspensions by thermal field flow fractionation. Measurement of thermal diffusion coefficient. *Chromatographia* 34: 483-492.
- [36] Caldwell, K. D., Y. S. Gao. 1993. Electrical field flow fractionation in particle separation. 1. Monodisperse standards. *Anal. Chem.* 65: 1764-1772.
- [37] Litzén, A., K. G. Wahlund. 1991. Effects of temperature, carrier composition and sample load in asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A* 548: 393-406.
- [38] Liu, M. K., P. Li, and J. C. Giddings. 1993. Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field flow fractionation. *Protein science* 2: 1520-1531.
- [39] Fraunhofer, W., G. Winter. 2004. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 369-383.
- [40] Fraunhofer, W., G. Winter, and C. Coester. 2004. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering for Analysis of Gelatin Nanoparticle Drug Carrier Systems. *Anal. Chem.* 76: 1909-1920.
- [41] Atcher, R. W., A. M. Friedman, and J. J. Hines. 1988. An improved generator for the production of ^{212}Pb and ^{212}Bi from ^{224}Ra . *Int. J. Radiat. Appl. Instrum* 39: 283-286.
- [42] Guseva, L. I. 2007. A ^{228}Ra - ^{212}Pb tandem generator for potential application in biomedical studies. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 272: 153.

- [43] Narbutt, J., A. Bilewicz. 1998. Gamma emitting radiotracers ^{224}Ra , ^{212}Pb and ^{212}Bi from natural thorium. *Appl. Radiat. Isot.* 49: 89-91.
- [44] Biesuz, R., G. Alberti, and M. Pesavento. 2008. Sorption of Lead(II) on Two Chelating Resins: From the Exchange Coefficient to the Intrinsic Complexation. *J. Sol. Chem.* 37: 527.
- [45] Hancock, D., I. Cukrowski, J. Baloyi, and J. Mashishi. 1993. The affinity of bismuth(III) for nitrogen-donor ligands. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2895-2898.
- [46] Hassfjell, S. P., Ø. S. Bruland, and P. Hoff. 1997. ^{212}Bi -DOTMP: An alpha particle emitting bone-seeking agent for targeted radiotherapy. *Nucl. Med. Biol.* 24: 231-237.
- [47] Norenberg, J., B. Krenning, I. Konings, J. Kusewitt, T. Nayak, T. Anderson, M. Jong, K. Garmestani, M. Brechbiel, and L. Kvols. 2006. ^{213}Bi -[DOTA⁰, Tyr³]Octreotide Peptide Receptor Radionuclide Therapy of Pancreatic Tumors in a Preclinical Animal Model. *Clin. cancer. Res.* 1: 897-903.
- [48] Mirzadeh, S., K. Kumar, and O. Gansow. 1993. The chemical fate of ^{212}Bi -DOTA Formed by beta decay of ^{212}Pb -DOTA. *Radiochim. Acta* 60: 1.
- [49] [Basolo, F., R. G. Pearson.] 1967. Mechanisms of Inorganic Reactions. 2nd edition: .
- [50] Su, F. M., P. Beaumier, D. Axworthy, R. Atcher, and A. Fritzberg. 2005. Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ generator. *Nucl. Med. Biol.* 32: 741-747.
- [51] Pippin, C. G., T. J. McMurry, M. W. Brechbiel, M. McDonald, R. Lambrecht, D. Milenic, M. Roselli, D. Colcher, and O. A. Gansow. 1995. Lead(II) complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetate: solution chemistry and application to tumor localization with ^{203}Pb labeled monoclonal antibodies. *Inorg. Chim. Acta* 239: 43-51.
- [52] Jones, S. B., L. J. Tiffany, K. Garmestani, O. A. Gansow, and R. W. Kozak. 1996. Evaluation of dithiol chelating agents as potential adjuvants for anti-IL-2 receptor lead or bismuth alpha radioimmunotherapy. *Nucl. Med. Biol.* 23: 105-113.

- [53] Ma, D., M. R. McDevitt, R. D. Finn, and D. A. Scheinberg. 2001. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl. Radiat. Isot.* 55: 463-470.
- [54] McDevitt, M. R., R. D. Finn, G. Sgouros, D. Ma, and D. A. Scheinberg. 1999. An $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl. Radiat. Isot.* 50: 895-904.
- [55] Brechbiel, M., O. Gansow, C. G. Pippin, R. D. Rogers, and R. P. Planalp. 1996. Préparation of the Novel chelating agent N-(2-Aminoethyl)-trans-1,2-diaminocyclohexane-N, N', N''-pentaacetic acid, a preorganized analogue of Diethylenetriaminepentaacetic acid, and the structures of Bi(CyDTPA) and Bi(H₂DTPA) complexes. *Inorg. Chem.* 35: 6343-6348.
- [56] Li, H., P. Sadler, and H. Sun. 1996. Unexpectedly Strong Binding of a Large Metal Ion (Bi) to Human Serum Transferrin. *J. Biol. Chem.* 271: 9483-9489.
- [57] Sun, H., K. Y. Szeto. 2003. Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. *J. Inorg. Biochem.* 94: 114-120.
- [58] Ruegg, C., W. Anderson-Berg, M. Berchbiel, S. Mirzadeh, O. Gansow, and M. Strand. 1990. Improved in vivo stability and tumor targeting of Bismuth-labeled antibody. *Can. Res* 50: 4221-4226.
- [59] Geipel, G., M. Acker, D. Vulpius, G. Bernhard, H. Nitsche, and T. Fanghänel. 2004. An ultrafast time-resolved fluorescence spectroscopy system for metal ion complexation studies with organic ligands. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 60: 417-424.
- [60] [Mougin-Degraef, M.] 2005. Etude de faisabilité du radiomarquage et du préciblage de liposomes pour la radioimmunothérapie. *thèse de doctorat* .
- [61] Reschiglian, P., A. Zattoni, B. Roda, E. Michelini, and A. Roda. 2005. Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends Biotechnol.* 23: 475-483.

- [62] Hupfeld, S., H. H. Moen, D. Ausbacher, H. Heinrich, and M. Brandl. 2010. Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid. *Chem. Phys. Lipids* 163: 141-147.
- [63] Hupfeld, S., D. Ausbacher, and M. Brandl. 2009. Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables. *J. Sep. Sci.* 32: 1465.
- [64] Moon, M. H., J. C. Giddings. 1993. Size distribution of liposomes by flow field-flow fractionation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11: 911-920.
- [65] [Morgenstern, A., C. Apostolidis, R. Molinet, and K. Lutzenkirchen.] 2006. Radionuclides for medical use. WO 2006/003123 A2: .
- [66] Morgenstern, A., O. Lebeda, J. Stursa, F. Bruchertseifer, R. Capote, J. McGinley, G. Rasmussen, M. Sin, B. Zielinska, and C. Apostolidis. 2008. Production of $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ for targeted alpha therapy via proton irradiation of ^{231}Pa . *Anal. Chem.* 80: 8763-8770.
- [67] Morgenstern, A., C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, R. Capote, T. Gouder, F. Simonelli, M. Sin, and K. Abbas. 2008. Cross-sections of the reaction $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa}$ for production of ^{230}U for targeted alpha therapy. *Appl. Radiat. Isot.* 66: 1275-1280.
- [68] Koua Aka, A., V. Barci, G. Ardisson, R. Righetti, J. F. Le Du, and D. Trubert. 1995. Reinvestigation of decay properties of nuclei belonging to the U-230 series using continuous radiochemical separations. *Radiochim. Acta* 68: 160.

Etude des générateurs *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$ pour la radiothérapie α ciblée

La radiothérapie α ciblée est une thérapie anticancéreuse particulièrement innovante. Elle repose sur l'utilisation d'un vecteur spécifique de la cellule cible à détruire, radiomarké par un élément radioactif émetteur de particules α . Le ^{212}Bi et le ^{226}Th sont deux candidats particulièrement intéressants. Tous deux ont été étudiés, au cours de ce travail, sous la forme des générateurs *in vivo* $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ et $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$. Deux méthodes ont été étudiées pour envisager leur vectorisation. Une approche par chélation a été envisagée pour les deux générateurs. Elle consiste à fixer sur le vecteur un deuxième ligand qui, dans des conditions biologiques, doit être en mesure de recomplexer le radioisotope fils, suite à la décroissance radioactive. Le DTPA, présentant de fortes constantes de complexation pour le Bi(III) et le Th(IV) a été testé pour les deux générateurs. Evalué expérimentalement et validé par modélisation, le DTPA s'est avéré inefficace pour la complexation du Bi(III) et du Th(IV) dans le sérum humain, le facteur limitant étant un problème de sélectivité du DTPA entre le radioisotope et le Fe(II) présent dans le sérum. Une approche par encapsulation dans des liposomes a donc été envisagée. Cette méthode est uniquement envisageable pour le générateur $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$. L'encapsulation de 2-3 Pb par liposome a été réalisée avec un rendement de 75%. Des études de stabilité *in vitro*, réalisées à l'aide du couplage AF4/ γ , ont montré une bonne rétention des radioisotopes père et fils dans le compartiment interne des liposomes.

Mots clés : Radiothérapie α ciblée ; Générateurs *in vivo* ; $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$; $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$

Study of *in vivo* generators $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ and $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$ for targeted α radiotherapy

Targeted α therapy is a promising cancer therapy. The principle is to use tumor-specific vectors labeled with α particles emitters. ^{212}Bi and ^{226}Th are two promising candidates. In the present work, they were studied as *in vivo* generators $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ and $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$. Two methods were studied for allowing their vectorization. Chelation approach was first considered for both generators. It consists to fix on the vector a second ligand, which in biological conditions, must be able to complex the daughter radionuclide. DTPA, with strong complexation constants for Bi(III) and Th(IV), was tested for both generators. DTPA appears to be inefficient for complexing Bi(III) and Th(IV) in human serum, the limiting factor being a problem of selectivity of DTPA between the radioisotope and the Fe(II) present in serum. This was shown both experimentally and theoretically. An encapsulation approach has been also considered. This method is only possible for the $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$ generator. The efficient entrapment of about 2-3 Pb atoms per liposome was performed with a yield of 75%. *In vitro* stability studies, performed with the coupling AF4/ γ , showed good retention of the mother and daughters radionuclides in the internal compartment of liposomes.

Key words: targeted α therapy; *in vivo* generators; $^{212}\text{Pb} / ^{212}\text{Bi}$; $^{230}\text{U} / ^{226}\text{Th}$