



HAL
open science

Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides

Florian Lahrouch

► **To cite this version:**

Florian Lahrouch. Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4133 . tel-01731301

HAL Id: tel-01731301

<https://theses.hal.science/tel-01731301v1>

Submitted on 14 Mar 2018

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.

École doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées
Unité de recherche : Institut de Chimie de Nice

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du
grade de docteur en Chimie
de
L'UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

Par

Florian LAHROUCH

Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides

Dirigée par *Christophe DI GIORGIO, Docteur HDR*, Institut de Chimie de Nice
et co-dirigée par *Christophe DEN AUWER, Professeur*, Institut de Chimie de
Nice

Soutenue le 14 décembre 2017
Devant le jury composé de :

Dr. Jean AUPIAIS
Dr. Georges CARLE
Dr. Pascale DELANGLE
Dr. Denis JOSSE (Col)
Pr. Sophie MONGE
Dr. Christophe DI GIORGIO
Pr. Christophe DEN AUWER

CEA DAM, DIF
UMR E TIRO MATOS
CEA DRF, INAC
SDIS Alpes-Maritimes
Université de Montpellier
Université Côte D'Azur
Université Côte D'Azur

Rapporteur
Examineur
Rapporteur
Invité
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Institut de Chimie de Nice dans l'équipe de Radiochimie Humaine et Environnementale, Université Côte d'Azur.

Ce travail a été financé par la Région Provence Alpes Côte d'Azur ainsi que le programme de Toxicologie Nucléaire du CEA.

Je tiens à remercier en premier lieu mes deux directeurs de thèse Christophe Di Giorgio et Christophe Den Auwer pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ces trois ans, pour leurs conseils éclairés que ce soit à la paillasse ou après trois jours de manip synchrotrons. Merci pour votre patience et votre disponibilité.

Je souhaite remercier Pascale Delangle et Jean Aupiais qui ont accepté d'être rapporteurs de mon travail ainsi que Sophie Monge, Georges Carle et Denis Josse pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également Thierry Pourchet qui, avec Denis Josse et Jean Aupiais, a accepté de participer à mes comités de thèse.

Un grand merci à Christoph Henning et à Andre Rossberg ainsi qu'aux membres de la ligne ROBL.

Je tiens à remercier Magalie Duvail et Damien Bourgeois de L'ICSM qui ont collaboré à ce projet.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe RHE, Hervé Michel, Maria Rosa Beccia et Gaëlle Creff. Mention spéciale pour Gaëlle, merci pour ton soutien et tes conseils qui m'ont souvent permis d'éviter les pièges de l'IR.

Je remercie aussi tous mes co-bureaux Mélodie, Laurane, Benjamin et Hanh, ainsi que Coralie. Grâce à vous, ces trois années sont remplies de bons souvenirs. Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Anne-Christine Chamayou qui était post-doc lors de ma première année.

Je voudrais aussi remercier l'équipe MB et plus particulièrement Rashid Behida, Benoit Michel, Alain Burger, Nadia Pattino et Anthony Martin ainsi qu'Antoine.

Un grand merci à Marion Alberola, Sophie Pagnotta et Najiba Mahmoud.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Nicolas, Olexandr, Bernardo et Anna stagiaires de M1 et M2 qui ont participé ou collaboré à ce projet.

Enfin je remercie ma famille et mes amis de m'avoir soutenu pendant ces trois années. En premier lieu j'adresse ma sincère gratitude à ma mère qui m'a encouragé et conseillé tout au long de mes études. Je remercie aussi mon père, Philippe ainsi que mes grands-parents.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX	7
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : TOXICITE DES ACTINIDES ET AGENTS DECORPORANTS. ETAT DE L'ART FOCALISE SUR L'U(VI), LE PU(IV) ET LE TH(IV).....	13
A ACTINIDES : METAUX STRATEGIQUES ET RADIOACTIFS	14
I <i>Généralité</i>	14
II <i>L'Uranium</i>	16
III <i>Le Plutonium</i>	19
IV <i>Le Thorium</i>	21
B TOXICOLOGIE	23
I <i>Contamination par des actinides : effets biologiques</i>	23
II <i>Contamination à l'Uranium</i>	26
III <i>Contamination au Plutonium et dans une moindre mesure au Thorium.</i>	38
IV <i>Conclusion</i>	44
C DECORPORATION DES ACTINIDES : AGENTS CHELATANTS	45
I <i>La décorporation des actinides : généralités</i>	45
II <i>Le DTPA : Molécule de référence pour la décorporation</i>	47
III <i>Les dérivés de sidérophore : HOPO et CAM</i>	50
IV <i>Les décorporants de l'uranium (VI)</i>	52
V <i>Conclusion</i>	53
D REFERENCES	54
CHAPITRE II : PROJET, STRATEGIE DE DECORPORATION MACROMOLECULAIRE DES ACTINIDES	61
A AGENTS CHELATANTS MACROMOLECULAIRES : UNE STRATEGIE DE DECORPORATION DES ACTINIDES ORIGINALES	62
B POLYETHYLENEIMINES FONCTIONNALISEES PAR DES FONCTIONS COMPLEXANTES	65
C REFERENCES	68
CHAPITRE III: POLYETHYLENEIMINE METHYLENE CARBOXYLATE (PEI-MC).....	69
A SYNTHESE ET CARACTERISATION DU PEI-MC	71
I <i>Synthèse</i>	71
II <i>Détermination du taux de fonctionnalisation</i>	72
III <i>Détermination du rendement d'hydrolyse des groupements esters</i>	73
B CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU COMPLEXE PEI-MC-UO ₂	75
I <i>Courbe de charge du PEI-MC avec l'uranyle</i>	75
II <i>Spectroscopie infrarouge du complexe PEI-MC-U</i>	79
III <i>Spéciation du complexe PEI-MC-U</i>	81
RESUME	90
C CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES PEI-MC-PU ET PEI-MC-TH	91
I <i>EXAFS du complexe PEI-MC-Pu</i>	92
II <i>Le Thorium (IV) comme analogue du plutonium (IV)</i>	95
III <i>Courbe de charge du complexe PEI-MC-Th</i>	96
IV <i>EXAFS du complexe PEI-MC-Th</i>	103
RESUME	107

D	DISCUSSION	108
E	REFERENCES	111
CHAPITRE IV: POLYETHYLENEIMINE METHYLENE PHOSPHONATE (PEI-MP).....		113
A	SYNTHESE ET CARACTERISATION DU PEI-MP	116
I	<i>Synthèse</i>	116
II	<i>Détermination de la fonctionnalisation du PEI-MP</i>	116
B	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU COMPLEXE PEI-MP-UO ₂	118
I	<i>Courbe de charge du complexe PEI-MP-U</i>	118
II	<i>Spectroscopie infrarouge du complexe PEI-MP-U</i>	122
III	<i>EXAFS du complexe PEI-MP-U</i>	123
RESUME	126
C	EFFET DU PEI-MP SUR UNE MATRICE MINERALE BIOMIMETIQUE DE L'OS EN CAS DE CONTAMINATION PAR L'URANYLE	127
I	<i>Sorption du PEI-MP sur les substrats HAp_{plq}</i>	129
II	<i>Taux d'uranyle dans les systèmes binaires, HAp_{plq}-U et ternaires, HAp_{plq}-PEI-MP-U</i>	131
III	<i>Spéciation de l'uranyle : EXAFS du système binaire HAp_{plq}-U</i>	133
IV	<i>Spéciation de l'uranyle : EXAFS du système ternaire HAp_{plq}-PEI-MP-U</i>	136
RESUME	139
D	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU COMPLEXE PEI-MP-TH	140
I	<i>Courbe de charge du complexe PEI-MP-Th</i>	140
II	<i>EXAFS du complexe PEI-MP-Th</i>	145
RESUME	148
E	DISCUSSION	149
F	REFERENCES	154
CONCLUSION & PERSPECTIVES		157
A	CONCLUSION GENERALE	158
B	PERSPECTIVES	160
I	<i>Autres études liées à ces PEI-MP et PEI-MC</i>	160
II	<i>Développement d'autres agents macromoléculaires</i>	163
C	REFERENCES	165
ANNEXES		167

Liste des abréviations

AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique

ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infra-Red

BASSIST : Base applied to speciation in solution and at Interfaces and solubility thermodynamic database

CAM : Catécholamide

CEA Commissariat à l'Energie Atomique

DM : Dynamique moléculaire

DTPA : Diethylenetriamine pentacetic acid

ESRF : European Synchrotron Radiation Facility

EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure

HOPO : Hydroxypyridinone

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry

Iv : Intraveineuse

MET : Microscope Electronique à Transmission

NTA : Nitriloacetic acid

PEI : Polyéthylèneimine

TBS : Tris buffer saline

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

tBu : Tert-butyl

USFDA : U.S. Food and Drug Administration

SAX : Spectroscopie d'Absorption X

XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure

Liste des Figures

<u>FIGURE 1</u> : PRODUCTION MONDIALE D'URANIUM DE 2004 A 2016.	17
<u>FIGURE 2</u> : POTENTIELS STANDARDS DES COUPLES REDOX DE L'URANIUM EN SOLUTION ; DIAGRAMME DES ORBITALES MOLECULAIRES DE L'URANYLE.....	18
<u>FIGURE 3</u> : DIAGRAMME DE POURBAIX DU PLUTONIUM EN PRESENCE DE COMPLEXANTS (HYDROXYDES, FLUORURE ET CARBONATE)..	20
<u>FIGURE 4</u> : DIMER DE PLUTONIUM (IV) POLYMERIQUE.....	20
<u>FIGURE 5</u> : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES QUANTITES RETENUS DANS LES DIFFERENTS ORGANES ET EXCRETE DE U(VI), Th(IV) ET DE Pu(IV) EXPRIME EN % DE LA QUANTITE INITIALE INJECTE CHEZ LE RATS.	24
<u>FIGURE 6</u> : MODELE SYSTEMIQUE DE LA BIO-DISTRIBUTION DU Pu(IV) CONSECUTIF A UNE INJECTION	25
<u>FIGURE 7</u> : MODELE SYSTEMIQUE DE LA BIO-DISTRIBUTION DE UO_2^{2+} CHEZ L'HUMAIN.....	27
<u>FIGURE 8</u> : SCHEMA DU NEPHRON, L'UNITE DE FILTRATION DU REIN.....	28
<u>FIGURE 9</u> : SCHEMA DES DEPLACEMENTS POTENTIELS DE L'U(VI) DANS LE NEPHRON.	30
<u>FIGURE 10</u> : DESSIN EN COUPE D'UN OS.....	32
<u>FIGURE 11</u> : SCHEMA DES ECHANGES DE MINERAUX ENTRE LA SURFACE ET LE VOLUME OSSEUX, AINSI QUE DE LA CO-PRECIPITATION DE SELS D'URANYLE DANS LES LACUNES OSSEUSES.....	34
<u>FIGURE 12</u> : IMAGE DE LA STRUCTURE CRISTALLINE DE LA META-AUTUNITE.	35
<u>FIGURE 13</u> : IMAGE DE LA STRUCTURE CRISTALLINE DE L'ANKOLEITE, UN ANALOGUE DE LA CHERNIKOVITE CONTENANT DU POTASSIUM A LA PLACE DES IONS HYDRONIUMS.	35
<u>FIGURE 14</u> : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE CRISTALLINE DE L'HYDROXYAPATITE AVEC LES DEUX SITES DU CALCIUM	36
<u>FIGURE 15</u> : MODELE SYSTEMIQUE DE LA BIO-DISTRIBUTION DU Pu^{4+} CONSECUTIF A UNE INJECTION.....	39
<u>FIGURE 16</u> : SCHEMA D'UN LOBULE HEPATIQUE.	41
<u>FIGURE 17</u> : SCHEMA DES COMPLEXES DE DIETHYLENTRIAMINEPENTAACETATE DE CALCIUM ET DE ZINC (CA-DTPA ET ZN-DTPA)...	48
<u>FIGURE 18</u> : DISTRIBUTION DANS LES TISSUS DE SOURIS DU PLUTONIUM (IV) (0,7kBq) ET DE L'AMERICIUM (III) (0,9kBq) 24H APRES INJECTION (IV) DE COMPLEXE AN-LIGAND.	51
<u>FIGURE 19</u> : DISTRIBUTION DANS LES TISSUS DE SOURIS DU NEPTUNIUM (V) (0,7kBq) ET DE L'URANIUM (VI) (0,5kBq) 24H APRES INJECTION (IV) DE COMPLEXE AN-LIGAND.	51
<u>FIGURE 20</u> : APPROCHE MACROMOLECULAIRE POUR LA DECORPORATION D'ACTINIDES.	63
<u>FIGURE 21</u> : JETPEI), RETICULE (BPEI) ET DENDRIMERIQUE	65
<u>FIGURE 22</u> : UNITES MONOMERQUES DU BPEI, DU PEI-MC ET DU PEI-MP EN COMPARAISON A LEUR DERIVE MOLECULAIRE DIETHYLENTRIAMINE, DTPA ET DTPMP.....	66
<u>FIGURE 23</u> : SCHEMA DE SYNTHESE DU PEI-MC.....	71
<u>FIGURE 24</u> : RMN 1H DU PEI- $CH_2COO-tBu$	73
<u>FIGURE 25</u> : SPECTRE INFRAROUGE DU PEI-MC A PH 7,0.	74
<u>FIGURE 26</u> : SIMULATION DE LA SPECIATION DES FRACTIONS SOLUBLES DE L'URANYLE ($U = 10^{-4} M$) EN FONCTION DU PH DANS UNE SOLUTION DE NaCl 150 MM	76
<u>FIGURE 27</u> : EQUATION CHIMIQUE DE LA DEPROTONATION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE DU PEI-MC.....	77
<u>FIGURE 28</u> : SPECTRES INFRAROUGE DU PEI-MC A PH 7,0 ET A PH 5,0.	77
<u>FIGURE 29</u> : COURBE DE CHARGE DU PEI-MC AVEC L' URANYLE.....	78
<u>FIGURE 30</u> : SPECTRES INFRAROUGE DU PEI-MC LIBRE, DU PEI-MC-U ET DE PEI-MC-U (MILIEU CHLORURE) A PH 7,0.	79
<u>FIGURE 31</u> : SPECTRE D'ABSORPTION X DE L'URANIUM (VI) AU SEUIL L_{III} (CORRESPONDANT A UNE TRANSITION ELECTRONIQUE DE LA COUCHE $2P_{3/2}$).....	81
<u>FIGURE 32</u> : SPECTRE EXAFS REPRESENTE EN $k^2(\chi(k))$ AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM (VI).	82
<u>FIGURE 33</u> : SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	83
<u>FIGURE 34</u> : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 0,4 ATOME DE CHLORE ET SANS ATOME DE CHLORE.	84
<u>FIGURE 35</u> :SCHEMA SIMPLIFIE D'UN ION URANYLE COORDINE DE FAÇON MONODENTE ET BIDENTE A DEUX FONCTIONS CARBOXYLATE AVEC LES CHEMINS DE DIFFUSION MULTIPLE UTILISES LORS DE L'AJUSTEMENT DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MP-U.	85
<u>FIGURE 36</u> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PREMIERE ET DE LA DEUXIEME SPHERE DE COORDINATION DE L'URANYLE DANS LE COMPLEXE PEI-MC-U.....	85
<u>FIGURE 37</u> : INSTANTANES ISSUES DE LA SIMULATION DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE A 9 NS MONTRANT LA PREMIERE SPHERE DE COORDINATION DE L'URANYLE : SONT REPRESENTES LES MONOMERES ENTIERS PEI-MC ET LE ZOOM SUR LA PREMIERE SPHERE DE COORDINATION.	86
<u>FIGURE 38</u> : FONCTIONS DE DISTRIBUTION RADIALE CALCULEES PAR DM POUR LES DISTANCES U-Oax (A), U-Oeq (B), U-C (C). LE NOMBRE DE COORDINATION REPRESENTE L'INTEGRALE DU PIC ET EST REPRESENTE PAR LA COURBE POINTILLEE.....	87

FIGURE 39 : SUPERPOSITION DES SPECTRES EXAFS EXPERIMENTAL ET CALCULE A PARTIR DE LA DM DU PEI-MC-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; TRANSFORMEES DE FOURIER CORRESPONDANT.	88
FIGURE 40 : SPECTRES UV-VIS DU COMPLEXE PEI-MC-PU ($Pu(IV) = 0,1mM$) EN MILIEU TBS PH 7,0 EN ROUGE ET DU COMPLEXE $PuCl_4$ ($Pu(IV) = 0,5mM$) EN MILIEU HCl PH 0,0.	92
FIGURE 41 : SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-TH AU SEUIL L_{III} DU THORIUM ; TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	93
FIGURE 42 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SPHERE DE COORDINATION DU $Pu(IV)$ DANS LE COMPLEXE PEI-MC-PU.	93
FIGURE 43 : SPECIATION (SIMULEE) DES FRACTIONS SOLUBLES DU THORIUM ($[Th(IV)] = 1mM$) EN FONCTION DU PH.....	96
FIGURE 44 : SPECIATION (SIMULEE) DES FRACTIONS SOLUBLES DU THORIUM ($[Th(IV)] = 1mM$) EN PRESENCE DE DEUX EQUIVALENTS DE NTA EN FONCTION DU PH.....	97
FIGURE 45 : COURBE DE CHARGE DU PEI-MC AVEC LE $Th(IV)$	98
FIGURE 46 : MONOMERES DE PEI-MC N3 ET N5 UTILISES POUR ETABLIR LES COURBES DOSE-REPONSE ET LE DTPA.	99
FIGURE 47 : EXEMPLE DE COURBE DOSE-REPONSE ET REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA CE_{50} ET DU FACTEUR DE HILL.	100
FIGURE 48 : COURBES DOSE-REPONSE REPRESENTANT LA FRACTION MOLAIRES DE $Th(IV)$ COMPLEXE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE PEI-MC _{N3} , DE DTPA ET DE PEI-MC _{N5}	101
FIGURE 49 : SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-TH AU SEUIL L_{III} DU THORIUM ; TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	104
FIGURE 50 : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-TH AU SEUIL L_{III} DU THORIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 2,5 ATOMES DE CHLORE ET SANS ATOME DE CHLORE.....	104
FIGURE 51 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MONOMERE DE PEI-MP	117
FIGURE 52 : SPECTRE INFRAROUGE DU PEI-MP A PH 7,0.	117
FIGURE 53 : SCHEMA DES DEPROTONATIONS SUCCESSIVES DE LA PREMIERE PUIS DE LA SECONDE ACIDITE DE LA FONCTION ACIDE PHOSPHONIQUE.....	119
FIGURE 54 : SPECTRES INFRAROUGE DU PEI-MP A PH 7,0 ET A PH 5,0 NORMALISES SUR LA BANDE D'ABSORPTION A 1652 cm^{-1}	119
FIGURE 55 : EQUATIONS CHIMIQUES DECRIVANT LA PREMIERE ET SECONDE ACIDITE DES FONCTIONS PHOSPHONATE AINSI QUE LEUR COMPLEXATION AU CATION URANYLE.	120
FIGURE 56 : COURBE DE CHARGE DU PEI-MP AVEC L'URANYLE A PH 5,0.....	120
FIGURE 57 : SPECTRES INFRAROUGE DU PEI-MP LIBRE , DU PEI-MP-U (MILIEU NITRATE) A PH 7,0.	122
FIGURE 58 : SPECTRE EXAFS DU COMPLEXE PEI-MP-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	123
FIGURE 59 : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MP-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 3,3 ATOMES DE PHOSPHORE ET SANS ATOME DE PHOSPHORE.	124
FIGURE 60 : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MP-U AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 0,5 ATOME DE CHLORE ET SANS ATOME DE CHLORE.	124
FIGURE 61 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PREMIERE ET DE LA DEUXIEME SPHERE DE COORDINATION DE L'URANYLE DANS LE COMPLEXE PEI-MP-U.....	126
FIGURE 62 : PHOTOGRAPHIE D'UNE PLAQUE BIOMIMETIQUE D'HYDROXYAPATITE (HAP_{PLQ}). SCHEMA DE LA COMPOSITION DES HAP_{PLQ}	127
FIGURE 63 : SCHEMA DE L'EXPERIENCE DE COMPLEXATION DE L'URANYLE A LA SURFACE DES PLAQUES BIOMIMETIQUES D'HYDROXYAPATITE NON RECOUVERTE (HAP_{PLQ-U}) OU RECOUVERTE ($HAP_{PLQ-PEI-MP-U}$) DE PEI-MP.	128
FIGURE 64 : CLICHES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE HAP_{PLQ} (A) AVANT ET (B) APRES TREMPAGE DANS UNE SOLUTION DE PEI-MP ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). (AGRANDISSEMENT X10000).	130
FIGURE 65 : SCHEMA DU SYSTEME BINAIRE HAP_{PLQ-U}	133
FIGURE 66 : SPECTRE EXAFS DU HAP_{PLQ-U} AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; LA TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	133
FIGURE 67 : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU SYSTEME HAP_{PLQ-U} AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 0,7 ATOME DE CALCIUM, SANS ATOME DE CALCIUM.....	134
FIGURE 68 : SCHEMA DU SYSTEME TERNAIRE $HAP_{PLQ-PEI-MP-U}$	136
FIGURE 69 : SPECTRES EXAFS EXPERIMENTAUX DU PEI-MP-U (SOLUTION), HAP_{PLQ-U} (SOLIDE) ET $HAP_{PLQ-PEI-MP-U}$ (SOLIDE) FAIT AU SEUIL L_{III} DE L'URANIUM, ET SPECTRE EXAFS AJUSTE PAR COMBINAISON LINEAIRE DU $HAP_{PLQ-PEI-MP-U}$; PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER.	137
FIGURE 70 : SCHEMA DE LA SPHERE DE COORDINATION DE L'URANYLE DANS LE SYSTEME $HAP_{PLQ-PEI-MP-U}$. (FORMALISME : EN BLEU LES GROUPEMENTS PHOSPHONATE DE L'HAP ; EN ROUGE LES FONCTIONS PHOSPHONATE DU PEI-MP).	138
FIGURE 71 : COURBE DE CHARGE DU PEI-MP EN THORIUM A PH 7,0.	141
FIGURE 72 : MONOMERES DE PEI-MC N3 ET N5 UTILISES POUR ETABLIR LA COURBE DOSE-REPONSE ET LE DTAP.	142
FIGURE 73 : COURBES DOSE-REPONSE REPRESENTANT LA FRACTION MOLAIRES DE $Th(IV)$ COMPLEXE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE PEI-MP _{N3} , DE DTPMP ET DE PEI-MP _{N5} ..	143
FIGURE 74 : SPECTRE EXAFS DU PEI-MP-TH AU SEUIL L_{III} DU THORIUM ; LA TRANSFORMEE DE FOURIER CORRESPONDANT.	145
FIGURE 75 : AJUSTEMENT DE LA PARTIE IMAGINAIRE DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER DU SPECTRE EXAFS DU PEI-MP-TH AU SEUIL L_{III} DE THORIUM ; AVEC LA CONTRIBUTION DE 1,8 ATOMES DE CHLORE ET SANS ATOME DE CHLORE.	146

FIGURE 76 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PREMIERE ET DE LA DEUXIEME SPHERE DE COORDINATION DU THORIUM OBTENUE DE LA SPECTROSCOPIE EXAFS DANS LE COMPLEXE PEI-MP-TH. 147

Liste des tableaux

<u>TABLEAU 1</u> : DEGRES D'OXYDATION DES ACTINIDES (LES PLUS STABLES DANS L'EAU EN GRAS).	15
<u>TABLEAU 2</u> : ISOTOPES DE L'URANIUM NATUREL, LEUR PERIODE ET LEUR ABONDANCE.	16
<u>TABLEAU 3</u> : BIO-DISTRIBUTION D'ACTINIDES EN CAS D'INJECTION.	23
<u>TABLEAU 4</u> : CONSTANCE DE FORMATION (LOG β) DES COMPLEXES 1:1 DE NTA, D'EDTA ET DE DTPA A 25°C ET A I = 0,1 M.....	47
<u>TABLEAU 5</u> : DISTRIBUTION DU PU(IV) RETENU CHEZ LA SOURIS ET LE RAT 24H ET 13J APRES INJECTION.	48
<u>TABLEAU 6</u> : PKA DES GROUPEMENTS CATECHOL ET HYDROXYPYRIDINONE.	50
<u>TABLEAU 7</u> : CONSTANTES D'AFFINITES (LOG β) DES COMPLEXES 1 : 1 DE 3,4,3-LI(1,2-HOPO) MESUREES 20°C, I= 0,4 M, PH=10.	50
<u>TABLEAU 8</u> : EFFET DE L'HEDP SUR LA DISTRIBUTION DANS LES TISSUS DU RAT DE L'URANIUM (VI) 5J APRES CONTAMINATION.....	52
<u>TABLEAU 9</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LE SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-U.	84
<u>TABLEAU 10</u> : DONNEES STRUCTURALES CALCULEES PAR SIMULATION DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE DE L'URANYLE DANS L'EAU EN PRESENCE DE TROIS MONOMERES PEI-MC.	88
<u>TABLEAU 11</u> : COMPARAISON ENTRE LES PARAMETRES D'AJUSTEMENT EXAFS ET LES DONNEES STRUCTURALES CALCULEES PAR DM DE L'URANYLE COMPLEXE PAR LE PEI-MC.	89
<u>TABLEAU 12</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LE SPECTRE EXAFS DU COMPLEXE PEI-MC-PU.	94
<u>TABLEAU 13</u> : COMPARAISON DES SPHERES DE COORDINATION DU PU(IV) DANS LES COMPLEXES PEI-MC-PU, PU-DTPA ET PU-NTA.	94
<u>TABLEAU 14</u> : PARAMETRES OBTENUS POUR LES COMPLEXES PEI-MC _{N3} -TH PEI-MC _{N5} -TH ET DTPA-TH A PARTIR DE L'AJUSTEMENT DES VALEURS EXPERIMENTALES PAR LE MODELE LOGISTIQUE A QUATRE PARAMETRES DE L'EQUATION 2.....	101
<u>TABLEAU 15</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LE SPECTRE EXAFS DU PEI-MC-TH.	105
<u>TABLEAU 16</u> : COMPARAISON DE LA SPHERE DE COORDINATION DU COMPLEXE PEI-MC-TH FORME AVEC LES SPHERES DE COORDINATION DU TH(IV) DANS LES COMPLEXES TH-DTPA ET TH-NTA ₂	105
<u>TABLEAU 17</u> : RESULTATS OBTENUS POUR LES TAUX DE CHARGE MAXIMUM DU PEI-MC AVEC L'URANYLE ET LE TH(IV) ET LES CONCLUSIONS DE SPECIATION DES CATIONS COMPLEXES AU PEI-MC.....	108
<u>TABLEAU 18</u> : BIODISTRIBUTION ET T _{1/2} DE RESIDENCE DANS LES ORGANES DE COMPLEXES PEI-MP-SN-117M DE DIFFERENTS POIDS MOLECULAIRES INJECTES PAR INTRAVEINEUSE (IV) A DES PRIMATES.	114
<u>TABLEAU 19</u> : BIODISTRIBUTION ET T _{1/2} DE RESIDENCE DANS LES ORGANES DE COMPLEXES DE PEI-MP-Tc-99M DE DIFFERENTS POIDS MOLECULAIRES INJECTES EN IV A DES PRIMATES.....	115
<u>TABLEAU 20</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LE SPECTRE EXAFS DE PEI-MP-U.	125
<u>TABLEAU 21</u> : QUANTITE DE PEI-MP SORBE A LA SURFACE DES HAP _{PLQ}	129
<u>TABLEAU 22</u> : QUANTITE D'URANYLE SORBEE A LA SURFACE DES HAP _{PLQ} -PEI-MP ET HAP _{PLQ} NATIVES.....	131
<u>TABLEAU 23</u> : EQUIVALENCE URANYLE : PEI-MP A LA SURFACE DES HAP _{PLQ} -PEI-MP.....	132
<u>TABLEAU 24</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LES SPECTRES EXAFS DES SYSTEMES HAP _{PLQ} -U ET PEI-MP-U	135
<u>TABLEAU 25</u> : AJUSTEMENT PAR COMBINAISON LINEAIRE DU SPECTRE EXAFS DU HAP _{PLQ} -PEI-MP-U DANS L'ESPACE DES K (K ²) ET DANS L'ESPACE REEL R. LES COMPOSANTES DE CET AJUSTEMENT SONT LES SPECTRES DU PEI-MP-U ET HAP _{PLQ} -U.	137
<u>TABLEAU 26</u> : PARAMETRES OBTENUS POUR LES COMPLEXES PEI-MP _{N3} -TH PEI-MP _{N3} -TH ET DTPMP-TH A PARTIR DE L'AJUSTEMENT DES VALEURS EXPERIMENTALES PAR LE MODELE LOGISTIQUE A QUATRE PARAMETRES DE L'EQUATION 2.....	144
<u>TABLEAU 27</u> : PARAMETRES DU MEILLEUR AJUSTEMENT OBTENU POUR LE SPECTRE EXAFS DU COMPLEXE PEI-MP-TH.....	146
<u>TABLEAU 28</u> : RESULTATS OBTENUS POUR LES TAUX DE CHARGE MAXIMUM DU PEI-MP AVEC L'URANYLE (VI) ET LE TH(IV). RESULTATS DE SPECIATION DU TH(IV) ET DE L'URANYLE (VI) COMPLEXES AU PEI-MP.	149
<u>TABLEAU 29</u> : RESULTATS OBTENUS POUR LES COMPLEXES DE PEI-MP-U ET PEI-MC-U.	152
<u>TABLEAU 30</u> : RESULTATS OBTENUS POUR LES COMPLEXES DE PEI-MP-TH ET PEI-MC-TH.	153

Introduction

Introduction

Depuis la découverte de la fission nucléaire au milieu du 20^{ème} siècle, les actinides n'ont eu de cesse d'être étudiés. Cette famille d'éléments instables dont l'uranium et le plutonium sont les deux représentants les plus célèbres a marqué l'histoire de la science et de l'humanité.

Actuellement l'uranium et le plutonium sont des ressources stratégiques exploitées à un niveau industriel. Ces deux éléments radioactifs sont respectivement utilisés pour la production d'énergie électrique et pour la fabrication de l'arme atomique. Par le passé, l'utilisation d'armes nucléaires (essais atmosphériques et sous-marins, Hiroshima et Nagasaki) et des accidents industriels (Mayak, Tchernobyl, Fukushima) ont engendré des pollutions environnementales importantes et la contamination de nombreuses personnes. Dans le contexte actuel, le risque de dispersion d'actinides est toujours présent et les cas de contamination interne touchent principalement les travailleurs du secteur nucléaire et les soldats (blessures avec des munitions composées d'uranium appauvri).

En cas de contamination interne, le plutonium et l'uranium peuvent se distribuer aux organes *via* la circulation sanguine. Le plutonium qui se trouve sous sa forme Pu(IV) en conditions atmosphériques est retenu principalement par les os et le foie. Les formes solubles de Pu(IV) se complexent aux protéines ferriques alors que ses formes insolubles sont prises en charge par le système réticuloendothélial. L'uranium, quant à lui, se trouve sous sa forme dioxo-cationique, uranyle $\{UO_2^{2+}\}$ au degré d'oxydation +VI et cible préférentiellement la partie minérale de la matrice osseuse (hydroxyapatite). Les tissus du squelette, du foie et des reins qui sont les organes principalement ciblés par la rétention des actinides peuvent subir des dommages liés à la radiotoxicité ou à la toxicité chimique de ces éléments. Les conséquences d'une contamination prolongée avec le Pu(IV) sont l'augmentation du risque de développer des leucémies ou des cancers des os. En cas de contamination avec de l'uranium appauvri (U-238) des dysfonctionnements rénaux peuvent apparaître.

Pour favoriser l'excrétion des actinides et ainsi limiter les dommages subis par les organes, des agents chélatants ont été développés. L'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) s'est révélé particulièrement efficace pour décorporer les actinides (IV) et est actuellement utilisé en France et aux Etats Unis pour traiter les victimes de contamination. D'autres molécules décorporantes sont aussi à l'étude comme le 3,4,3-Li(1,2-HOPO), un dérivé de sidérophore qui présente des affinités pour les actinides (IV), (III) et (V) supérieures à celles du DTPA.

La stratégie de développement des molécules chélatantes a longtemps été basée sur l'optimisation de l'affinité pour le Pu(IV) ce qui a permis de développer des agents chélatants formant des complexes très stables avec les actinides (IV).

Introduction

Cependant l'aspect de la distribution de l'agent chélatant dans le corps humain a quelque peu été négligé. Ainsi le Pu(IV) retenu dans les organes ne peut pas être excrété avec l'administration de DTPA car ce dernier ne se distribue pas aux organes. De la même façon, cette stratégie n'a pas inclus les cas de contamination à l'uranyle et actuellement aucun agent décorporant n'est efficace pour la décorporation de l'uranyle retenu dans l'os.

L'administration de bicarbonate de calcium demeure la seule contre mesure efficace pour favoriser l'excrétion rénale et pour limiter les dommages subis par les reins. Les agents décorporants moléculaires sont toxiques à cause de leur manque de sélectivité en milieu biologique. En effet, des éléments vitaux comme le fer et le calcium sont aussi chélatés au même titre que les actinides.

Pour augmenter l'efficacité d'excrétion des actinides dans les organes, la stratégie basée sur l'optimisation de la sélectivité doit être réorientée vers l'augmentation de la distribution des agents chélatants vers les organes sièges de la rétention des actinides.

Ce projet de thèse constitue une première étape dans l'exploration d'une stratégie de fonctionnalisation macromoléculaire pour vectoriser les agents chélatants vers les organes cibles de la rétention des actinides dans le but d'augmenter leur excrétion. Alors que nous nous sommes efforcés d'aborder ici la question des mécanismes biochimiques de décorporation, il conviendra dans le futur d'appréhender pleinement cette problématique par des études en milieu biologique.

Pour initier cette problématique, nous avons choisi de nous intéresser aux capacités de complexation de l'uranyle et des actinides (IV) de deux agents chélatants macromoléculaires synthétisés à partir du polyéthylèneimine (PEI). Le premier, le polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC) est l'analogue polymérique du DTPA et le second, le polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP) est riche en fonctions phosphonate qui sont connues pour cibler l'os.

Ce travail de thèse a été axé sur la synthèse de ces deux polymères et sur l'étude des complexes qu'ils forment, en milieu pseudo-physiologique, avec l'uranyle (VI), le Pu(IV) et le Th(IV). La sphère de coordination de ces cations a pu être observée par spectroscopie d'Absorption X (SAX) et, dans le cas des complexes d'uranyle, une étude en spectroscopie infrarouge à pu être faite en complément. Les courbes de charge liées à la formation des complexes polymériques d'uranyle et de Th(IV), utilisé comme analogue du Pu(IV), ont aussi pu être tracées. Enfin le PEI-MP ayant été décrit comme ayant une distribution au niveau des os après administration, a fait l'objet d'une étude de complexation de l'uranyle au voisinage de cristaux d'hydroxyapatite mimant la surface osseuse.

Introduction

Ce projet de thèse a donc été motivé par plusieurs objectifs :

- Synthétiser des agents macromoléculaires capables de complexer les actinides (IV) et (VI) en milieu biologique.
- Caractériser les complexes polymériques d'actinides (IV) formés pour les comparer au DTPA et estimer l'impact de l'aspect polymérique sur l'efficacité de complexation.
- Simuler et tenter de caractériser les mécanismes de compétition lorsque l'uranyle interagit avec la surface d'une matrice biomimétique de l'os.

Ce mémoire de thèse est articulé autour de quatre chapitres :

Le premier est consacré à l'état de l'art. Nous y rappelons les caractéristiques des actinides étudiés à savoir le Pu(IV), le Th(IV) et l'uranyle (VI). La toxicité de ces éléments, en cas de contamination, est détaillée de façon épidémiologique et mécanistique quand cela s'est avéré possible. Les moyens de décontamination actuels et ceux en développement y sont aussi référencés.

Le second chapitre détaille la stratégie de décontamination des actinides que nous souhaitons explorer *via* le polyéthylèneimine fonctionnalisé. Les troisième et quatrième développent respectivement les résultats liés au PEI-MC et au PEI-MP. Les synthèses y sont détaillées ainsi que toutes les caractérisations des complexes qu'ils forment avec l'uranyle (VI), le Pu(IV) et le Th(IV). Le quatrième chapitre détaille également une étude de complexation de l'uranyle par le PEI-MP sur un substrat mimant la surface osseuse.

Enfin une conclusion de ce travail proposant une réflexion sur l'applicabilité de cette stratégie basée sur des agents de décontamination macromoléculaires (polymères) sera abordée pour définir et présenter les nombreux verrous qui restent à lever pour que ce travail préliminaire devienne une étude complète.

Chapitre I : Etat de l'art

Toxicité des actinides & agents décorporants

Focus sur U(VI), Pu(IV) et Th(IV).

A Actinides : métaux stratégiques et radioactifs

I Généralité

La série chimique des actinides englobe les 15 éléments chimiques ayant des propriétés attribuables à la présence d'orbitales 5f. Elle commence avec l'actinium, 89^{ème} élément de la classification de Mendeleïev, et se termine avec le lawrencium, 103^{ème} élément. Pour l'actinium et le thorium, la sous-couche 6d est plus basse en énergie que la 5f, d'où leurs configurations électroniques [Rn]7s²6d¹ et [Rn]7s²6d². Plus on avance dans la famille, plus il y a de protons dans les noyaux, et plus les orbitales 5f se contractent. Cela a pour conséquence de rendre les orbitales 5f plus stables que les orbitales 6d. Les éléments du Protactinium au Neptunium présentent donc les configurations [Rn]7s²6d¹5fⁿ (avec n = 2 à 4) puis les orbitales 6d ne sont plus du tout peuplées pour le Plutonium et l'Américium, qui présentent respectivement les configurations [Rn]7s²5f⁶ et [Rn]7s²5f⁷. Après l'Américium, la forte stabilité associée au demi-remplissage de la sous-couche 5f est telle que l'électron suivant est ajouté dans la 6d. Ainsi, le Curium présente la configuration [Rn]7s²6d¹5f⁷. A partir du Berkélium, les orbitales 6d sont à nouveau dépeuplées, et les configurations [Rn]7s²5fⁿ (avec n = 9 à 14) apparaissent jusqu'au Nobeélium. Enfin, pour Lawrencium, la couche 5f est remplie, sa configuration électronique est donc [Rn]7s²6d¹5f¹⁴.

Tous les éléments actinides sont des radioéléments. Ils possèdent donc un noyau atomique instable qui se transforme en un noyau atomique de plus grande stabilité par une cascade de désintégrations spontanées libérant de l'énergie. L'énergie libérée lors de ces désintégrations successives peut prendre trois formes : le rayonnement α où un noyau d'hélium est émis, le rayonnement β où un électron (β^-) ou un positron (β^+) est émis et le rayonnement γ qui est électromagnétique où des photons γ sont émis. Le rayonnement α est très énergétique (>4 MeV) mais peu pénétrant et concerne principalement les gros noyaux (${}^{239}_{94}\text{Pu} \rightarrow {}^{235}_{92}\text{U} + {}^4_2\text{He}$). Deux types de rayonnement β se distinguent, le β^- où un neutron se transforme en proton avec l'émission d'un électron et d'un anti neutrino (${}^{233}_{91}\text{Pa} \rightarrow {}^{233}_{92}\text{U} + {}^0_{-1}\text{e} + {}^0_0\bar{\nu}$) et le β^+ où un proton se transforme en neutron avec l'émission d'un positon et d'un neutrino (${}^{18}_9\text{F} \rightarrow {}^{18}_8\text{O} + {}^0_{+1}\text{e} + {}^0_0\nu$). Le rayonnement β est moins énergétique mais plus pénétrant que le rayonnement α . Enfin les rayons γ qui découlent de la désexcitation d'un noyau résultant d'une désintégration peuvent traverser une centaine de mètres dans l'air ou plusieurs centimètres de plomb ou de béton, sont beaucoup plus pénétrant que les rayonnements α et β mais moins ionisant.

Chapitre I : Etat de l'art

Le thorium-232 et l'uranium-238 ayant des périodes radioactives de plusieurs milliards d'années ainsi que l'uranium-235 qui a une période de demie vie d'environ 700 millions d'années, sont les seuls représentants de la série des actinides encore présents dans la nature. Ils sont principalement présents sous forme de minerais dans la croûte terrestre ou dans l'eau de mer pour l'uranium. Les autres actinides ont été produits artificiellement ou sont issus des familles de désintégration du thorium-232 ou de l'uranium-238.

La chimie des actinides est intimement liée au développement de la filière nucléaire, et très tôt, le développement de techniques physico-chimique de séparation a été essentiel pour extraire, purifier puis recycler les actinides majeurs (uranium et plutonium). La chimie des actinides représente un défi, à cause de leur radioactivité et de la variété de degrés d'oxydation qu'ils peuvent atteindre (Tableau 1). Cette abondance de degrés d'oxydation qui touche les éléments du protactinium à l'américium (jusqu'à sept degrés d'oxydation atteignables pour le plutonium) est due aux orbitales 5f et 6d qui sont très proches en énergie. Cela a pour effet, de mettre plus d'électrons à disposition pour former des liaisons et de faire apparaître une plus grande variété de degrés d'oxydation. A partir du curium néanmoins, le degré d'oxydation III tend à se généraliser puisque les orbitales 5f deviennent plus internes à cause de la contraction actinidique.

Tableau 1 : Degrés d'oxydation des actinides (les plus stables dans l'eau en gras).

<i>Ac</i>	<i>Th</i>	<i>Pa</i>	<i>U</i>	<i>Np</i>	<i>Pu</i>	<i>Am</i>	<i>Cm</i>	<i>Bk</i>	<i>Cf</i>	<i>Es</i>	<i>Fm</i>	<i>Md</i>	<i>No</i>	<i>Lr</i>
						II			II	II	II	II	II	II
III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV					
		V	V	V	V	V								
			VI	VI	VI	VI								
				VII	VII	VII								

Au niveau biologique, les actinides font partie des éléments chimiques qui n'ont aucune fonction essentielle. Ils sont tous considérés comme des éléments toxiques à cause de leur radioactivité (radiotoxique) et de leur comportement chimique (chimiotoxique). L'exploitation industrielle des actinides du début de la série, principalement l'uranium et le plutonium, a donc très vite entraîné des questionnements d'ordre sociétal et environnemental liés aux risques de pollution et de contamination humaine. La nécessité de comprendre et maîtriser la chimie des actinides est, de ce fait, essentielle pour d'une part élucider leurs mécanismes de toxicité et d'autre part développer des contre-mesures efficaces.

II L'Uranium

L'uranium, 92^{ème} élément de la classification périodique, est un élément chimique naturel radioactif de symbole U appartenant à la famille des actinides. Abondant sur Terre (environ 3g.t^{-1} dans les sols granitique ou sédimentaire et 3 mg.m^{-3} dans l'eau de mer), l'uranium est utilisé depuis la Rome Antique comme pigment pour la faïence et la céramique. En 1789, le chimiste Prussien Martin Heinrich Klaproth fut le premier à isoler de l'uranium à partir de la pechblende sous sa forme d'oxyde. Puis en 1841, Eugène-Melchior Péligot réussit à le réduire pour obtenir la forme métallique. E. M. Péligot, à qui l'on doit le terme « uranyle » pour désigner l'ion di-oxouranium (VI) $\{\text{UO}_2^{2+}\}$, est aujourd'hui considéré comme le père de la chimie de l'uranium. Le « rayonnement pénétrant » de l'uranium a été mis en évidence par H. Becquerel en 1896 et confirmé par les travaux sur la radioactivité de P. et M. Curie.

Tableau 2 : Isotopes de l'uranium naturel, leur période et leur abondance.

Isotope	Temps de demi vie (années)	Abondance
U-238	$4,4688 \times 10^9$	99,2752-99,2739 %
U-235	$7,038 \times 10^8$	0,7202-0,7198 %
U-234	$2,45 \times 10^5$	0,0059-0,0050 %

L'uranium naturel est composé de trois isotopes : U-238, U-235 et U-234 (Tableau 2) mais au total 24 isotopes de l'uranium ont pu être produits, du U-217 au U-242. Les trois isotopes naturels sont tous radioactifs. L'U-238 et l'U-235 sont les ascendants des familles de désintégration $4n+2$ et $4n+3$. Avant la seconde guerre mondiale l'intérêt pour l'uranium était limité, mais la découverte de la fission de l'U-235 par l'équipe d'Enrico Fermi en décembre 1942 a placé l'uranium au rang de ressource militaire et énergétique stratégique. L'énergie dégagée lors de la fission complète de l'U-235 (proche de $2 \times 10^7\text{ kWh.kg}^{-1}$) a d'abord été utilisée pour faire une arme atomique (Hiroshima) puis l'U-235 a servi principalement à la production d'énergie, à la synthèse d'autres actinides et à la production de neutrons.

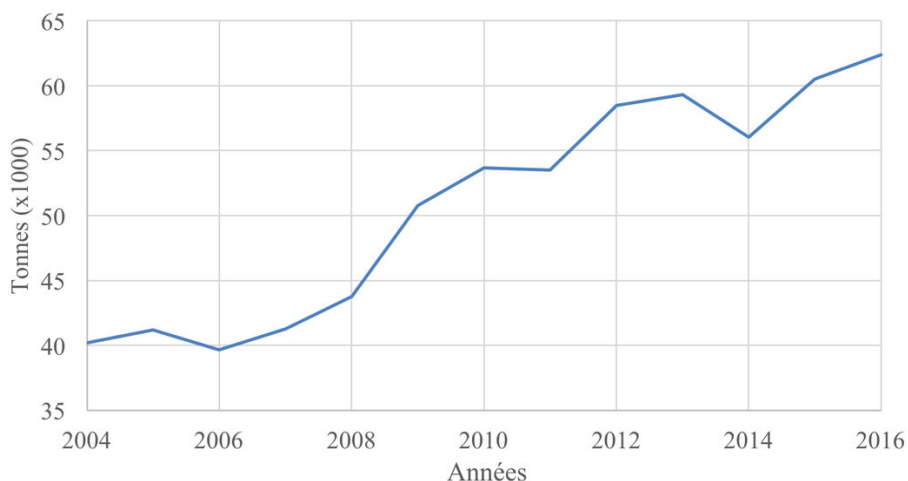


Figure 1 : Production mondiale d'uranium de 2004 à 2016 (source : world nuclear association).

Aujourd'hui, l'uranium est une ressource fossile exploitée industriellement pour satisfaire les besoins énergétiques de nos sociétés. La production mondiale est globalement en hausse depuis 12 ans et a dépassé les 60000 tonnes en 2016 (Figure 1). L'uranium se décline en cinq catégories de composition isotopique : l'uranium appauvri (UA) (<0,71% de U-235), l'uranium naturel (UN) (0,71% de U-235), l'uranium peu enrichi (de 0,71 à 20% de U-235), l'uranium très enrichi (de 20 à 90% de U-235) et l'uranium militaire (>90% de U-235). L'UA est le produit secondaire de l'enrichissement de l'uranium en U-235 et est utilisé dans l'industrie de l'armement pour faire des blindages et des munitions. L'uranium peu enrichi et très enrichi sont utilisés dans les réacteurs de production d'énergie civile et militaire ainsi que dans les réacteurs scientifiques (pour produire des radionucléides) et enfin l'uranium militaire peut servir à faire des armes nucléaires.

L'uranium, comme tous les actinides, possède plusieurs degrés d'oxydation stables ou instables selon les conditions : +III (U^{3+}), +IV (U^{4+}), +V ($\{UO_2^+\}$), +VI ($\{UO_2^{2+}\}$) et 0 (U). En milieu aqueux, l'uranyle ($\{UO_2^{2+}\}$) va prédominer, étant donné que les formes +III, +IV, +V, et 0 vont s'oxyder en UO_2^{2+} (Figure 2a). L'uranyle, est un système linéaire $[O=U=O]^{2+}$ très stable. Comme le montre Denning *et al.*¹ (Figure 2b), plusieurs recouvrements symétriques ont lieu entre les orbitales atomiques (OA) 6d de l'uranium et les OA 2p de l'oxygène pour former les OMs liantes $3\sigma_g$ et $2\pi_g$. Une OM antiliante $2\pi_u$ sera également formée par le recouvrement antisymétrique des OAs 6f et 2p. Les autres OAs f ($5f\delta$, $5f\Phi$ et $6d\delta$) sont non liantes et forment les orbitales moléculaires non occupées de plus basse énergie de l'ion uranyle (LUMO). L'OA $5fz^3$ de l'uranyle et 2 pz des atomes d'oxygène sont, quant à elles, à l'origine de la formation de la liaison trans di-oxo. Le plutonium, le neptunium, et l'américium, en conditions oxydantes peuvent aussi être trouvés sous leur forme actinyle $\{AnO_2^{+,2+}\}$. Cette forme trans di-oxo est propre aux actinides à cause de la présence des orbitales $5fz^3$.

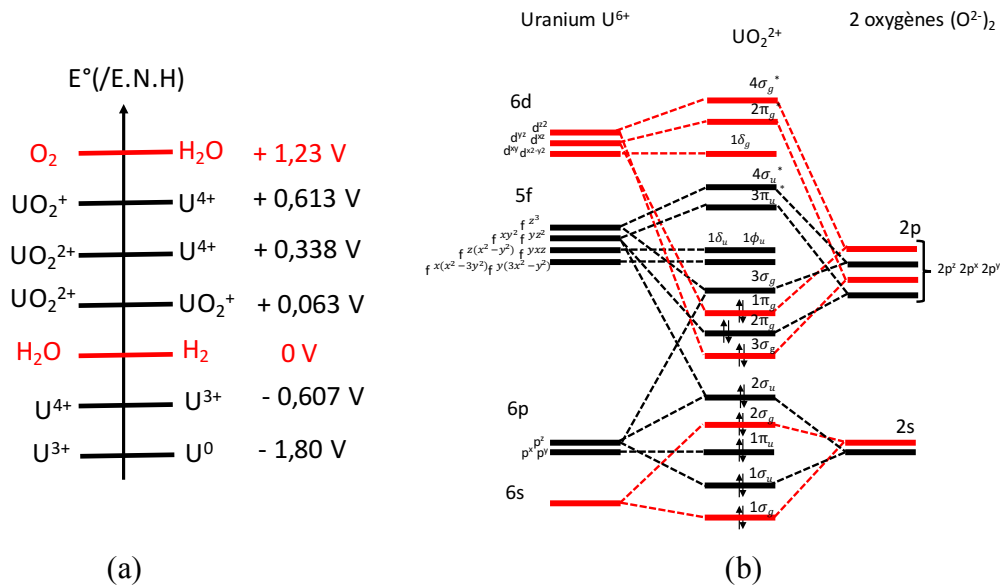


Figure 2 : (a) potentiels standards des couples redox de l'uranium en solution ; (b) diagramme des orbitales moléculaires de l'uranyle.

La classification de Pearson (1983) permet de classer les groupements fonctionnels ou les ions ou encore les molécules selon les termes d'acides et de bases de Lewis, et selon des critères de duretés et de molleses qui correspondent à la localisation des charges partielles (polarisabilité). Ainsi plus une espèce chimique est chargée et petite, plus elle est dure et à l'inverse moins elle est chargée et grosse, plus elle est molle^{2,3}. Cette théorie permet de prédire les affinités entre différents groupements, molécules ou ions sachant que les bases dures ont de plus grandes affinités pour les acides durs et les bases molles pour les acides mous. Comme tous les autres cations actinides, l'uranyle est un acide dur d'où sa forte affinité pour les bases dures telles que les carboxylates ou les phosphonates. A cause de l'encombrement stérique provoqué par les groupements oxo, le recouvrement orbitalaire métal/ligand se fera dans le plan équatorial et les transferts électroniques se feront préférentiellement du ligand vers les OAs d ou f du métal. L'effet d'un ligand donneur sur l'uranyle se traduit par l'affaiblissement de la liaison O=U=O, par diminution formelle de l'ordre de liaison. Ainsi cet affaiblissement de la liaison O=U=O est observable en spectroscopie infrarouge. En effet la bande de vibration antisymétrique de la liaison U-O va se décaler de 960 cm^{-1} pour un complexe hexaaquo à environ 920 cm^{-1} dans le cas d'une coordination par des fonctions phosphates⁴.

Dans le milieu biologique, l'uranyle est le plus souvent complexé aux métabolites ou aux protéines ayant des groupements carbonate ou phosphate. La toxicité de l'uranium pour l'homme et l'animal va donc dépendre de sa forme isotopique. L'UA ou l'UN sous leur forme bio-disponible (uranyle) sont chimiotoxiques et peuvent causer des dommages aux reins, alors que les formes isotopiques les plus riches en U-235 sont radiotoxiques et causent divers types de cancers (leucémie, cancers des os).

III Le Plutonium

« Plutonium evokes the entire gamut of human emotions, from good to evil, from hope to despair, from the salvation of humanity to its utter destruction. There is no other element in the periodic table that has had such a profound impact on the consciousness of mankind.» Dr. Siegfried S. Hecker directeur du Los Alamos National Laboratory (1986-1997).

Le plutonium, 94^{ème} élément de la classification périodique, est un radioélément chimique de symbole Pu appartenant à la famille des actinides. Cet élément a été découvert et fabriqué expérimentalement en 1941 par l'équipe de G. T. Seaborg à Berkeley et pas moins de 20 isotopes ont pu être identifiés depuis (de Pu-228 à Pu-247). La fission de l'isotope 239 du plutonium (Pu-239, $T_{1/2} = 24000$ ans) dégage une grande quantité d'énergie ($2,3 \times 10^7$ kWh.kg⁻¹) ce qui lui a valu d'être utilisé pour faire des armes atomiques. Le Pu-239 est produit par absorption neutronique de l'U-238 puis par une double désintégration β^- . Pendant la guerre froide la course à l'armement nucléaire a entraîné une augmentation massive des stocks de Pu qui ont, par la suite, été partiellement reconditionnés pour la production d'énergie. On estimait en 2003 les stocks mondiaux de Pu-239 à 1855 tonnes.

Dans l'environnement, excepté sur le site d'Oklo, le plutonium est exclusivement d'origine anthropogénique. Il est issu des essais nucléaires atmosphériques et sous-marins, des accidents nucléaires (Maïak, Tchernobyl), des fuites et rejets industriels et de la retombée de satellites (par exemple le satellite U.S. Transit-5BN-3 alimenté au Pu-238 qui s'est désintégré dans l'atmosphère en avril 1964).

Le plutonium comme tous les actinides possède un grand nombre de degrés d'oxydation de +III à +VII ce qui rend sa chimie unique et particulièrement complexe. En solution, quatre degrés d'oxydation peuvent être stables dans des conditions de pH et de milieu appropriés (de +III à +VI) (Figure 3). Le Pu(III) et le Pu(IV) peuvent exister hydratés, alors que le Pu(V) et le Pu(VI) se présentent sous forme de cation di-oxo (PuO_2^+ and PuO_2^{2+}). En solution aqueuse le Pu(IV), qui est hypervalent, va se stabiliser en se constituant une sphère de coordination de 8 ou 9 ligands. La configuration électronique du Pu(IV) est $[\text{Rn}] 7s^2 5f^2$. En tant qu'acide fort selon la classification de Pearson, le Pu(IV) présente de fortes affinités pour les ions hydroxydes, les carboxylates ou les phosphonates.

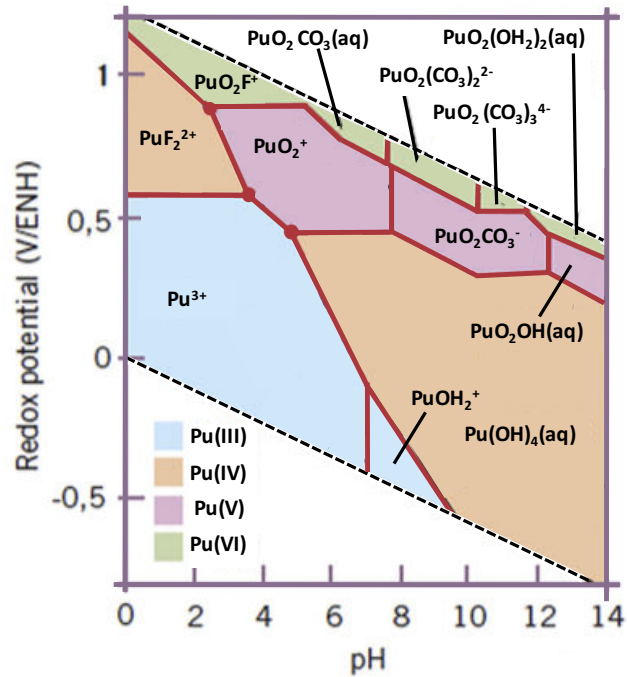


Figure 3 : Diagramme de Pourbaix du plutonium en présence de complexants (Hydroxydes, fluorures et carbonates)⁵. (d'après S.S Hecker. The actinide research quarterly).

Le pH est un facteur déterminant dans la spéciation du Pu(IV) car les fractions solubles et insolubles (polymériques) dépendent de la concentration en ions hydroxydes. La fraction polymérique de plutonium résulte de la condensation d'hydroxyde de plutonium selon le schéma réactionnel de la figure 4.

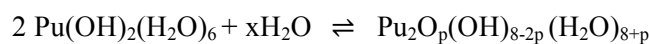
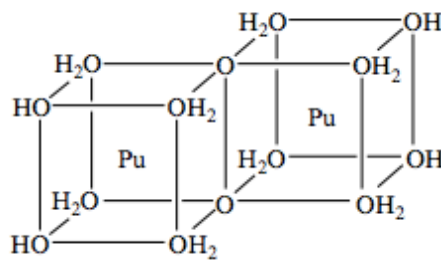


Figure 4 : Dimer de plutonium (IV) polymérique.

Le plutonium comme tous les actinides, n'est pas métabolisé par les organismes vivants, sa radioactivité en fait même un contaminant extrêmement toxique. La biodistribution du Pu(IV) dans l'organisme humain et animal est fortement impactée par sa spéciation. La fraction soluble interagit avec les protéines et les autres molécules organiques biologiques (carbonate, citrate ...) alors que la fraction hydrolysée polymérique est majoritairement prise en charge par le système réticuloendothélial.

IV Le Thorium

Le thorium, 90^{ème} élément de la classification périodique, est un élément chimique radioactif de symbole Th appartenant à la famille des actinides. Il a été découvert en 1828 par Jöns Jacob Berzelius, chimiste suédois. Le thorium est un élément abondant sur terre, majoritairement contenu dans des roches où il est associé à l'uranium (thorianite, uranothorianite, ...) ou à des terres rares (Ce, La, Y). Sa production est d'ailleurs issue de l'extraction des lanthanides des sables de monazite. L'attractivité commerciale du thorium est bien plus faible que celle de l'uranium. En effet, même s'il a été utilisé dans plusieurs domaines comme en médecine avec le Thorotrast®, pour de la catalyse (oxydation de l'ammoniac) ou pour la fabrication de manchons de lampes à incandescence, les quantités utilisées restent marginales. De plus sa radioactivité (faible) lui a valu d'être remplacé dans la majorité de ces applications. Aujourd'hui le thorium pourrait être un élément d'avenir pour le secteur de l'énergie nucléaire avec le développement de réacteurs basés sur des cycles au thorium. En effet les réserves exploitables d'uranium se réduisant, le thorium-232 (Th-232) pourrait être une alternative au Pu-239 et à l'U-235.

Dans la nature, l'isotope principal du thorium est le Th-232. Il y a aussi des traces de Th-230 et de Th-234 issus des désintégrations de U-238, de Th-228 provenant des désintégrations du Th-232 et de Th-227 et Th-231 issus des dégradations de l'U-235. Mais globalement ce sont 30 isotopes du thorium qui ont pu être identifiés (du Th-209 au Th-238).

Le thorium ne peut atteindre que deux états d'oxydation, +III et +IV, mais seul le degré +IV est stable en solution. Il a pour configuration électronique $[Rn] 6d^0 7s^0$ et son hypervalence l'oblige à s'entourer d'un grand nombre de ligands (jusqu'à 12 pour sa sphère d'hydratation). Le Th(IV) a une grande affinité pour les bases fortes de Pearson (hydroxydes, carboxylates, phosphonates ...), et va facilement s'hydrolyser en solution aqueuse pour former le complexe $Th(OH)_n^{(4-n)+}$ tout comme l'élément auquel il est souvent comparé, le Pu(IV). Les constantes rapportées ($\log \beta_n$) pour la formation de l'hydroxyde de Th(IV) sont égales à $(11,8 \pm 0,2)$, $(22,0 \pm 0,6)$, $(31,0 \pm 1,0)$ et $(39,0 \pm 0,5)$ pour $n= 1, 2, 3$ et 4 ⁶. De façon analogue au Pu(IV), le Th(IV) s'hydrolyse facilement pour ensuite former des phases colloïdales par condensation.

Dans ce projet, l'intérêt porté au Th(IV), outre la possibilité de voir un jour du thorium utilisé de façon industrielle pour la production d'énergie, vient de la possibilité de faire une analogie entre le Th(IV) et le Pu(IV). Ces deux actinides sont sensibles au pH et s'hydrolysent facilement pour former une phase colloïdale en milieu aqueux. Même si leurs rayons ioniques sont quelques peu différents (1,048 Å pour

Th(IV) et 0,962 Å pour Pu(IV)), les interactions qu'ils forment avec un certain nombre de ligands inorganiques et organiques sont comparables^{7,8} ainsi que les organes du corps humain où ils sont retenus (cf. Chapitre I B).

Le Pu-239 à cause de sa forte radioactivité présente des difficultés de manipulation ($2,3 \times 10^9$ Bq.g⁻¹ pour le Pu-239 contre $4,1 \times 10^3$ Bq.g⁻¹ pour le Th-232). Mais au vue de la similitude des interactions que développent le Pu(IV) et le Th(IV) avec les ligands usuels que sont le DTPA, l'EDTA et le NTA, nous considérerons que les résultats obtenus pour des complexes de Th(IV) sont suffisamment représentatifs des complexes équivalents de Pu(IV).

B TOXICOLOGIE

I Contamination par des actinides : effets biologiques

A l'origine le mot contamination est le terme médical utilisé pour désigner l'envahissement d'un organisme vivant ou d'un objet par des micro-organismes pathogènes. Dans notre cas ce terme ne décrit plus des micro-organismes pathogènes mais des éléments radioactifs qui vont pénétrer l'organisme humain et qui vont entraîner des modifications dans les équilibres biologiques. Les quatre voies principales de contamination sont : la voie pulmonaire, gastro-intestinale, cutanée et sub-cutanée. Une fois dans l'organisme, les actinides n'étant pas métabolisés par l'organisme, s'insèrent et sont retenus dans les machines moléculaires régissant les équilibres biologiques jusqu'à l'excrétion.

Ainsi les actinides vont selon leur nature, au cours du temps et selon les équilibres physiologiques, migrer dans le corps humain. La collecte de données sur la biodistribution des actinides dans l'organisme a commencé avec le projet Manhattan à la fin des années 40, elle s'est d'abord focalisée sur le plutonium puis a élargi son cercle d'intérêt à d'autres actinides stratégiques (uranium, thorium, neptunium...). Le tableau 3 résume le comportement de quelques actinides après injection chez l'homme (sauf cas du neptunium), les proportions d'actinides dans chaque organe cible, le temps de résidence et la spéciation dans le sang⁹.

Tableau 3 : Bio-distribution d'actinides en cas d'injection⁹.

Actinides	Thorium	Uranium	Neptunium*	plutonium	Americium	Curium	
forme biologique	Th ⁴⁺	UO ₂ ²⁺	Np ⁴⁺	NpO ₂ ⁺	Pu ⁴⁺	Am ³⁺	Cm ³⁺
rayon ionique (Å)	1,00	2,80	0,95	2,90	0,93	1,00	0,98
résidence sanguine	10% 1 j	25% 5 min	20% 1 h	< 1% 1 h	< 1% 1 j	< 1% 1 j	< 1% 1 j
complexes sanguins	0,3% 10js 100% Tf	1% 1 j 50% HCO ₃ ⁻ 20% globules rouges, 30%Tf	< 1% 1 j 80% Tf	70% libre	100% Tf	100% Tf	
organe cible							
os	70%	10–15%	30–50%	30–50%	50%	30%	
foie	5%	/	2–10%	2–10%	30%	50%	
reins	3%	12–25%	/	1%	/	/	
tissus mous	4%	5%	5%	5%	10%	/	
urine	4–6% 5 js	65% 1j	3–4% 1 h	15–20% 1 h	0.4% 1 j	< 1% 1 j	
excrétion	7–9% 20 js	70% 6 js	15% 1 j	20–40% 1 j	1.4% 14 js		
ICRP model	69	69	67*	67		67	

*info sur la distribution du Np(IV) et Np(V) dans le rat et la souris.

Dans la majorité des cas, les os, le foie et les reins vont concentrer la plus grande proportion des actinides présents dans le corps¹⁰ et vont subir des dommages liés aux rayonnements énergétiques qui émanent des isotopes les moins stables¹¹. La toxicité chimique peut également s'ajouter à la radiotoxicité, voire prévaloir lorsque la radioactivité est faible (c'est le cas pour ²³⁸U et ²³²Th)¹². Dans les deux cas, la durée prolongée de l'exposition cause des dommages au niveau cellulaire pouvant provoquer l'apparition de cancers.

A partir des données empiriques du tableau 3, il été possible de comparer la biodistribution de l'U(VI), du Th(IV) et du Pu(IV) dans une représentation graphique présentée figure 5. Il apparaît clairement que quel que soit l'actinide, l'os est une cible. En cas de contamination avec de l'uranium, 66% de la quantité injecté est excrétée dans les six jours qui suivent la contamination. Les reins et les os retiennent environ 18 % et 11 % de la quantité injectée d'U(VI). Dans le cas du Th(IV) et du Pu(IV) la rétention est assez similaire, l'os, le foie et les tissus mous sont ciblés. Dans le cas d'une contamination au Th(IV) l'os retient 77% de la quantité injectée, le foie 6% et les tissus mous 4%. Dans le cas d'une contamination au Pu(IV) l'os retient 55% de la quantité injectée, le foie 33% et les tissus mous 11%.

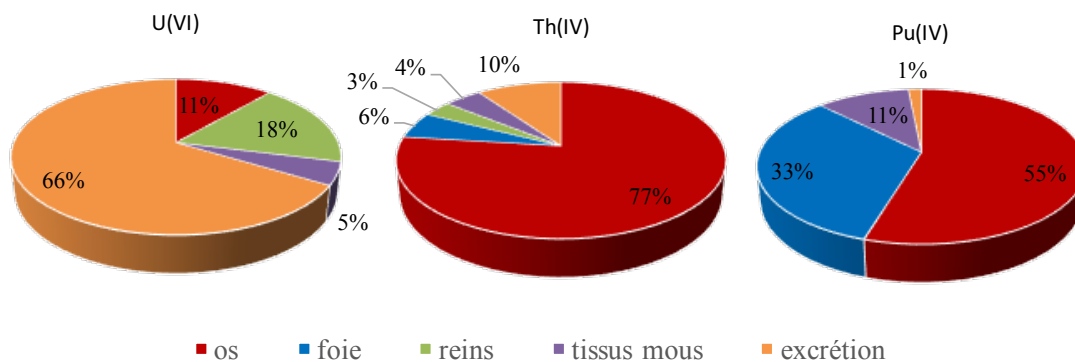


Figure 5 : Représentation graphique des quantités retenues dans les différents organes et excrétées d'U(VI), Th(IV) et de Pu(IV) exprimé en % de la quantité initiale injecté chez le rats⁹.

Pour décrire ce phénomène de biodistribution, un système de compartiments a été créé à partir de données empiriques (CIPR 67 pour le Pu(IV)). Ces différents compartiments et leurs interconnexions lors d'une contamination au Pu(IV) par injection sont décrits figure 6. Dans ce schéma, le sang est au cœur des équilibres permettant à l'actinide de se disperser vers les différents compartiments. Les compartiments dédiés au foie et aux reins sont séparés en deux pour correspondre à deux affinités différentes pour le Pu(IV), les cellules de Kupffer et les hépatocytes pour le foie, les tissus du rein et la voie urinaire pour le rein. Le squelette, acteur majeur de la fixation des actinides est quant à lui séparé en fonction de la nature de l'os (cortical ou trabéculaire) et en fonction de la zone (surface, volume ou moelle).

Enfin le dernier compartiment, dédié aux tissus mous est séparé en trois parties selon le temps de rétention des actinides : ST0 pour des échanges rapides (fluide extracellulaire) ; ST1 pour les échanges de rapidité intermédiaire et ST2 pour les échanges lents.

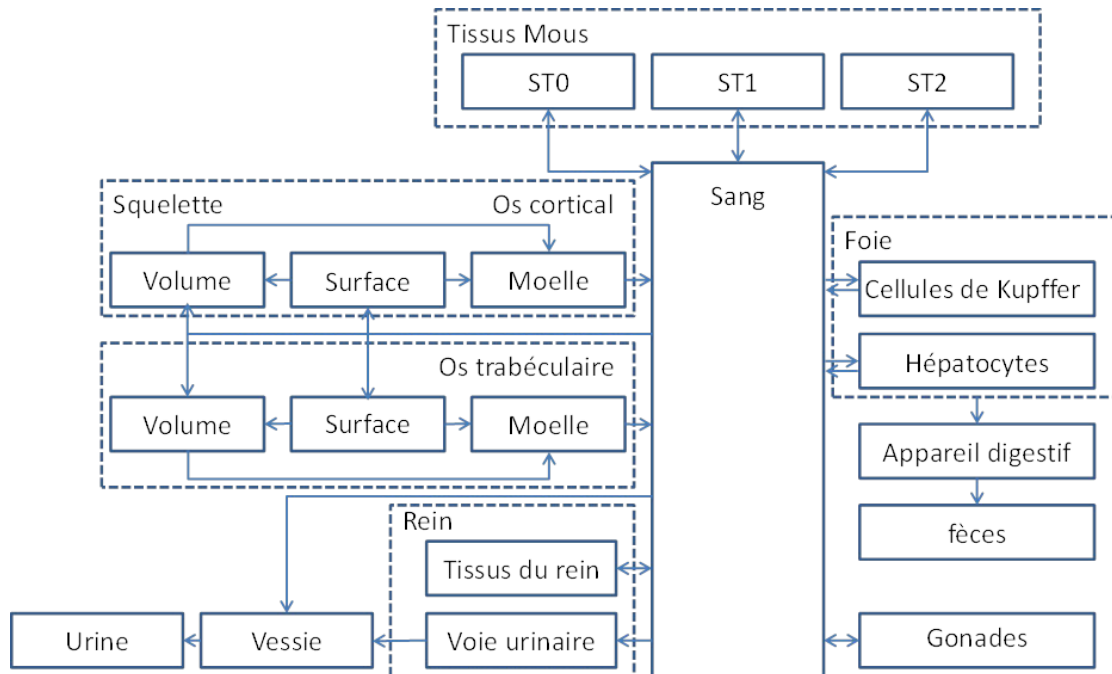


Figure 6 : Modèle systémique de la bio-distribution du Pu(IV) consécutif à une injection (CIPR 67).

Les échanges inter ou intra compartiments sont régis par des constantes qui traduisent la dynamique de la migration des actinides dans les différents organes du corps. Ces constantes sont dépendantes de la voie d'administration et de la nature de l'actinide étudié. Les vitesses d'excrétion, d'échange (notamment la vitesse de sortie du système sanguin) et d'accumulation dans les organes sont des informations essentielles à la compréhension de ces systèmes complexes. Ainsi au fil des études toxicologiques et médicales, les connaissances accumulées ont permis de prédire, grâce à des modèles, les quantités d'actinides qui vont être excrétées, ou bien retenues dans les différents compartiments.

II Contamination à l'Uranium

L'uranium, malgré une distribution inhomogène sur la planète, est un élément présent en grande quantité dans la couche terrestre et une grande partie de la population mondiale en absorbe quotidiennement 1-4 $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$, essentiellement par la nourriture et l'eau (OMS 2004). Ces quantités étant faibles, elles ne représentent pas de risque sanitaire.

L'U-235 est, depuis les années 40, utilisé pour la fission nucléaire, d'abord à des fins militaires, puis civiles pour la production d'énergie. Ainsi quelques pays comme la France ont développé une filière industrielle qui extrait, transforme et utilise l'uranium. Malgré des règles et des contrôles stricts, les travailleurs de ce secteur peuvent être exposés à un risque de contamination interne. La valorisation de l'uranium appauvri et son utilisation comme composant de munitions et de blindages militaires a engendré un grand nombre de cas de contamination humaine. Ainsi on rapporte des cas de contamination chez des soldats déployés lors de la première guerre du Golfe qui ont inhalé des poussières d'uranium ou ont été blessés par des armes contenant de l'uranium appauvri¹³. Les populations locales de ces zones de guerre souffrent aussi de contamination à l'uranium due à la contamination des sols provoquée par les bombardements ou l'abandon de matériels¹⁴.

A cause de l'intérêt stratégique et du risque potentiel que représente l'uranium, la bio-distribution de ce dernier et sa toxicologie ont été très documentées dans la littérature que ce soit *in vitro* ou *in vivo* sur le petit animal (rongeurs, chiens, primates) ou sur l'homme¹⁵. Pour autant, les mécanismes biologiques qui sont perturbés par l'uranium ne sont, pour la majorité, que partiellement connus.

a Biodistribution de l'uranium et impact toxicologique

La voie de contamination et la spéciation de l'uranium ont un impact sur le taux de transfert sanguin, c'est-à-dire sur la quantité d'uranium qui passe réellement dans le sang. Or la présence d'uranium dans le sang, est souvent responsable de la migration de cet élément vers les organes. Ainsi lors d'une injection intraveineuse (iv), la totalité de la quantité d'uranium passe dans le sang alors qu'en cas d'ingestion il n'y aura qu'environ 2% de la quantité d'uranium qui est transférée dans le sang¹⁶ le reste étant directement éliminé dans les fèces. Les cas de contamination par de l'uranium (IV) sont différents, car sous cette forme, l'élimination de l'uranium sera favorisée et la majorité de l'uranium retenu sera issue de sa dissolution sous forme uranyle¹⁷.

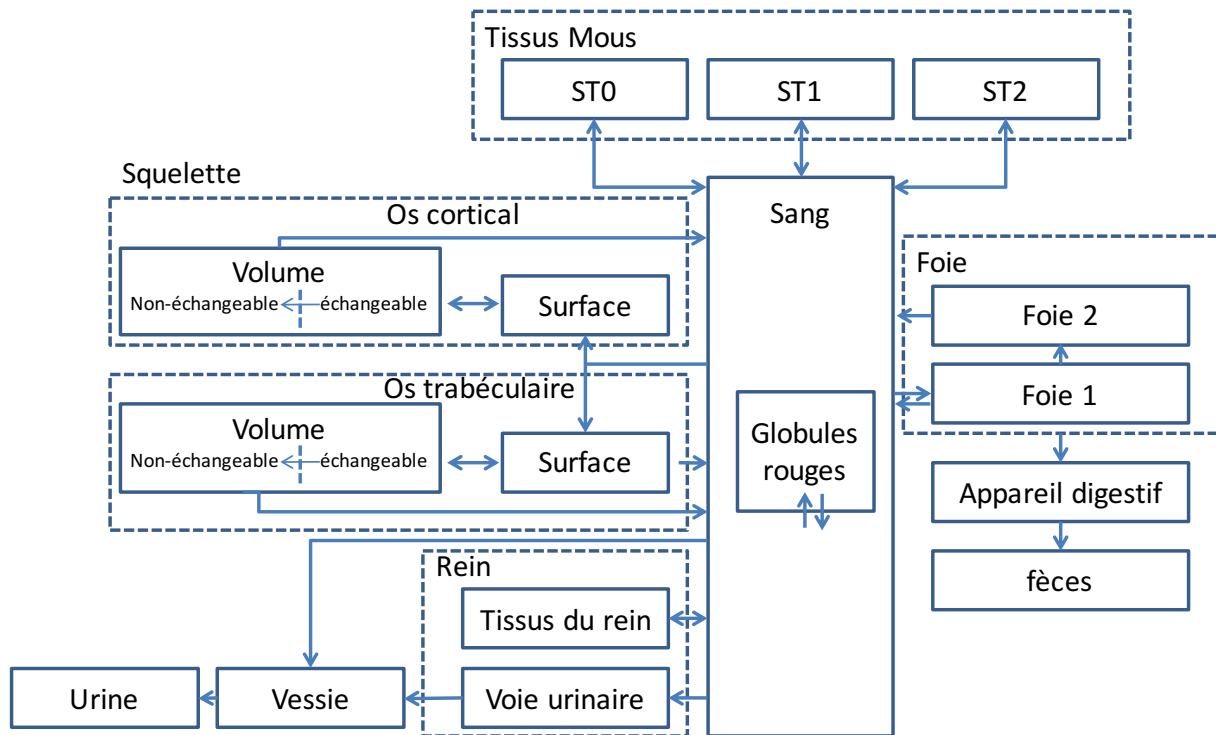


Figure 7 : Modèle systémique de la bio-distribution de UO_2^{2+} chez l'humain¹⁹.

Le compartiment sanguin est donc le vecteur qui distribue l'uranyle dans tous les organes cibles (Figure 7). La biodistribution se fait rapidement, puisqu'après quelques heures, la majorité de l'uranyle quitte le sang pour être, soit excrétée par les urines (70%), soit dirigée vers le squelette (10-15%) et vers les reins (12-25%) (Tableau 3). Il faut aussi prendre en compte les tissus mous, qui sont aussi touchés dans une moindre mesure (5%) par la rétention de l'uranyle. Dans le sang, l'uranyle est complexé à de petites molécules comme des carbonates ou des citrates ou bien à des protéines plasmiques comme la transferrine ou l'albumine¹⁸. Comme le montre la figure 7 avant son excrétion par les urines, l'uranyle passe par les reins où il peut être retenu. Le rein constitue un compartiment de rétention à court terme de l'uranyle (plusieurs mois)¹⁹. Cependant la chimiotoxicité de l'uranyle a des effets néphrotoxiques et à forte dose des altérations de l'architecture de l'épithélium glomérulaire ainsi que des nécroses cellulaires au niveau de l'épithélium tubulaire proximal sont observées chez l'animal²⁰. La DL 50 à quatorze jours de l'uranyle administré par voie orale chez le rat est de 204 mg.kg⁻¹ et la mort est causée par une défaillance rénale¹². D'ailleurs la néphrite est le principal signe clinique d'un empoisonnement à l'uranium. Le compartiment osseux, quant à lui, est un compartiment de rétention à long terme de l'uranyle (plusieurs années)¹⁹. L'uranyle se fixe à la surface de la matrice osseuse en se substituant aux atomes de calcium, en privilégiant les sites vascularisés et les sites où la calcification est active puis l'uranyle s'enfouit dans le volume osseux. Les effets toxiques observés sur l'os lors d'empoisonnement à l'UN ou l'UA sont l'inhibition de la formation osseuse et une augmentation de la résorption osseuse²¹. L'étude *in vitro* sur des cellules fœtales ostéoblastiques humaines testées avec de l'UA a montré une transformation en cellules cancéreuses²².

Malgré des taux de rétention plus faibles que dans le rein et l'os, les tissus mous (compartiments ST0, ST1 et ST3) et le foie sont aussi la cible de l'uranyle et des effets secondaires sont aussi remarquables. Ainsi le recoupement d'études sur l'animal et des cas de contamination humaine ont montré que le système nerveux central pouvait être touché. Cela peut entraîner un déficit neurocognitif, une modification comportementale, une augmentation du sommeil paradoxal et une perturbation des neurotransmissions²³.

Dans la suite de ce chapitre nous allons revenir plus longuement sur les organes jouant un rôle important dans la rétention de l'uranyle. La toxicité de l'uranium sur le rein et les os y sera décrite avec un rappel du fonctionnement de l'organe focalisé sur les processus perturbés par l'uranyle. Ensuite une partie plus brève, car moins décrite dans la littérature, sera consacrée à la toxicité de l'uranium sur les tissus mous et le foie.

b Effet de l'uranium sur le rein

i Fonctionnement du rein

Le rein est un organe vital qui assure plusieurs fonctions au sein du corps humain. Il filtre le sang et permet l'élimination des déchets *via* les urines (fonction exocrine). Il régule les équilibres hydro-électrolytiques et acido-basiques (fonction de régulation). Enfin, il joue un rôle endocrinien avec la sécrétion de rénine, d'érythropoïétine et par l'activation de la vitamine D (fonction endocrinienne). La fonction exocrine se produit en trois étapes dans les néphrons (Figure 8) et consiste en l'excrétion des déchets métaboliques terminaux (urée, créatinine, acide urique, oxalate) et des toxines du sang.

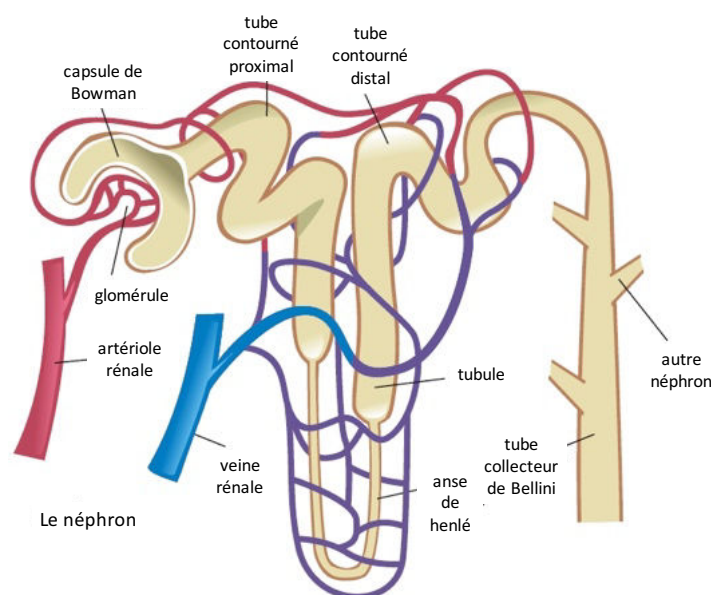


Figure 8 : Schéma du néphron, l'unité de filtration du rein (d'après Cloudschool®).

- La filtration glomérulaire est une première filtration peu sélective du plasma sanguin. Le sang est amené par l'artériole rénale au glomérule, et les éléments plasmatiques, l'eau et les substances dissoutes diffusent à travers la paroi vasculaire et la capsule de Bowman pour former l'urine primitive.
- La réabsorption tubulaire concerne la quasi totalité du filtrat (urine primitive) qui est réabsorbé à différents niveaux du néphron (majoritairement dans le tube contourné proximal). Deux mécanismes de transport à travers la membrane coexistent : un transport passif constitué de l'osmose et de la diffusion pour la réabsorption de l'eau et un transport actif nécessitant un travail cellulaire pour le glucose ou le sodium.
- La sécrétion tubulaire a lieu au niveau du tube contourné distal et de l'anse de Henlé, elle est régie par un transport actif et contribue à la régulation de l'homéostasie et du pH du sang en sécrétant l'excès de protons et de potassium. La sécrétion tubulaire joue aussi un rôle dans l'excrétion des molécules réabsorbées passivement comme l'urée.

Une fonction régulatrice est attribuée au rein, qui va sécréter de l'ADH (hormone antidiurétique) pour maintenir le capital hydrique de l'organisme en stimulant la réabsorption tubulaire de l'eau. Le rein va ainsi contrôler les équilibres hydro-électrolytiques et acido-basiques, en régulant la réabsorption du sodium et des bicarbonates alcalins et la sécrétion de l'ammoniac et des protons, pour maintenir la composition ionique du plasma constante.

Le rein a aussi un rôle dans le système endocrinien car il est responsable de la production de la rénine, une enzyme qui régule la tension artérielle ou de l'érythropoïétine (EPO) une glycoprotéine qui stimule la production de globule rouge. Le rein est aussi impliqué dans l'activation de la vitamine D qui permet l'absorption digestive du calcium.

Le rein, en tant qu'organe responsable de la détoxification du sang, filtre puis excrète une grande partie de l'uranyle sanguin. Cela cause des dommages internes sur le rein qui auront pour conséquence première l'apparition de néphrites puis dans les cas les plus graves d'insuffisance rénale²⁴.

ii Néphrotoxicité de l'uranium

Les reins sont une cible privilégiée de l'uranium, d'ailleurs dans les modèles biocinétiques il est décrit comme un compartiment de rétention à court terme¹⁹. L'uranyle sanguin est dirigé vers le rein pour y être filtré par le néphron puis excrété par la voie urinaire. Malheureusement les reins sont endommagés par ce processus et subissent une modification de leurs fonctions exocrines. Plusieurs études épidémiologiques menées au Canada, en Finlande et aux Etats Unis sur des échantillons de populations consommant de l'eau riche en uranium pendant plusieurs années ont montré une modification de leurs capacités de réabsorption rénale²⁵⁻²⁷. Les études présentaient des quantités d'uranium absorbées faibles (jusqu'à 1160 µg /L pour les eaux les plus riches) et les résultats indiquent

un lien entre le taux de glucose, de phosphatase alcaline et de $\beta 2$ -microglobuline excrétés, qui sont des marqueurs de l'état du rein, et la quantité d'uranium ingérée. Cela souligne un affaiblissement de l'efficacité de réabsorption du tube contourné proximal sans que cela n'entraîne de complications.

En cas de contamination aiguë avec des quantités d'uranium naturel ou appauvri plus grandes ($>3\mu\text{g/g}$ de rein) les tubes rénaux et le glomérule peuvent subir un engorgement des capillaires et des *vasa efferentia*, des gonflements, jusqu'à des nécroses de la paroi épithéliale²⁰. Les expériences animales ont montré qu'une contamination aiguë avec de l'uranium entraîne des troubles sévères de l'excrétion et de réabsorption rénale²⁸ (néphrite, insuffisance rénale). Cependant l'altération des fonctions exocrines est réversible, à conditions que les dommages subis par le néphron ne soient pas trop importants. La régénération des cellules épithéliales est à l'origine du recouvrement des fonctions exocrines. Cette nouvelle génération de cellules évoluera pour perdre les microvillosités présentes sur leur surface membranaire et verra sa mitochondrie réduite ce qui les rendra plus résistantes à la toxicité de l'uranium^{29,30}, mais ces nouvelles cellules épithéliales seront dépourvues de certaines capacités fonctionnelles³¹.

Les études histologiques et structurelles menées sur des animaux montrent des lésions des tissus du rein ainsi que des modifications des parois membranaires suite à une contamination à l'uranium. Les mécanismes de la néphrotoxicité sont mal connus et encore discutés, notamment sur la question de la pénétration cellulaire. Une partie de la communauté argue que l'interaction uranyle-surface membranaire interfère avec la réabsorption de glucose, d'acides aminés, d'eau, de protéines et d'autres composés ce qui conduit à la mort cellulaire par suppression de la respiration cellulaire³².

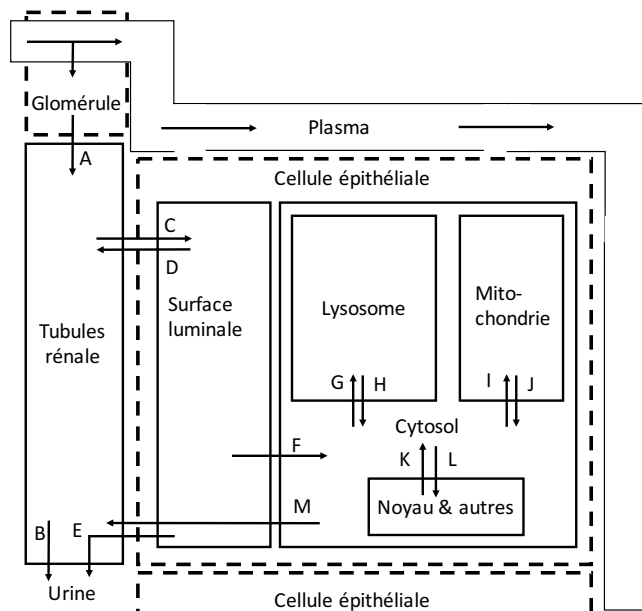


Figure 9 : Schéma des déplacements potentiels de l'U(VI) dans le néphron³³.

En 1989, Leggett *et al.* ont proposé un schéma du déplacement de l'uranyle dans le néphron (Figure 9) pour expliquer sa néphrotoxicité. Dans un premier temps l'uranyle pénètre le glomérule *via* le plasma en passant par les capillaires péri-tubulaires ou en étant filtré directement dans la lumière tubulaire (A). Globalement l'uranyle filtré passe dans les urines (B) même si une partie peut être retenue par les membranes des cellules épithéliales (C). Ensuite l'uranyle retenu peut quitter la surface membranaire de plusieurs façons : en se complexant à de petites molécules (carbonates), par le largage des microvillosités (D) ou des cellules entières qui iraient dans les urines (E), ou bien l'uranyle peut pénétrer la cellule *via* l'endocytose (F). Une fois dans la cellule, l'uranyle est accumulé dans les lysosomes (G) où il forme des microcristaux qui pénètrent dans le cytosol (H) puis l'uranyle est expulsé dans la lumière tubulaire (M). Une petite partie de l'uranyle peut aussi échapper à l'accumulation dans les lysosomes et peut se lier à la mitochondrie (I) ou au noyau (L) ou encore à d'autres éléments de la cellule comme le réticulum endoplasmique³³.

La réversibilité des dommages tissulaires est fonction de la gravité de l'empoisonnement, de la voie d'absorption et de la nature du contre-ion associé à l'uranyle. Plusieurs études soulignent des changements hématologiques³⁴ (taux de globule rouge) ou une altération de la capacité à métaboliser le calcium³⁵ qui pourraient être en partie liés à la sous- ou surproduction d'érythropoïétine ou de vitamine D par le rein.

Il est important de protéger les reins des effets de l'uranium et pour cela favoriser l'excrétion de l'uranyle sanguin par l'utilisation d'agents chélatant formant des complexes stables avec l'uranyle. Empêcher la rétention d'uranyle sur les surfaces membranaires rénales n'est pas suffisant car la rétention d'uranyle dans le corps (compartiment osseux) conduit, à cause de relargage régulier d'uranyle osseux dans le compartiment sanguin, à une contamination chronique du rein.

c Effet de l'uranium sur l'os

i Fonctionnement de l'os

L'os est défini comme une structure rigide fortement minéralisée, constituant le squelette de l'homme et des vertébrés. Les fonctions de l'os et du squelette sont d'abord mécaniques avec le support de tous les organes et les muscles du corps, la protection des organes vitaux tels que le cerveau (crâne), les poumons et le cœur (cage thoracique) ou encore la moelle épinière (vertèbres). Ensuite l'os assure la fonction hématopoïétique en abritant le lieu de formation des globules rouges impliqués dans le processus de la respiration et des globules blancs qui font parti du système immunitaire. Et enfin l'os joue un rôle de régulateur métabolique en servant de réserve de calcium, de phosphate, de carbonate et de magnésium pour le reste du corps. L'os est un système complexe qui doit être résistant, richement vascularisé et qui subit des cycles perpétuels de déstructuration-restructuration de sa matrice minérale.

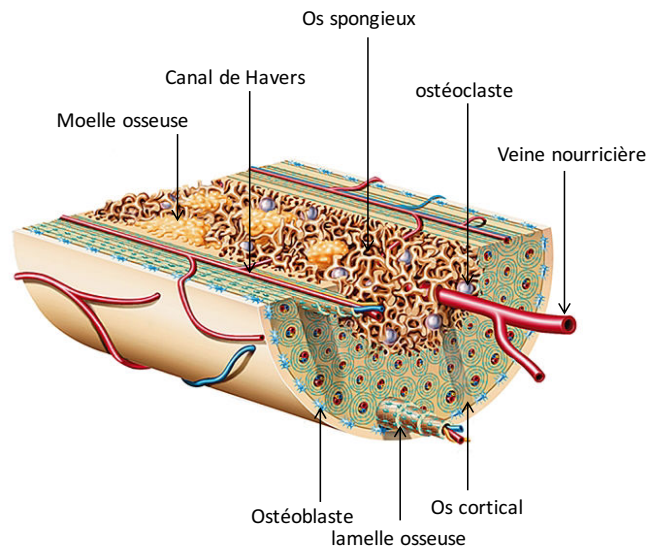


Figure 10 : Dessin en coupe d'un os (d'après François Poulain - Archives Larousse).

Pour répondre aux différentes fonctions de l'os, il existe deux types de tissus osseux : le tissu osseux cortical (80%), dense et solide de part sa forte minéralisation, qui entoure la moelle osseuse, et le tissu osseux spongieux (20%) qui est poreux, peu résistant et qui est rempli de moelle osseuse. Le tissu osseux cortical est formé par le système Haversien fait de lamelles osseuses cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers à l'intérieur duquel passe des nerfs et des capillaires sanguins. Le tissu osseux spongieux forme quant à lui un réseau tridimensionnel où les interstices sont occupés par de la moelle osseuse, c'est là que l'hématopoïèse a lieu. Le tissu osseux contient quatre types de cellules, les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes qui sont les cellules formatrices de la matrice osseuse, et les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules volumineuses, de 20 à 100 μm de diamètre, plurinucléées et hautement mobiles,

capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Les ostéoblastes sont des cellules cubiques situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance et ont une membrane plasmique qui renferme en abondance de la *phosphatase alcaline*. Ils élaborent les constituants organiques de la matrice extracellulaire (MEC). Ainsi leur cytoplasme est riche en organites impliqués dans la synthèse protéique (réticulum endoplasmique granulaire abondant, appareil de Golgi volumineux). Enfin ils peuvent se transformer en ostéocytes ou en cellules bordantes, qui sont des ostéoblastes au repos, ou mourir par apoptose. Les ostéocytes sont des cellules incapables de se diviser, entièrement entourées par la MEC osseuse minéralisée et avec des capacités de synthèse et de résorption limitées, ils participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent à l'homéostasie de la calcémie.

Le cycle de résorption-remodelage de la matrice osseuse commence avec l'activation des ostéoclastes qui développent leurs appareils lysosomaux et se polarisent fortement. Leur membrane plasmique se différencie en deux domaines : un domaine apical au contact de la surface osseuse qui va résorber la matrice organique et minérale en sécrétant des protéases en conditions acides et un domaine basolatéral. Ensuite la formation osseuse est initiée par les ostéoblastes qui déposent une matrice de collagène I (ostéoïdes), puis expriment différentes protéines (phosphatase alcaline ou l'ostéocalcine) et facteurs de croissance. La matrice extracellulaire est donc composée de la phase minérale, le constituant principale de l'os, formée principalement de cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, et de la matrice organique constituée de fibres de collagène I, de protéoglycanes, d'enzymes et de nombreuses protéines comme, l'ostéonectine et l'ostéocalcine pour la minéralisation ou l'ostéopontine qui relie les ostéoclastes à la matrice osseuse.

L'os en tant que réservoir de minéraux pour le corps est un compartiment privilégié de la fixation de l'uranium. En effet l'uranium peut s'insérer dans la matrice extracellulaire minérale, dans les sites du calcium, puis s'enfouir au gré des résorptions-remodelages ou par diffusion. Plusieurs complications peuvent suivre cet emprisonnement de l'uranium dans la matrice osseuse. La première est l'inhibition de la formation de la matrice osseuse conduisant à une fragilisation de l'os. On peut aussi penser à un relargage d'uranium dans le sang sur une longue période ce qui va continuer de contaminer les reins.

ii Rétention de l'uranium dans l'os

L'uranyle a une telle affinité pour la matrice osseuse inorganique que quelques heures après une contamination, entre 10 et 15% de l'uranyle sanguin se retrouve à son contact (Tableau 3). L'os ayant un rôle de réservoir de minéraux, il va devenir le compartiment de stockage à long terme de l'uranyle. Ainsi les lacunes formées par le remodelage de la matrice minérale vont devenir le lieu de la co-précipitation de l'uranyle et du calcium (Figure 11).

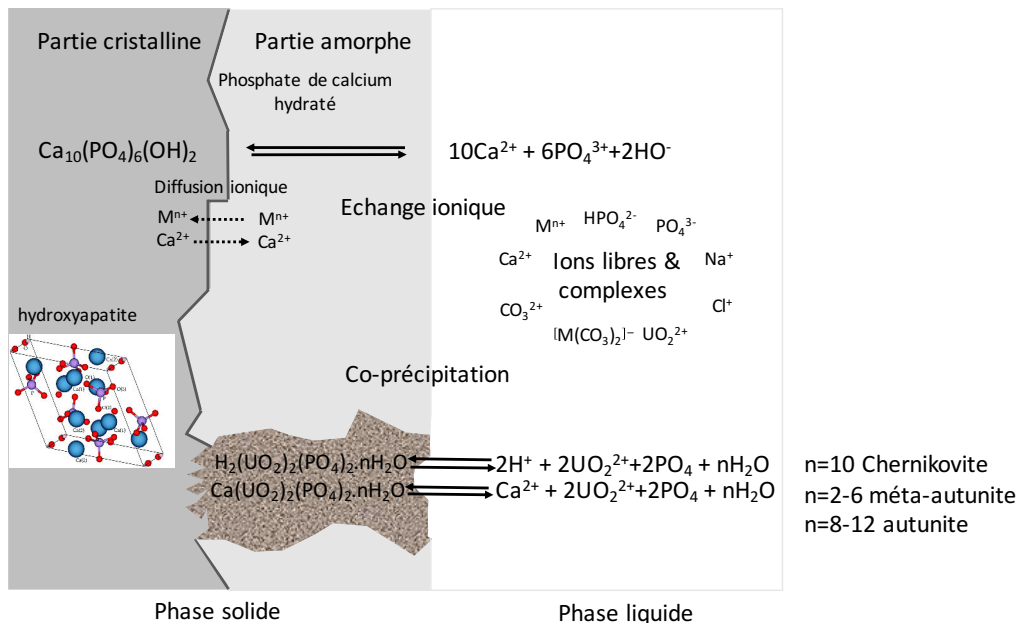


Figure 11 : Schéma des échanges de minéraux entre la surface et le volume osseux, ainsi que de la co-précipitation de sels d'uranyle dans les lacunes osseuses³⁶.

La sorption de l'uranyle sur des matrices d'hydroxyapatite a été décrite par Fuller *et al.*, ainsi des complexes de méta-autunite ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 2-6H_2O$), d'autunite ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 8-12H_2O$) et de chernikovite ($H_2(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 10H_2O$), pourront se former^{37,38} dans les lacunes osseuses issues des cycles de résorption de l'os.

L'autunite ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 8-12H_2O$) a une symétrie pseudo-tétragonale. Sa structure se décompose en une superposition de feuillets de phosphate d'uranyle où quatre atomes d'oxygènes provenant de groupements phosphate sont liés de manière monodente avec l'ion uranyle selon un plan équatorial. Intercalé entre ces couches de phosphate d'uranyle se trouve des ions calcium coordonnés à sept molécules d'eau³⁹. La méta-autunite ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 2-6H_2O$) représenté sur la figure 12 a la même structure en feuillet que l'autunite mais les atomes de calcium sont entourés par quatre molécules d'eau⁴⁰.

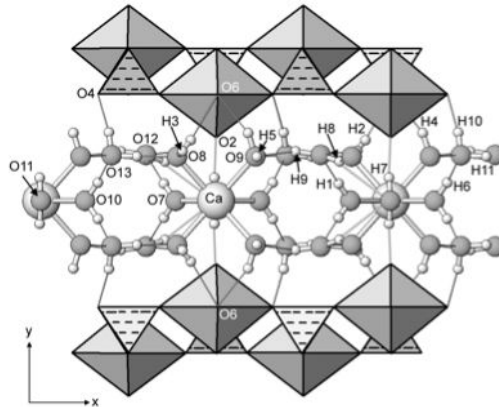


Figure 12 : Image de la structure cristalline de la méta-autunite. (Formalisme : Uranyle : octaèdre, Phosphonate : tétraèdre)⁴⁰. (Figure de Locock et al. Can. Mineral. 2004)

La chernikovite ($\text{H}_2(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), dont un analogue contenant du potassium est représenté figure 13, a une symétrie tétragonale. La structure de la chernikovite se décompose aussi en une superposition de feuillet de phosphate d'uranium entre lesquels s'intercale des ions hydroniums.

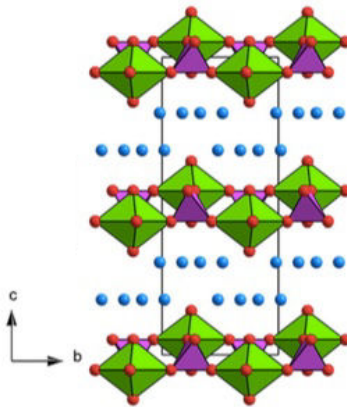
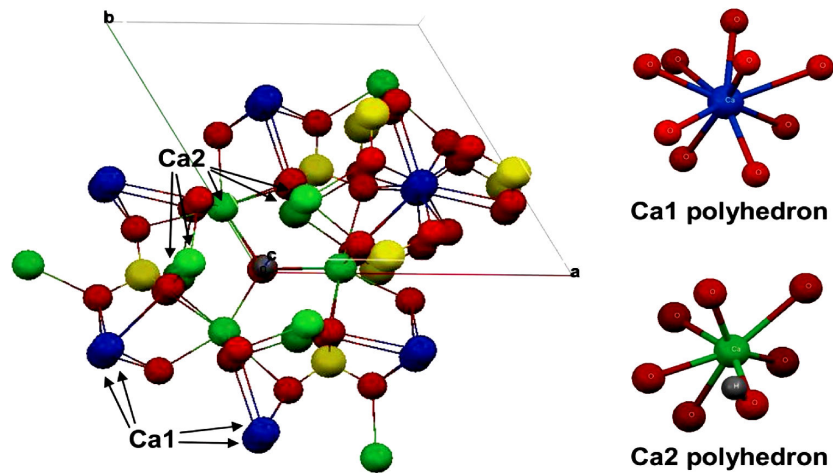


Figure 13 : Image de la structure cristalline de l'ankoleite, un analogue de la chernikovite contenant du potassium à la place des ions hydroniums. (Formalisme : U en vert, P en violet, O en rouge, K en bleu)⁴¹ (d'après Clavier et al. Spectrochim. Acta Part A. 2016)

Suite à la formation de cristaux d'uranyle dans les lacunes osseuses, l'uranyle peut, par diffusion, se substituer au calcium dans la maille d'hydroxyapatite cristalline qui se trouve dans le volume de l'os. L'hydroxyapatite est un cristal de phosphate de calcium ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), représenté figure 14. L'hydroxyapatite est la partie minérale cristalline de la structure osseuse. Elle a une structure hexagonale et présente deux sites distincts d'insertion du calcium. Le premier Ca1 où le cation est coordonné par neuf oxygènes et le deuxième Ca2 coordonné par sept oxygènes. Les lanthanides (III) sont capables de substituer le calcium sans altérer cette maille cristalline. Une étude menée sur la capacité d'insertion de la série des lanthanides (du lanthane au thulium) a prouvé que le site Ca2 était plus favorable à une substitution. Globalement la capacité d'insertion des lanthanides dans l'hydroxyapatite décroît du lanthane au thulium ($\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2(\text{Ln})_x$ où $x=2$ pour le lanthane jusqu'à $x=0,4$ pour le thulium)⁹⁰.



*Figure 14 : Représentation de la structure cristalline de l'hydroxyapatite avec les deux sites du calcium³⁶.
(d'après Vidaud et al. Chem. Res. Toxicol. 2012)*

Des études épidémiologiques menées sur les populations consommant de l'eau riche en uranium, en plus de mettre en évidence la néphrotoxicité de l'uranium, ont montré un lien entre absorption d'uranium et augmentation du nombre de cycles osseux⁴². Ainsi différents acteurs de la machine biologique responsable du remodelage de la matrice osseuse sont perturbés par l'uranium. En premier lieu les ostéoclastes, qu'ils soient matures ou en développement voient leur viabilité diminuer après une contamination ce qui affecte leur capacité à résorber la matrice minérale⁴³. Puis les ostéoblastes subissent un déséquilibre du métabolisme oxydatif, ce qui augmente le stress oxydant. Cela conduit à une inhibition de la différenciation des lignées pré-ostéoblastiques⁴⁴, et en cas de forte concentration d'uranyle, à la mort des ostéoblastes par apoptose. Ainsi l'activité des ostéoblastes et de ses ascendants est inhibée^{45,46} ce qui conduit à une altération des capacités de remodelage de la matrice minérale osseuse. Une étude récente a montré que de l'uranyle s'accumulait dans les ostéoblastes sous forme d'aiguille de minéralisation de méta-autunite et que l'ostéoblaste pouvait déclencher un processus d'autophagie lorsqu'il était soumis à la présence d'uranyle⁴⁷. Certaines protéines présentes au voisinage de la matrice osseuse peuvent aussi interagir avec l'uranyle. Ainsi l'ostéopontine, protéine phosphorylée liante des ostéocytes, peut interagir avec l'uranyle *via* ses fonctions phosphonate⁴⁸ et être capable de se complexer à une grande quantité d'ions uranyle (jusqu'à neuf équivalents par mole) ce qui modifie sa structure⁴⁹ et potentiellement son action biologique.

Malheureusement l'impact de l'uranium sur beaucoup d'acteurs du renouvellement osseux est encore méconnu notamment l'interaction avec des protéines responsables de la minéralisation (l'ostéonectine et l'ostéocalcine). En conclusion un empoisonnement à l'uranium a pour effet général un ralentissement du renouvellement de la matrice osseuse. La translocation de l'uranyle osseux dans la circulation sanguine va, au vu des durées de rétention de l'uranyle dans l'os, impacter les reins et les tissus mous sur plusieurs décennies.

d Effets de l'uranium sur les autres organes et tissus mous

Alors que les mécanismes toxicologiques engendrés par l'uranium sur le rein et l'os ne sont que partiellement connus et compris, la toxicité de l'uranium sur ces deux organes est bien décrite dans la littérature. A l'inverse, la toxicité de l'uranium sur les tissus mous et les autres organes (foie) n'est que très peu décrite. Pourtant les quelques études s'y intéressant montrent que l'uranium est hépatotoxique, qu'il passe la barrière hémato-encéphalique et affecte le système nerveux central ou encore qu'il représente un risque pour les embryons ou la reproduction.

Au niveau du foie, une contamination aiguë avec de l'acétate d'uranyle provoque une hyperémie de légère à intense selon la voie d'administration, des microhémorragies et des infiltrations de cellules mononucléées¹². Des modifications du métabolisme hépatique vont aussi pouvoir se manifester, ainsi le cytochrome P450, une enzyme du foie impliquée dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires est une cible de l'uranyle⁵⁰. Les perturbations hépatiques engendrées par l'uranium restent toutefois minimales en comparaison des dommages subis par le rein.

L'uranyle est également en mesure de passer la barrière hémato-encéphalique et d'être accumulé dans le système nerveux central⁵¹. Plusieurs études, menées sur le rat, démontrent que l'uranyle se retrouve assez rapidement dans plusieurs zones du cerveau, le cervelet, le cortex frontal, le striatum ou l'hippocampe⁵². Au niveau des effets observés sur des animaux contaminés, une étude a montré des perturbations du système cholinergique et un déficit sensori-moteur chez des rats contaminés⁵³. Les cycles du sommeil subissent aussi des modifications et une augmentation du sommeil paradoxale est observée²³. La faible quantité d'uranium s'accumulant dans le cerveau ainsi que la cinétique rapide d'élimination⁵⁴ ne font pas de cet organe une cible privilégiée. Pourtant des effets sur le système nerveux central ont été observés à court terme. L'uranyle impacte aussi la reproduction et est toxique pour l'embryon. Sur l'animal, J. L. Paternain *et al.* ont montré une baisse du nombre de portées et du nombre d'individus par portée chez les couples de souris contaminées par de l'uranium⁵⁵. Chez l'homme, quelques études rapportent une hausse des malformations congénitales et des leucémies infantiles dans les zones irakiennes ayant subi un conflit avec utilisation d'armes à l'uranium appauvri¹⁴.

III Contamination au Plutonium et dans une moindre mesure au Thorium.

La toxicité du plutonium sur l'organisme a été largement décrite dans la littérature depuis les années 1945 et le projet Manhattan. En cas de contamination interne, la forte radioactivité de tous les isotopes de cet élément endommage les tissus des organes dans lesquels il est retenu et provoque des cancers. Les organes touchés par la rétention de plutonium sont les os qui retiennent 50 % du plutonium injecté et le foie qui en retient 30%. En cas de contamination par inhalation les poumons aussi sont des cibles de la rétention de plutonium. Depuis sa découverte, le plutonium est une matière extrêmement contrôlée (notamment par l'AIEA) et seuls quelques pays (Etats Unis, Russie, Royaume-Uni, France, Japon, Chine) peuvent en détenir. De ce fait, le risque de contamination interne concerne principalement les personnels impliqués dans le cycle du combustible ou dans des activités de recherche. Il existe aussi un risque en cas d'accident de réacteur de production ou encore en cas d'utilisation de l'arme atomique. La toxicité du thorium a toujours suscité moins d'intérêt que celle de l'uranium ou du plutonium. Cet élément a moins d'applications que ces derniers qui sont des ressources stratégiques aux niveaux énergétique et militaire. Mais le thorium peut aussi être perçu, à travers la technologie des réacteurs aux sels fondus, comme une alternative au plutonium. Si cette voie de production d'énergie venait à être envisagée, elle relancerait une exploitation à grande échelle du thorium. Actuellement, le risque de contamination concerne principalement les populations vivant dans des zones où le thorium est abondant et les travailleurs qui extraient et transforment les minerais riches en terre rare. La toxicologie du thorium n'a que très peu été décrite par rapport à celle du plutonium ou de l'uranium. Cependant, pendant les années 1930-1950 une suspension d'oxyde de thorium, le Thorotrast®, a été utilisée comme agent de contraste en imagerie médicale déclenchant des cancers chez les patients 20 à 30 ans après l'injection. Une grande partie des données toxicologiques liées au thorium provient de l'étude de cas de patients ayant reçu du Thorotrast®.

a Bio-distribution du plutonium et du thorium : impact toxicologique

Dans le corps humain, le thorium et le plutonium se distribuent aux organes *via* la circulation sanguine. Leur biodistribution dépend de la voie de contamination et de la forme chimique de l'actinide. Dans tous les cas, lorsque l'actinide est dans le sang il n'est que très peu excrété ($\text{Th}^{4+} < 10\%$ et $\text{Pu}^{4+} < 2\%$ par les urines). Le Pu(IV) se présente sous deux formes, une forme insoluble (colloïdale) et une forme soluble (complexée). Dans le cas d'une inhalation, les particules (insolubles) restent prises au piège dans les poumons, causant des dommages aux tissus pulmonaires. Les particules les plus fines ainsi que les formes solubles de plutonium passent les barrières biologiques et entrent dans la circulation sanguine.

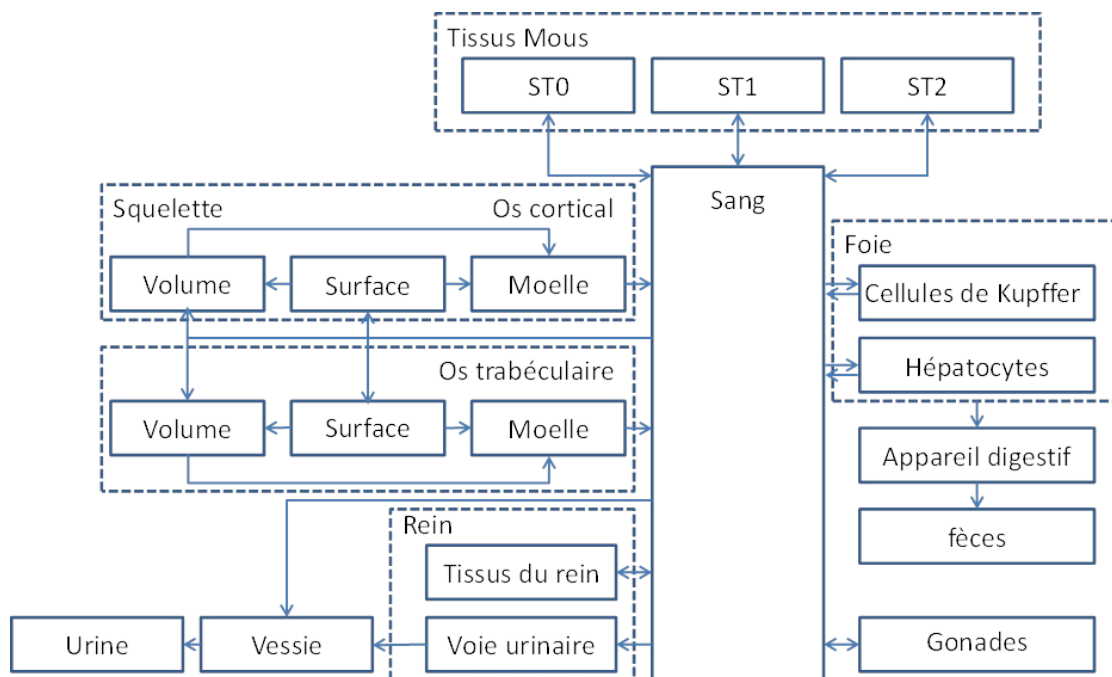


Figure 15 : Modèle systémique de la bio-distribution du Pu(IV) consécutif à une injection (CIPR 67).

Les formes solubles se complexent principalement à la transferrine (Tf) *via* le site de complexation du fer (III)⁵⁶ et quittent rapidement le sang ($\text{Pu} < 1\%$ après 1 j). Comme le montre la figure 15, le compartiment osseux est une cible du Pu(IV) où 50% du plutonium soluble absorbé est retenu sur l'os cortical et trabéculaire⁵⁷. Les compartiments du foie et des tissus mous (Figure 15) retiennent respectivement 30% et 10% du plutonium soluble absorbé (Tableau 3). Les formes insolubles, quant à elles, soit se solubilisent et se complexent aux protéines sanguines ou restent sous forme d'oxyde et sont prises en charge par le système réticuloendothélial (foie et os)⁵⁸. Le plutonium est très toxique et en cas de contamination par inhalation et injection (les modes de contamination étudiés à ce jour) il provoque des cancers des os, du foie et des poumons.

La majorité des études portant sur la toxicité du Th(IV) sont la conséquence d'injection de Thorotrast® et reflètent donc l'injection de Th-232 insoluble (129 et 962 Bq.kg^{-1} de poids corporel)

directement dans le système sanguin. Dans ces conditions, la radiotoxicité du thorium n'est plus négligeable et les conséquences pour les patients ont été l'apparition de granulomes au site d'injection (4 à 6 ans après injection), des effets hématologiques (anémies aplasiques, leucémies, myélofibroses) et hépatiques (cancers, cirrhoses) 20 à 30 ans après injection. A l'inverse il y a eu très peu d'études épidémiologiques sur des travailleurs exposés de façon chronique. Elles montrent une légère augmentation du risque de cancers (poumon et foie) mais sans que cela ne soit significatif^{59,60}. Enfin quelques études se sont intéressées à la biodistribution du thorium. Elle dépend de sa forme et de la voie de contamination. Dans le cas d'inhalation de poussières de d'oxyde de thorium, la majorité du thorium reste dans les poumons⁶¹. Pour les formes solubles de thorium, le compartiment osseux est une cible privilégiée et retient 70% de la quantité injectée (Tableau 3), alors que pour les formes insolubles (Thorotrast®) c'est le foie qui retient une grande partie du thorium.

Que la contamination soit au plutonium ou au thorium la rétention se concentre principalement dans le compartiment osseux et le compartiment du foie. Dans les deux cas le taux d'excrétion naturelle du Pu(IV) et du Th(IV) est faibles (<10%) et le compartiment sanguin sert de vecteur à leur distribution vers les organes. Ces deux actinides se comportent de façon similaire dans un milieu biologique en formant une fraction colloïdale et une fraction soluble qui ciblent le système réticuloendothélial et la surface osseuse.

b Effet du plutonium et du thorium sur l'os

Une fois libéré des complexes qu'il forme avec les protéines sanguines (PuTf), le Pu(IV) soluble cible l'os. Il ne s'incorpore pas dans la matrice osseuse mais se fixe initialement sur les tissus osseux spongieux. L'os cortical accumulera le plutonium avec le temps⁵⁷. Les interactions régissant le comportement du Pu(IV) sur la surface osseuse sont encore mal connues, mais les glycoprotéines osseuses qui sont liées à la membrane des ostéoblastes, les sialoprotéines ou la matrice minérale sont autant de sites d'interactions possibles⁶². Le Pu(IV) colloïdal est beaucoup moins affiné de la matrice osseuse mais il peut être capté par les macrophages osseux. Les études menées sur la toxicologie osseuse du plutonium, jusqu'à ce jour, ne permettent pas de décrire les mécanismes d'interactions précis entre le cation et les différents acteurs du remodelage de la matrice osseuse. La toxicité du Pu(IV) liée à son rayonnement α et β étant très supérieure à sa toxicité chimique, l'étude des interactions que développent le Pu(IV) avec le milieu *in vivo* n'a été que peu explorée. Une contamination au plutonium peut déclencher des mutations chez les cellules osseuses entraînant l'apparition de tumeurs cancéreuses sur les tissus osseux et musculaires de types chondrosarcomes, ostéosarcomes, myosarcomes, fibrosarcomes, rhabdomyosarcomes et synoviosarcomes^{63,64} causant la mort des personnes contaminées quelques décennies après leur contamination.

Le plutonium, comme d'autres émetteurs alpha, quand il est retenu dans la moelle osseuse, endommage les cellules responsables de la production des érythrocytes et des leucocytes et provoque des leucémies.

Le comportement biologique du thorium est peu connu, mais semblerait très comparable à celui du plutonium avec des fractions solubles et insolubles. Ainsi la fraction soluble aurait des affinités pour les protéines osseuses (sialoprotéine, ostéopontine)^{65,66} et la fraction insoluble s'accumulerait dans les macrophages osseux⁶⁷. La majorité des études toxicologiques faites sur le thorium ont été la conséquence des injections de Thorotrast®, il est donc important de garder à l'esprit que cela concerne les fractions insolubles d'oxyde de thorium. L'impact sur l'os, malgré une rétention apparente, semble limité.

c Effets du plutonium et du thorium sur le foie

i Fonctionnement du foie

Le foie est un organe qui intervient dans les processus de digestion. Il est le premier organe que rencontre les nutriments après leur absorption. Ainsi il régule l'afflux de nutriments vers les organes périphériques, il métabolise les lipides et les glucides, il a un rôle dans la détoxification et l'élimination des déchets, et il est le pourvoyeur des protéines sanguines.

Le foie est un organe très vascularisé, par la veine porte ($1350 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) et par l'artère hépatique ($300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Il est composé de cellules endothéliales (20%) qui bordent les capillaires sinusoidaux, d'hépatocytes (65%) organisés en travées hépatocytaires le long des sinusoides, de cellules de Kupffer (10%) qui sont des macrophages résidents et de cellules stellaires (5%) qui stockent les graisses et ont une fonction physiopathologique.

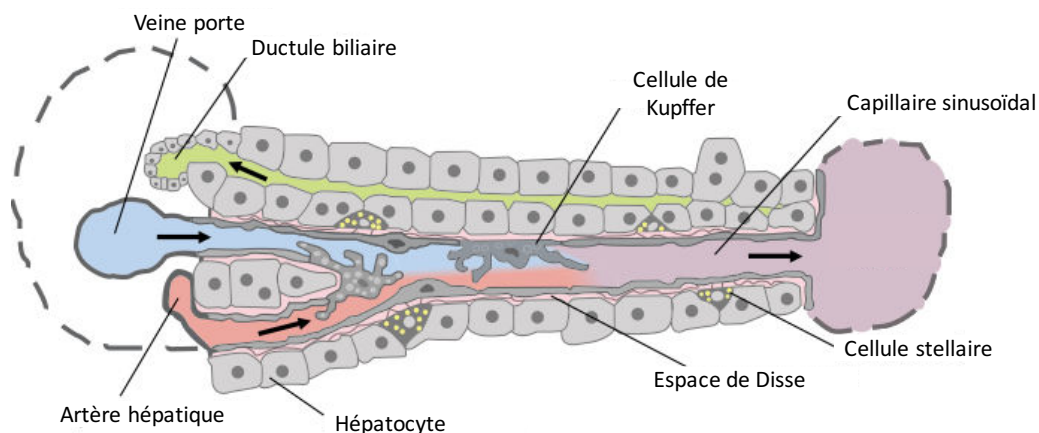


Figure 16 : Schéma d'un lobule hépatique. (d'après Frevert et al. PLoS Biol. 2005)

Les hépatocytes assurent une fonction, métabolique, d'abord en synthétisant le glycogène à partir des glucides ou en produisant des protéines plasmiques comme l'albumine, les facteurs de la coagulation ou les globulines (la transferrine en fait partie). Les hépatocytes métabolisent aussi les acides aminés (tryptophane et phénylalanine) ou les lipides (régulation du cholestérol) et catabolisent l'ammoniac. Le foie participe aussi à la fabrication de l'hémoglobine grâce à ses réserves en fer (sous forme de ferritine) et en vitamine B12. Le fer peut aussi être libéré dans le sang pour être transporté par la transferrine et permettre la formation de l'hémoglobine au niveau de la moelle osseuse. Le foie est un acteur de la détoxification du sang grâce à un système enzymatique très riche qui assure le métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques (substances endobiotiques : dopamine, cholestérol ; substances xénobiotiques : paracétamol, alcool). Les cellules de Kupffer ont pour fonction « d'épurer » le sang sinusoïdal (circulant dans les capillaires sinusoïdaux) des particules étrangères non arrêtées par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales...) avant qu'elles ne gagnent la circulation générale. Ces cellules sont impliquées dans la phagocytose des hématies âgées et dans la dégradation de l'hémoglobine.

Le foie est donc un organe impliqué dans beaucoup de mécanismes biologiques vitaux, et en tant que réservoir de fer, il est une cible privilégiée des actinides (IV) tels que le plutonium ou le thorium. Une contamination interne avec du plutonium cause des dommages à cet organe ce qui provoque à terme l'apparition de cellules cancéreuses et impacte ses fonctions.

ii Effet sur le foie

Au total 30% du plutonium circulant dans le sang est retenu par le foie, ce qui engendre des dommages sur les tissus et à terme peut provoquer des cancers. Les études épidémiologiques portant sur les conséquences à long terme d'une contamination au plutonium sont rares et contradictoires. Deux études portant sur des travailleurs des usines de SellaField et de Hanford ne montrent pas de hausse significative du risque de cancer du foie en cas d'exposition à du plutonium⁶⁸ (exposition aux rayonnements et contamination interne) alors que plusieurs études portant sur une cohorte de travailleurs de l'usine de Maïak et des survivants des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki, soulignent que le taux de décès causés par des cancers du foie avait tendance à augmenter^{69,70}. Mais dans ces deux études la forme chimique de plutonium n'est pas connue. Ces conclusions contradictoires peuvent être expliquées par les quantités de Pu absorbées qui doivent être plus élevées chez les travailleurs de l'usine de Maïak et chez les survivants des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki. Contrairement aux cellules osseuses sur qui les effets des radiations causent des dommages à court terme, la longue espérance de vie des hépatocytes permet au foie de mieux masquer les effets des radiations α et γ ⁷¹. Ainsi les cancers du foie mettent du temps à se développer et il est plus rare pour les personnes contaminées par du plutonium de mourir des suites d'un cancer du foie que d'un cancer des os ou d'une leucémie.

Le plutonium soluble est amené au foie *via* le plasma, complexé aux molécules sanguines (Tf). Il peut alors être relargué par la protéine sanguine et être retenu par les hépatocytes⁷², soit en entrant en interaction avec la membrane, soit en étant internalisé par la cellule. Le plutonium retenu est associé, dans un premier temps, aux protéines de stockage du fer (ferritine). Il a été montré que le complexe Pu-ferritine est plus stable que le complexe Pu-Tf et qu'*in vitro*, il y avait un transfert du Pu(IV) de la transferrine vers la ferritine⁷³. Après quelques semaines le plutonium quitte le cytoplasme des hépatocytes pour s'associer aux structures subcellulaires^{74,75}, principalement avec les mitochondries, les microsomes et les lysosomes. A la mort des hépatocytes, les débris cellulaires, sont pris en charge par le système réticulo-endothélial et chez le rat, il semblerait qu'une partie de ce plutonium (forme soluble) soit transférée dans le système sanguin⁷⁶ et qu'une autre soit excrétée par les fèces *via* la bile⁷⁷. Au niveau du Pu(IV) colloïdal, Bruenger *et al.* ont estimé que la majorité du Pu(IV) particulaire mobilisé par les cellules phagocytaires du foie du chien serait transférée au système sanguin⁷⁸.

IV Conclusion

Au fil de cette revue bibliographique portant sur la biodistribution et les effets du Pu(IV), du Th(IV) et de l'U(VI) sur les organes, nous avons mis en lumière les effets de la toxicité de ces éléments. En cas de contamination, ils sont largement distribués aux organes cibles : l'os, le foie et les reins. A cause de leur toxicité chimique (uranium) ou radiologique (plutonium, thorium), ces éléments provoquent de graves dommages aux tissus des organes qui les retiennent. Ils peuvent aussi perturber les mécanismes biologiques, comme les cycles de résorption osseux en cas de contamination à l'uranium. L'os s'avère être le compartiment le plus touché par la rétention d'actinides. Ces derniers s'incorporent dans la matrice minérale osseuse (uranyle) ou ciblent les zones hyper vascularisées de la moelle rouge (Pu(IV)). Dans le cas du Pu(IV) et du Th(IV) la fraction colloïdale est prise en charge par le système réticuloendothélial. Ainsi les macrophages du foie et des os participent à la rétention des actinides. Le corps humain étant un système dynamique, l'uranium retenu dans le compartiment osseux peut être relargué dans le système sanguin et provoqué des dommages aux tissus rénaux.

C Décorporation des actinides : agents chélatants

I La décorporation des actinides : généralités

La décorporation est le mot utilisé pour définir l'ensemble des traitements visant à éliminer de l'organisme des éléments radioactifs ou toxiques qui ont été incorporés, au moyen d'une substance chimique. Pour limiter les dommages que pourraient causer les actinides, décrits chapitre I B, il est essentiel de les extraire le plus rapidement possible. Très rapidement après le développement du premier réacteur de production de plutonium aux Etats Unis en 1942, les questions de toxicité et d'élaboration de contres mesures en cas de contamination interne par des actinides ont été soulevées par le groupe santé du projet Manhattan⁷⁹. Depuis lors, les connaissances portant sur la toxicité des actinides se sont largement étoffées (cf. Chapitre.I B), et plusieurs systèmes de décorporation moléculaire ont été testés avec un succès mitigé. Extraire les actinides du milieu biologique est complexe. L'hydrolyse partielle de l'actinide à pH physiologique, l'interaction avec le vivant (protéines, matrice osseuse, ...) et l'abondance de cations endogènes (Fe(III), Ca(II), ...) sont autant de compétiteurs du système actinide-ligand. A cela s'ajoute la diversité des propriétés chimiques des actinides qui nécessite de développer un éventail de décorporants adaptés à leurs caractéristiques spécifiques (degrés d'oxydation, rayon ionique).

La décorporation du plutonium a été, dès la fin des années 40, considérée comme une priorité et les premières tentatives employaient des hormones ou utilisaient le principe de « déplacement métallique » pour favoriser l'excrétion des radioéléments par décalcification. Puis des agents complexants ont commencé à être étudiés. En 1945, Painter *et al.* ont administré du citrate de sodium à des chiens et ont noté une augmentation de l'excrétion du Pu(IV) dans les urines⁸⁰. Le dimercaptopropanol (BAL) utilisé pour traiter les contaminations aux métaux lourds (arsenic, mercure et bismuth) a également été testé pour la décorporation du radium et du plutonium, sans grand succès⁸¹, mais s'est montré particulièrement efficace pour des contaminations au polonium⁸². L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) utilisé pour la chélation du plomb a été étudié pour la décorporation de plutonium et s'est montré très prometteur en formant des complexes très stables avec ce dernier⁸³. L'EDTA a, par la suite, été utilisé sous forme de sel de calcium pour limiter sa toxicité rénale mais son manque de sélectivité a encouragé le développement d'autres molécules, formant des complexes plus stables avec le Pu(IV). En 1954, un dérivé de l'EDTA, l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTPA) a été breveté par Geigy Chemical Co.⁸⁴. Peu de temps après V.H. Smith a prouvé son efficacité pour la complexation du Pu(IV)⁸⁵. Aujourd'hui encore le DTPA est utilisé comme l'unique traitement sous forme de sel de calcium ou de zinc pour les cas de contamination

impliquant des actinides (III) et (IV)⁸⁶. La recherche de nouvelles molécules chélatantes du plutonium, plus efficaces et moins toxiques que le DTPA, a pris un tournant avec le bio-mimétisme. Ainsi les similitudes entre le Pu(IV) et le Fe(III) ont mené à l'utilisation de fonctions complexantes du Fer présentes dans les sidérophores pour le design de nouveaux complexants du Pu(IV). Les deux motifs complexants les plus largement utilisés pour la synthèse de nouveaux ligands, notamment par les groupes de K. N. Raymond et P. W. Durbin à Berkeley, sont les catécholates issus de l'entérobactine et les hydroxypyridinones (HOPO) issus de cepabactine, avec l'idée de former une cavité contrainte adaptée à la géométrie du Pu(IV). Bien que la chimie de coordination de l'uranium ait commencé avant l'ère des transuraniens, les recherches portant sur des décorporants potentiels de l'uranyle ont majoritairement consistées à tester l'affinité de ligands développés pour le plutonium (IV) tels que le DTPA ou les dérivés des fonctions HOPO et catécholates. Malheureusement en cas de contamination avec de l'uranium, la toxicité de ces ligands, notamment au niveau rénal, empêche leur utilisation pour la décorporation de l'uranyle⁸⁷. Aujourd'hui le traitement standard en cas de contamination avec de l'uranium est l'utilisation de bicarbonate de calcium qui favorise l'excrétion rénale et protège les tissus rénaux des inflammations provoquées par ce dernier.

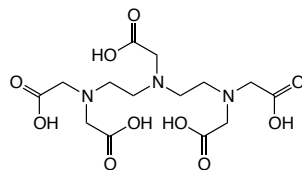
II Le DTPA : Molécule de référence pour la décorporation

a Famille des aminocarboxylates

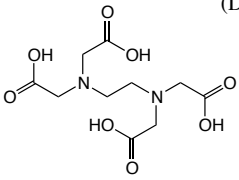
La famille des polyaminocarboxylates, dont sont issus l'EDTA et le DTPA, est connue pour son aptitude à complexer les métaux. La multi-denticité ainsi que le caractère électro-donneur fort des fonctions carboxylate (bases dures selon la classification HSAB), permet de former des complexes stables avec de nombreux cations (Tableau 4).

Tableau 4 : Constante de formation (log β) des complexes 1:1 de NTA, d'EDTA et de DTPA à 25°C et à I = 0,1 M. (^asimulation de chélation sanguine).

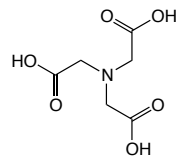
	NTA	EDTA	DTPA
Ca(II)			10,4 ^{89a}
Zn (II)			17,8 ^{89a}
Fe(III)			27,8 ^{89a}
Th(IV)	19,5 ⁸⁸	26,6 ⁸⁸	26,6 ⁹⁰
Pu(IV)	12,9 ⁸⁹	26,4 ⁸⁸	(I=0,5M) 29,5 ⁹⁰
U(VI)	10,8 ⁸⁸	13,7 ⁸⁸	11,0 ⁸⁸



acide éthylène diamine tétraacétique (DTPA)



acide diéthylène triamine pentaacétique (EDTA)



acide nitriloacétique (NTA)

b Le DTPA

i Ca-DTPA et Zn-DTPA

Le DTPA est utilisé, en France et aux Etats Unis, dans les cas de contaminations internes par des actinides (III) et (IV), sous forme de sels de calcium ou de zinc pour limiter sa toxicité. L'affinité du DTPA pour le zinc étant plus forte que pour le calcium, Zn-DTPA (log β=17,8) (Figure 17) est moins toxique mais aussi moins efficace pour la décorporation d'actinide que Ca-DTPA. Zn-DTPA est généralement utilisé si le traitement est de longue durée. Actuellement en cas de contamination avec du plutonium, le DTPA peut être administré sous différentes formulations. Il peut être directement injecté en intraveineuse sous forme de solution diluée à 25% de sel de Ca-DTPA ou de Zn-DTPA. En cas de contamination par les voies respiratoires, une poudre de DTPA qu'il est possible d'inhaler a été développée en tant que traitement d'urgence. Enfin pour laver les plaies et les zones du corps potentiellement contaminées (peau, yeux) le DTPA s'utilise en solution diluée (10-25%).

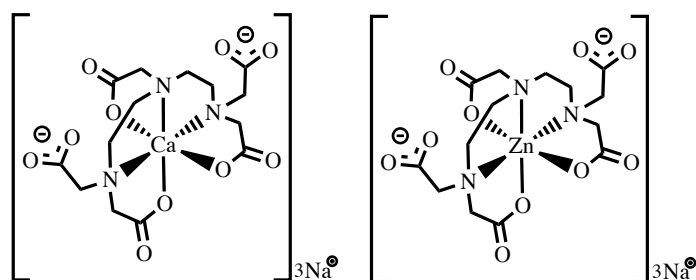


Figure 17 : Schéma des complexes de diéthylènetriaminepentaacétate de calcium et de zinc (Ca-DTPA et Zn-DTPA).

Ca-DTPA et Zn-DTPA, lorsqu'ils sont injectés, sont capables de capter le Pu(IV) soluble circulant dans le sang et permettent une large excrétion par les urines. Comme le montre la première partie du tableau 5, l'injection de Ca-DTPA dans un délai d'une heure après une injection de Pu-238, permet à environ 60% de la quantité de Pu(IV) injectée, d'être excrétée par les urines contre seulement 7% s'il n'y a pas d'injection de Ca-DTPA. Le DTPA modifie la biodistribution du Pu(IV) dans le corps de la souris et limite la rétention osseuse qui passe de 35% du Pu(IV) injecté à 12% 24h après l'injection de DTPA. La rétention hépatique est aussi diminuée par l'injection de DTPA qui passe de 46% à 19% après 24h⁹¹.

Tableau 5 : Distribution du Pu(IV) retenu chez la souris et le rat 24h et 13j après injection⁹¹.

ligand	% de Pu-238 injecté (± déviation standard) après 24h (Pu-citrate, 26-53kBq.kg ⁻¹)					
	squelette	foie	Tissus mous	corps	urine	fèces
Ca-DTPA*	12 ± 3,2	19 ± 5,9	4,2 ± 1,0	35 ± 7,4	60	4,8
Contrôle	35 ± 9,0	46 ± 7,4	7,7 ± 1,4	89 ± 2,2	7,0	3,6
% de Pu-239 injecté (± déviation standard) après 13jours (Pu-citrate, 0,1-0,3μCi)						
	squelette	foie	*30 γmol.kg ⁻¹ de Ca-DTPA ip après 1h			
Ca-DTPA**	41,5 ± 2,20	1,44 ± 0,07	**1 mmol.kg ⁻¹ .j ⁻¹ de Ca-DTPA/Zn DTPA ip après 6, 8 et 11 jours			
Zn-DTPA**	40,9 ± 0,79	1,64 ± 0,09				
Contrôle	56,5 ± 0,54	7,15 ± 0,71				

Une partie du plutonium absorbé par l'organisme ne pourra cependant pas être chélaté par le DTPA. En effet, les fractions insolubles prises en charge par les macrophages échappent à la chélation du DTPA car étant hydrophile, il ne peut pénétrer la membrane cellulaire ou être pris en charge par le système réticuloendothélial⁹². De la même façon, le plutonium hors circulation sanguine (rétention osseuse, hépatique) ne peut pas être chélaté car le DTPA ne se distribue que peu dans les organes. Ainsi l'efficacité du DTPA à promouvoir l'excrétion des actinides décroît avec le délai d'injection⁹³. Comme le montre la deuxième partie du tableau 5, des injections de Ca-DTPA et Zn-DTPA qui ont lieu 6, 8 et 11 jours après contamination au plutonium sont peu efficaces pour promouvoir l'excrétion de la fraction de plutonium retenue dans les os.

En effet, avec les injections de Zn-DTPA et Ca-DTPA 41,5% et 40,9% du Pu subsiste dans le squelette contre 56,5% pour le contrôle⁹⁴. Néanmoins le DTPA, sous sa forme calcium ou zinc, reste efficace en cas de contamination aiguë avec des actinides (III) ou (IV) si le traitement est administré assez rapidement.

Dans le cas de l'uranyle, le DTPA n'est pas utilisé car la constante de complexation UO₂-DTPA est trop faible (plus faible que la constante du complexe Fe-DTPA, Tableau 4). De plus, l'uranyle quitte le système sanguin rapidement pour se fixer dans la matrice osseuse alors que le DTPA se distribue principalement dans le sang. Et enfin, plusieurs études ont montré que les reins subissaient des dommages plus importants lors de la chélation d'uranyles avec du DTPA que lors de l'excrétion naturelle⁹⁵.

ii Vectorisation du DTPA

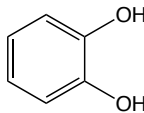
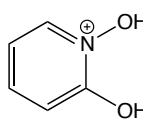
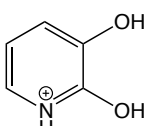
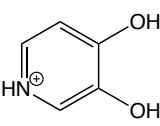
Des formulations spéciales telles que le Ca-DTPA aérosolisable, visant l'administration par les poumons, ont été testées^{96,97}, mais n'ont montré d'efficacité réelle que sur les formes solubles de Pu déposées dans les poumons⁹⁸. En effet, les formes colloïdales sont principalement piégées dans les macrophages présents dans l'alvéole pulmonaire où ils expriment leur toxicité⁹⁹. En outre, il semble que les procédés d'aérosolisation utilisés génèrent des particules qui présentent, pour le mieux, des diamètres d'environ 2 µm. Ceci demeure malheureusement encore trop grand pour s'intégrer dans les alvéoles pulmonaires et leurs macrophages. Par ailleurs, certaines formes lipophiles de DTPA ayant des chaînes latérales alkyles de longueurs variables, ont été testées pour leur capacité de pénétration des cellules¹⁰⁰⁻¹⁰³. Parmi ceux-ci, les chélates d'acide docosyltriéthylènetétraméthane pentaacétique (C22TT)¹⁰⁴ se sont révélés être de bons candidats pour un développement ultérieur en raison d'une biodisponibilité plus favorable et d'une voie d'excrétion biliaire significative¹⁰⁵. Une autre formulation avancée, NanoDTPA®^{106,107}, consiste en un procédé d'encapsulation de particules de DTPA avec de l'acétate de zinc et d'autres adjuvants. Une biodisponibilité orale similaire à celle relative à l'administration intraveineuse de DTPA a été obtenue avec des chiens¹⁰⁶ pour la décorporation d'Am-241¹⁰⁷. Nano-DTPA™ a été reconnu par l'USFDA (U.S. Food and Drug Administration) en 2011.

Les formes liposomales de DTPA, également, ont été appliquées depuis le début des années soixante-dix^{108,109} pour améliorer le profil biologique de l'agent chélatant. Les liposomes ont aussi été préparés avec Ca- et Zn-DTPA et comparés aux témoins¹¹⁰. Les derniers résultats concernent actuellement l'utilisation de liposomes furtifs (pégylés)¹¹¹ et plus spécifiquement de petits liposomes furtifs (100 nm de diamètre)^{92,112,113} qui permettent des temps de circulation plus longs, une meilleure biodistribution, une dose plus faible tout en augmentant l'excrétion. Néanmoins, la voie d'administration intraveineuse exclut encore leur utilisation pratique et leur développement comme de vrais candidats à une étude clinique.

III Les dérivés de sidérophore : HOPO et CAM

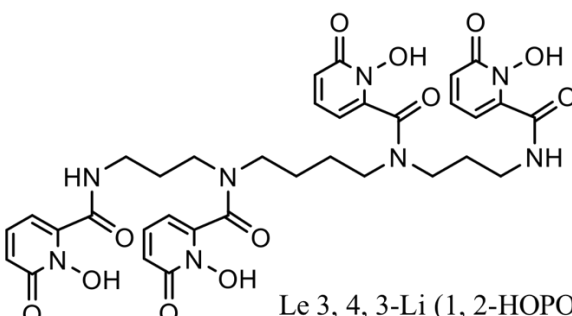
Les sidérophores sont des peptides sécrétés par certaines bactéries qui ont pour fonction de rendre le fer (III) disponible et utilisable. Le Fe(III) et le Pu(IV) sont tous les deux des acides forts de Pearson et leur rayon ionique est relativement similaire ce qui conduit à des comportements comparables. Le plutonium (IV) développe majoritairement des interactions avec des protéines ferriques (transferrine, ferritine) en cas de contamination. Pour le développement de nouveaux décorporants plus affins du plutonium (IV), les fonctions complexantes des sidérophores catéchols et hydroxypyridinones (HOPO) se sont montrées particulièrement intéressantes lorsqu'elles sont déprotonées (Tableau 6).

Tableau 6 : pKa des groupements Catéchol et Hydroxypyridinone¹⁰.

	pKa1	pKa2
 Catechol	9,2	13
 1, 2 HOPO	-0,8	5,8
 3, 2 HOPO	0,1	8,7
 3, 4 HOPO	3,4	9

A ce jour, une grande variété de ligands utilisant les fonctions catéchols et HOPO modifiées a été synthétisée pour former des ligands multi-dentates plus adaptés aux symétries de complexation du plutonium (IV) que le DTPA¹⁰. Le 3,4,3-Li (1,2-HOPO) est l'un des ligands inspirés des sidérophores les plus largement décrits dans la littérature car il possède une très grande affinité pour les actinides (IV) (Tableau 7).

Tableau 7 : Constantes d'affinités ($\log\beta$) des complexes 1 : 1 de 3,4,3-Li(1,2-HOPO) mesurées 20°C, I= 0,4 M, pH=10¹¹⁴.

	3, 4, 3-Li (1, 2-HOPO)
 Le 3, 4, 3-Li (1, 2-HOPO)	> 41,5
	40,1
	40–41
	40–41

Plusieurs études s'accordent sur le fait que le 3,4,3-Li(1,2-HOPO) est plus efficace pour la décorporation d'actinides (IV) que le DTPA et qu'il convient pour la décorporation d'actinide (III) et (IV)¹¹⁵.

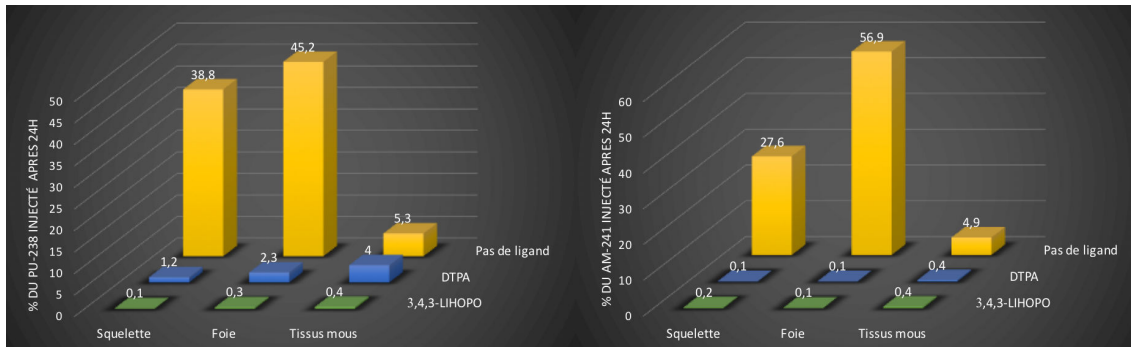


Figure 18 : Distribution dans les tissus de souris du plutonium (IV) (0,7kBq) (à gauche) et de l'américium (III) (0,9kBq) (à droite) 24h après injection (iv) de complexe An-ligand¹¹⁶.

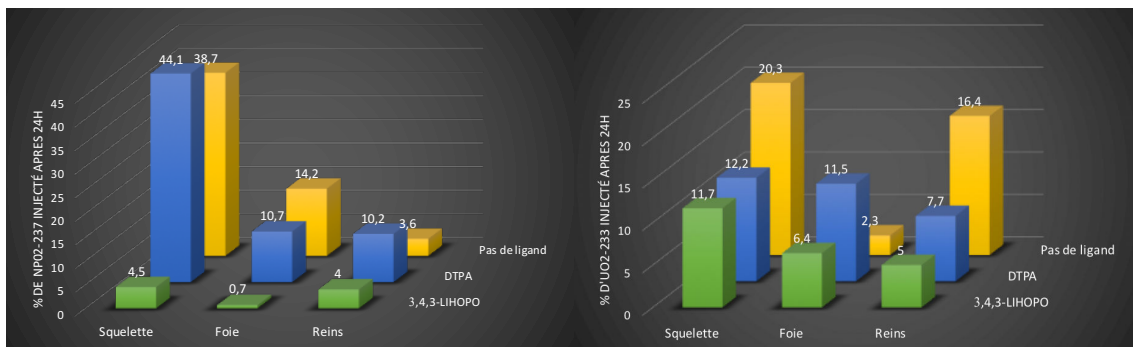


Figure 19 : Distribution dans les tissus de souris du Neptunium (V) (0,7kBq) (à gauche) et de l'uranium (VI) (0,5kBq) (à droite) 24h après injection (iv) de complexe An-ligand¹¹⁶.

Comme il est montré sur les figures 18 et 19¹¹⁶, en milieu *in vivo* le 3,4,3-Li(1,2-HOPO) forme des complexes d'américium (III) aussi stables qu'avec le DTPA et des complexes de plutonium (IV), de neptunium (V) et d'uranium (VI) plus stables qu'avec le DTPA. Ainsi lors de l'injection de Li-HOPO les rétentions osseuses et hépatiques sont largement réduites. La seule exception est l'uranium (VI) qui voit sa rétention hépatique augmenter, sa rétention osseuse divisée par deux et sa rétention rénale divisée par trois. Le Li-HOPO est donc un complexant prometteur avec des affinités plus grandes que le DTPA pour une plus grande variété d'actinides. En revanche comme le DTPA, le Li-HOPO ne peut pas être envisagé pour la décorporation de l'uranyle car son affinité pour ce dernier est trop faible. De plus, plusieurs études de toxicologie ont montré que l'utilisation du Li-HOPO pour des contaminations à l'uranyle entraîne des dommages rénaux importants^{87,117}. Le Li-HOPO voit aussi son efficacité décroître avec le délai d'injection, ce qui laisse penser qu'il n'est pas en mesure de se distribuer largement vers les organes et qu'il n'est donc pas efficace pour chélater les actinides retenus sur les organes. (os, foie)⁹³.

IV Les décorporants de l'uranium (VI)

Actuellement, en cas de contamination à l'uranyle, l'absorption de bicarbonate de calcium est préconisée sous forme de solution injectable ou à ingérer. Le sel de bicarbonate favorise l'élimination rénale et limite l'interaction entre l'uranyle et les tissus du néphron en formant des polycarbonates d'uranyles ce qui minimise les dommages subis par les reins. Le bicarbonate, en facilitant l'excrétion de l'uranyle sanguin, va modifier sa biodistribution et limiter la rétention osseuse. Par contre, l'uranium retenu par l'os n'est pas pris en charge par le bicarbonate¹¹⁸.

Le DTPA ainsi que les dérivés de sidérophore étant peu efficaces et entraînant une toxicité accrue en cas de contamination à l'uranyle, il a fallu rechercher d'autres ligands pour la chélation de ce dernier. Les bis-phosphonates sont, par exemple, connus pour cibler l'os, pour être peu toxiques et pour leurs capacités de complexation des acides durs de Pearson, ce qui en fait des candidats intéressants pour la chélation de l'uranyle. L'acide 1-hydroxyethane-1,1'-diphosphonique (HEDP) s'est révélé capable de contenir la toxicité rénale de l'uranyle chez le rat¹¹⁹ et a permis de diviser par deux la mortalité chez les souris contaminées par des doses de 350 mg.kg⁻¹ de nitrate d'uranyle¹²⁰.

Tableau 8 : Effet de l'HEDP sur la distribution dans les tissus du rat de l'uranium (VI) 5j après contamination¹²¹.

	% de U-233 injecté (\pm déviation standard) après 5jours				
	squelette	rein	foie	urine	fèces
HEDP*	30,2 \pm 1,2	5,5 \pm 0,5	0,4 \pm 0,1	50,1 \pm 4,3	2,9 \pm 1,7
Contrôle	34,2 \pm 4,5	8,0 \pm 2,3	0,4 \pm 0,0	40,7 \pm 3,4	1,8 \pm 1,0

*30 μ mol.kg⁻¹ de HEDP ip après 5min , 9,2 kBq/injection de U-233

L'HEDP est capable en une seule injection d'augmenter l'excrétion et de limiter la rétention osseuse et rénale (Tableau 8). Ceci fait des fonctions bis-phosphonates une alternative prometteuse aux fonctions carbonate en tant que chélatant de l'uranyle.

Autre voie explorée pour le développement de nouveaux chélatants de l'uranyle, la voie biomimétique avec les sites de complexation de protéines calciques. L'uranyle développe des affinités analogues au calcium (II) et certaines protéines, complexant le calcium, pourraient être une solution pour le développement de nouveaux décorporants. Ainsi la calmoduline et l'ostéopontine sont des protéines ayant des sites de fixation du calcium (II) et elles développent des affinités très grandes pour l'uranyle^{48,49}. Leurs sites actifs sont étudiés et dans le cas de l'ostéopontine un peptide mime du site actif a été envisagé pour la décorporation de l'uranyle^{122,123}.

V Conclusion

Actuellement en cas de contamination avec des actinides, du DTPA sous forme de sels de calcium ou de zinc est administré. Cet agent chélatant est adapté pour promouvoir l'excrétion sanguine du plutonium soluble. Par contre le DTPA ne se distribue que peu aux organes ce qui limite son efficacité de décontamination. Des formulations de vectorisation sont à l'étude pour augmenter la distribution du DTPA. L'encapsulation ou l'aérolisation sont des moyens envisagés pour atteindre les organes touchés par la rétention des actinides (os, foie, poumon)

D'autres agents décontaminants du Pu(IV) ont été développés, notamment le 3,4,3-Li(1,2-HOPO), un ligand mimétique de sidérophores, qui est actuellement très étudié et qui semble plus efficace que le DTPA même si comme lui il ne se distribue que peu hors du système sanguin.

Ces deux agents décontaminants (le DTPA et le 3,4,3-Li(1,2-HOPO)) ne sont pas adaptés à la décontamination de l'uranyle. Actuellement pour traiter une contamination par de l'uranium du bicarbonate de calcium est administré pour favoriser l'excrétion rénale. L'HEDP un agent chélatant phosphorilé est à l'étude pour traiter les cas de contamination par de l'uranium et les premiers résultats chez l'animal semblent prometteurs.

La décontamination des actinides semble actuellement limitée par les capacités de distribution réduites des agents chélatants moléculaires (DTPA et 3,4,3-Li(1,2-HOPO)). Il semblerait qu'une façon d'augmenter l'efficacité de décontamination soit de distribuer plus largement dans le corps les molécules complexantes.

D Références

- (1) Denning, R. G. Electronic Structure and Bonding in Actinyl Ions and their Analogs. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4125-4143.
- (2) Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512-7516.
- (3) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
- (4) Barkleit, A.; Foerstendorf, H.; Li, B.; Rossberg, A.; Moll, H.; Bernhard, G. Coordination of uranium (VI) with functional groups of bacterial lipopolysaccharide studied by EXAFS and FT-IR spectroscopy. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9868-9876.
- (5) Topin, S. Aupiais, J. The pentavalent actinide solution chemistry in the environment. *J. Environ. Radioact.* **2016**, *153*, 237-244.
- (6) Neck, V.; Kim, J. I. Solubility and hydrolysis of tetravalent actinides. *Radiochimica Acta* **2001**, *89*, 1-16.
- (7) Krauskopf, K. B. Thorium and rare-earth metals as analogs for actinide elements. *Chemical Geology* **1986**, *55*, 323-335.
- (8) Choppin, G. R. Utility of oxidation state analogs in the study of plutonium behavior. *Radiochimica Acta* **1999**, *85*, 89-95.
- (9) Ansoborlo, E.; Prat, O.; Moisy, P.; Auwer, Den, C.; Guilbaud, P.; Carriere, M.; Gouget, B.; Duffield, J.; Doizi, D.; Vercouter, T.; Moulin, C.; Moulin, V. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* **2006**, *88*, 1605-1618.
- (10) Gordon, A. E. V.; Xu, J.; Raymond, K. N.; Durbin, P. Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4207-4282.
- (11) Taylor, G. N.; Lloyd, R. D.; Mays, C. W. Liver Cancer Induction by ²³⁹Pu, ²⁴¹Am, and Thorotrast in the Grasshopper Mouse, *Onychomys Leukogaster*. *Health Phys.* **1993**, *64*, 141-146.
- (12) Domingo, J. L.; Llobet, J. M.; Tomas, J. M.; Corbella, J. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1987**, *39*, 168-174.
- (13) GA, J. Gulf War syndrome--a model for the complexity of biological and environmental interaction with human health. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* **1998**, *17*, 1-17.
- (14) Radulescu, A.; Boia, E. S.; Iacob, R. E. Depleted Uranium induced fatal malformations-Literature review. *Jurnalul Pediatriei* **2006**, 56-60.
- (15) Vicente-Vicente, L.; Quiros, Y.; Pérez-Barriocanal, F.; López-Novoa, J. M.; López-Hernández, F. J.; Morales, A. I. Nephrotoxicity of Uranium: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Perspectives. *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 324-347.
- (16) Leggett, R. W.; Harrison, J. D. Fractional Absorption of Ingested Uranium in Humans. *Health Phys.* **1995**, *68*, 484-498.
- (17) Durbin, P. W. Actinides in Animals and Man. In *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*; Springer, **2008**, 3339-3440.
- (18) Scapolan, S.; Ansoborlo, E.; Moulin, C.; Madic, C. Investigations by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl-phosphate species: application to blood serum. *J. Alloys and Compd.* **1998**, *271-273*, 106-111.
- (19) Leggett, R. W.; Pellmar, T. C. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J. Environ. Radioact.* **2003**, *64*, 205-225.
- (20) Taylor, D. M.; Taylor, S. K. Environmental Uranium and Human Health. *Rev. Environ. Health* **1997**, *12*, 147-158.
- (21) Ubios, A. M.; Guglielmotti, M. B.; Steimetz, T.; Cabrini, R. L. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ. Res.* **1991**, *54*, 17-23.
- (22) Miller, A. C.; Blakely, W. F.; Livengood, D.; Whittaker, T.; Xu, J.; Ejnik, J. W.; Hamilton, M. M.; Parlette, E.; John, T. S.; Gerstenberg, H. M.; Hsu, H. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106*, 465-471.

- (23) Lestaevel, P.; Bussy, C.; Paquet, F.; Dhieux, B.; Clarençon, D.; Houpert, P.; Gourmelon, P. Changes in sleep–wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicology and Teratology* **2005**, *27*, 835–840.
- (24) Ortega, A.; Domingo, J. L.; Llobet, J. M.; Tomas, J. M.; Paternain, J. L. Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1989**, *42*, 935–941.
- (25) Zamora, M. L.; Tracy, B. L.; Zielinski, J. M.; Meyerhof, D. P.; Moss, M. A. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol. Sci.* **1998**, *43*, 68–77.
- (26) Kurttio, P.; Auvinen, A.; Salonen, L.; Saha, H.; Pekkanen, J.; Mäkeläinen, I.; Väisänen, S. B.; Penttilä, I. M.; Komulainen, H. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 337–342.
- (27) Magdo, H. S.; Forman, J.; Graber, N.; Newman, B. Grand rounds : nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water. *Environ. health perspect.* **2007**, *115*, 1237–1241.
- (28) Diamond, G. L.; Morrow, P. E.; Panner, B. J.; Gelein, R. M.; Baggs, R. B. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1989**, *13*, 65–78.
- (29) Sun, D. F.; Fujigaki, Y.; Fujimoto, T.; Goto, T.; Yonemura, K.; Hishida, A. Relation of Distal Nephron Changes to Proximal Tubular Damage in Uranyl Acetate-Induced Acute Renal Failure in Rats. *Am. J. Nephrol.* **2002**, *22*, 405–416.
- (30) Gilman, A. P.; Villeuve, D. C.; Secours, V. E.; Yagminas, A. P.; Tracy, B. L.; Quinn, J. M.; Valli, V. E.; Willes, R. J.; Moss, M. A. Uranyl Nitrate: 28-Day and 91-Day Toxicity Studies in the Sprague-Dawley Rat. *Toxicol. Sci.* **1998**, *41*, 117–128.
- (31) Wrenn, M. E.; Durbin, P. W.; Howard, B.; Lipsztein, J.; Rundo, J.; Still, E. T.; Willis, D. L. Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys.* **1985**, *48*, 601–633.
- (32) Muller, D.; Houpert, P.; Cambar, J.; Hengé-Napoli, M.-H. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicol. App. Pharmacol.* **2006**, *214*, 166–177.
- (33) Leggett, R. W. The Behavior and Chemical Toxicity of U in the Kidney: A Reassessment. *Health Phys.* **1989**, *57*, 365–383.
- (34) Wagner, S. E.; Burch, J. B.; Bottai, M.; Pinney, S. M.; Puett, R.; Porter, D.; Vena, J. E.; Hébert, J. R. Hypertension and hematologic parameters in a community near a uranium processing facility. *Environ. Res.* **2010**, *110*, 786–797.
- (35) Tissandie, E.; Guéguen, Y.; Lobaccaro, J. M. A.; Paquet, F.; Aigueperse, J.; Souidi, M. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 473–480.
- (36) Vidaud, C.; Bourgeois, D.; Meyer, D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1161–1175.
- (37) Fuller, C. C.; Bargar J. R.,; Davis, J. A. Piana, M. J. Mechanisms of Uranium Interactions with Hydroxyapatite: Implications for Groundwater Remediation. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 158–165.
- (38) Fuller, C. C.; Bargar J. R.,; Davis, J. A. Molecular-Scale Characterization of Uranium Sorption by Bone Apatite Materials for a Permeable Reactive Barrier Demonstration. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 4642–4649.
- (39) Locock, J. A.; Burns, C. P. The crystal structure of synthetic autunite, $\text{Ca}[(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)]_2(\text{H}_2\text{O})_{11}$. *Am. Mineral.* **2003**, *88*, 240–244.
- (40) Locock, J. A.; Burns, C. P. Monovalent cations in structures of meta-autunite group. *Can. Mineral.* **2004**, *42*, 973–996.
- (41) Clavier, N.; Crétaz, F.; Szenknect, S.; Mesbah, A.; Poinssot, C.; Descostes, M.; Dacheux, N. Vibrational spectroscopy of synthetic analogues of ankoleite, chernikovite and intermediate solid solution. *Spectrochim. Acta Part A.* **2016**, *156*, 143–150.
- (42) Kurttio, P.; Komulainen, H.; Leino, A.; Salonen, L. Bone as a Possible Target of Chemical Toxicity of Natural Uranium in Drinking Water. *Environ. health perspect.* **2005**, *113*, 68–72.

- (43) Gritsaenko, T.; Pierrefite-Carle, V.; Lorivel, T.; Breuil, V.; Carle, G. F.; Santucci-Darmanin, S. Natural uranium impairs the differentiation and the resorbing function of osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **2017**, *1861*, 715–726.
- (44) Tasat, D. R.; Orona, N. S.; Mandalunis, P. M.; Cabrini, R. L.; Ubios, A. M. Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch. Toxicol.* **2007**, *81*, 319–326.
- (45) Bozal, C. B.; Martinez, A. B.; Cabrini, R. L.; Ubios, A. M. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) on endochondral ossification lesions induced by a lethal oral dose of uranyl nitrate. *Arch. Toxicol.* **2005**, *79*, 475–481.
- (46) Milgram, S.; Carriere, M.; Thiebault, C.; Malaval, L.; Gouget, B. Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* **2008**, *250*, 62–69.
- (47) Pierrefite-Carle, V.; Santucci-Darmanin, S.; Breuil, V.; Gritsaenko, T.; Vidaud, C.; Creff, G.; Solari, P. L.; Pagnotta, S.; Al-Sahlane, R.; Auwer, Den, C.; Carle, G. F. Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch. Toxicol.* **2016**, *91*, 1903–1914.
- (48) Safi, S.; Creff, G.; Jeanson, A.; Qi, L.; Basset, C.; Roques, J.; Solari, P. L.; Simoni, E.; Vidaud, C.; Auwer, Den, C. Osteopontin: a uranium phosphorylated binding-site characterization. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 11261–11269.
- (49) Qi, L.; Basset, C.; Averseng, O.; Quéméneur, E.; Hagège, A.; Vidaud, C. Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics* **2013**, *6*, 166–176.
- (50) Guéguen, Y.; Souidi, M.; Baudelin, C.; Dudoignon, N.; Grison, S.; Dublineau, I.; Marquette, C.; Voisin, P.; Gourmelon, P.; Aigueperse, J. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 187–195.
- (51) Lemercier, V.; Millot, X.; Ansoborlo, E.; Ménétrier, F.; Flüry-Hérard, A.; Rousselle, C.; Scherrmann, J. M. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* **2003**, *105*, 243–245.
- (52) Barber, D. S.; Ehrich, M. F.; Jortner, B. S. The Effect of Stress on the Temporal and Regional Distribution of Uranium in Rat Brain after Acute Uranyl Acetate Exposure. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* **2011**, *68*, 99–111.
- (53) Abou-Donia, M. B.; Dechkovskaia, A. M.; Goldstein, L. B.; Shah, D. U.; Bullman, S. L.; Khan, W. A. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *72*, 881–890.
- (54) Jiang, G. C. T.; Aschner, M. Neurotoxicity of depleted uranium. *Biol. Trace Elem. Res.* **2006**, *110*, 1–17.
- (55) Paternain, J. L.; Domingo, J. L.; Ortega, A.; Llobet, J. M. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1989**, *17*, 291–296.
- (56) Lehmann, M.; Culig, H.; Taylor, D. M. Identification of Transferrin as the Principal Plutonium-binding Protein in the Blood Serum and Liver Cytosol of Rats: Immunological and Chromatographic Studies. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **2009**, *44*, 65–74.
- (57) Miller, S. C.; Lloyd, R. D.; Bruenger, F. W.; Krahenbuhl, M. P.; Polig, E.; Romanov, S. A. Comparisons of the skeletal locations of putative plutonium-induced osteosarcomas in humans with those in beagle dogs and with naturally occurring tumors in both species. *Radiat. Res.* **2003**, *160*, 517–523.
- (58) Leggett, R. W. A Model of the Retention, Translocation and Excretion of Systemic Pu. *Health Phys.* **1985**, *49*, 1115–1137.
- (59) Liu, Z.; Lee, T. S.; Kotek, T. J. Mortality among workers in a thorium-processing plant — a second follow-up. *Scand. J. Work Environ. Health* **1992**, *18*, 162–168.
- (60) Polednak, A. P.; Stehney, A. F.; Lucas, H. F. Mortality Among Male Workers at a

- Thorium-processing Plant. *Health Phys.* **1983**, *44*, 239-351.
- (61) McDiarmid, M. A.; Gaitens, J. M.; Squibb, K. S. Uranium and Thorium, In *Patty's Toxicology*. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. **2012**, , 769–816.
- (62) Vaughan, J.; Bleaney, B.; Taylor, D. M. Distribution, Excretion and Effects of Plutonium as a Bone-Seeker. In *Uranium · Plutonium Transplutonic Elements*. H.C. Hodge *et al.* (eds). Springer-Verlag/Berlin Heidelberg, **1973**; 349–502.
- (63) Koshurnikova, N. A.; Gilbert, E. S.; Sokolnikov, M.; Khokhryakov, V. F.; Miller, S.; Preston, D. L.; Romanov, S. A.; Shilnikova, N. S.; Suslova, K. G.; Vostrotin, V. V. Bone Cancers in Mayak Workers. *Radiat. Res.* **2000**, *154*, 237-245.
- (64) Wronski, T. J.; Smith, J. M.; Jee, W. S. S. The Microdistribution and Retention of Injected ²³⁹Pu on Trabecular Bone Surfaces of the Beagle: Implications for the Induction of Osteosarcoma. *Radiat. Res.* **1980**, *83*, 74-89.
- (65) Peacocke, A. R.; Williams, P. A. Binding of Calcium, Yttrium and Thorium to a Glycoprotein from Bovine Cortical Bone. *Nature* **1966**, *211*, 1140–1141.
- (66) Creff, G.; Safi, S.; Roques, J.; Michel, H.; Jeanson, A.; Solari, P. L.; Basset, C.; Simoni, E.; Vidaud, C.; Auwer, Den, C. Actinide(IV) Deposits on Bone: Potential Role of the Osteopontin–Thorium Complex. *Inorg. Chem.* **2015**, *55*, 29–36.
- (67) Jee, W. S. S.; Dockum, N. L.; Mical, R. S.; Arnold, J. S.; Looney, W. B. Distribution of thorium daughters in bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1967**, *145*, 660–673.
- (68) Omar, R. Z.; Barber, J. A.; Smith, P. G. Cancer mortality and morbidity among plutonium workers at the Sellafield plant of British Nuclear Fuels. *Br. J. C.* **1999**, *79*, 1288–1301.
- (69) Gilbert, E. S.; Koshurnikova, N. A.; Sokolnikov, M.; Khokhryakov, V. F.; Miller, S.; Preston, D. L.; Romanov, S. A.; Shilnikova, N. S.; Suslova, K. G.; Vostrotin, V. V. Liver cancers in Mayak workers. *Radiat. Res.* **2000**, *154*, 246–252.
- (70) Cologne, J. B.; Tokuoka, S.; Beebe, G. W.; Fukuhara, T.; Mabuchi, K. Effects of Radiation on Incidence of Primary Liver Cancer among Atomic Bomb Survivors. *Radiat. Res.* **1999**, *152*, 364-373.
- (71) Taylor, G. N.; Lloyd, R. D.; Mays, C. W.; Angus, W.; Miller, S. C.; Shabestari, L.; Hahn, F. F. Plutonium- Or Americium-induced Liver Tumors and Lesions in Beagles. *Health Phys.* **1991**, *61*, 337-347.
- (72) Bruenger, F. W.; Stover, B. J.; Stevens, W. ²³⁹Pu(IV): Its Subcellular Distribution and Association with Ferritin in the Canine Liver. *Health Phys.* **1971**, *21*, 679-687.
- (73) Bruenger, F. W.; Stover, B. J.; Stevens, W.; Atherton, D. R. Exchange of ²³⁹Pu(IV) Between Transferrin and Ferritin *in vitro*. *Health Phys.* **1969**, *16*, 339-340.
- (74) Bruenger, F. W.; Stevens, W.; Atherton, D. R.; Grube, B. J. Subcellular distribution of some actinide elements in the beagle liver. In *Health effects of plutonium and radium*. **1976** Webster, S.S. (ed.), 211-221.
- (75) Stover, B. J.; Atherton, D. R.; Buster, D. S. Retention of ²³⁹Pu(IV) in the beagle. In *Radiobiology of Plutonium*; Betsy J. (ed.), 1972, 149-169.
- (76) Priest, N. D.; Haines, J. W. The Release of Plutonium from Macrophages in Rats: The Effect of Changes in Iron Status. *Health Phys.* **1982**, *42*, 415-423.
- (77) Ballou, J. E.; Hess, J. O. Biliary Plutonium Excretion in the Rat. *Health Phys.* **1972**, *22*, 369.
- (78) Bruenger, F. W.; Stevens, W.; Atherton, D. R.; Roswell, R. L.; Smith, J. M. Biological mechanisms and translocation kinetics of particulate plutonium. In *Actinides in man and animals*. M.E. (ed.); **1981**, 413-426.
- (79) Voelz, G. L.; Lawrence, J. N. P. A 42-y Medical Follow-up of Manhattan Project Plutonium Workers. *Health Phys.* **1991**, *61*, 181-190.
- (80) Schubert, J. Treatment of Plutonium Poisoning by Metal Displacement. *Science* **1947**, *105*, 389–390.
- (81) Weikel, J.; Lorenz, E. Excretion of Radium from the Mouse. *Radiology* **1948**, 865-870.
- (82) Hursh, J. B. Effect of BAL on Survival of Rats after Lethal Doses of Polonium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1951**, 210–212.
- (83) Schubert, J. Removal of radioelements from the mammalian body. *Annu. Rev. Nuc. Sci.* **1955**, *5*, 369-412

- (84) Harry, K.; Joseph, A.; Corp, G. C. Chelated iron compositions. *US2891854 A* **1959**.
- (85) Smith, V. H. Removal of internally deposited plutonium. *Nature* **1958**, *181*, 1792–1793.
- (86) Foreman, H. The Effect of Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) on Acceleration of Excretion of Actinide Elements. *Health Phys.* **1962**, *8*, 735-737.
- (87) Durbin, P. W.; Kullgren, B.; Ebbe, S. N.; Xu, J.; Raymond, K. N. Chelating agents for uranium(VI): 2. Efficacy and toxicity of tetradentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands in mice. *Health Phys.* **2000**, *78*, 511–521.
- (88) Ansoborlo, R.; Amekraz, B.; Moulin, C.; Moulin, V. R.; Taran, F. D. R.; Bailly, T. O.; Burgada, R.; Heng Napoli, M.-H. L. N.; Jeanson, A. L.; Auwer, Den, C.; Bonin, L.; Moisy, P. Review of actinide decorporation with chelating agents. *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 1010–1019.
- (89) Nitsche, H.; Becraft, K. The complexation behavior of neptunium and plutonium with nitrilotriacetic acid. *ES Division Report LBL-28821* **1990**. / May, P. M.; Williams, D. R. Computer simulation of chelation therapy. *FEBS letters* **1977**, *78*, 134–138.
- (90) Aupiais, J.; Bonin, L.; Auwer, Den, C.; Moisy, P.; Siberchicot, B.; Topin, S. On the use of speciation techniques and ab initio modelling to understand tetravalent actinide behavior in a biological medium: An IV DTPA case. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3759–3770.
- (91) Durbin, P. W.; Kullgren, B.; Xu, J.; Raymond INVITED, K. N. Development of Decorporation Agents for the Actinides. *Radiat. Prot. Dosim.* **1998**, *79*, 433–443.
- (92) Phan, G.; Herbet, A.; Cholet, S.; Benech, H.; Deverre, J.-R.; Fattal, E. Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation. *J. Control. Release* **2005**, *110*, 177–188.
- (93) Ramounet-Le Gall, B.; Grillon, G.; Rataeu, G.; Burgada, R.; Bailly, T.; Fritsch, P. Comparative decorporation efficacy of 3,4,3-LIHOPO, 4,4,4-LIHOPO and DTPA after contamination of rats with soluble forms of ²³⁸Pu and ²³³U. *Radiat Prot Dosim.* **2003**, *105*, 535–538.
- (94) Seidel, A.; Volf, V. Removal of Internally Deposited Transuranium Elements by Zn-DTPA. *Health Phys.* **1972**, *22*, 779-783.
- (95) Houpert, P.; Muller, D.; Chazel, V.; Claraz, M.; Paquet, F. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat Prot Dosimetry* **2003**, *105*, 517–520.
- (96) Tymen, H.; Schoulz, D.; Caire-Maurisier, A. M.; Chevrier, F.; Curet, P. M. Traitement d'urgence des contaminations internes par les transuraniens. Une nouvelle forme galénique du Na₃CaDTPA micronisé. *Radioprotection* **2000**, *35*, 473–485.
- (97) Yamada, Y.; Koizumi, A.; Fukuda, S. Aerosolization of a Chelating Agent, Ca-DTPA, for Emergent Inhalation Therapy. *J. Health Phys.* **1997**, *32*, 167–172.
- (98) Stather, J. W.; Stradling, G. N.; Smith, H.; Payne, S.; James, A. C.; Strong, J. C.; Ham, S.; Sumner, S.; Bulman, R. A.; Hodgson, A.; Towndrow, C.; Ellender, M. Decorporation of ²³⁸PuO₂ from the hamster by inhalation of chelating agents. *Health Phys.* **1982**, *42*, 520–525.
- (99) Van der Meeren, A.; Moureau, A.; Laurent, D.; Laroche, P.; Angulo, J. F. *In vitro* assessment of plutonium uptake and release using the human macrophage-like THP-1 cells. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *37*, 25–33.
- (100) Bulman, R. A.; Griffin, R. J.; Russell, A. T. An examination of some complexing agents for ability to remove intracellularly deposited plutonium. *Health Phys.* **1979**, *37*, 729–734.
- (101) Miller, S. C.; Bruenger, F. W.; Kuswik-Rabiega, G.; Lloyd, R. D. Decorporation of plutonium by oral administration of a partially lipophilic polyaminocarboxylic acid. *Health Phys.* **1992**, *63*, 195–197.
- (102) Miller, S. C.; Bruenger, F. W.; Kuswik-Rabiega, G.; Liu, G.; Lloyd, R. D. Duration and dose-related effects of an orally administered, partially lipophilic polyaminocarboxylic acid on the decorporation of plutonium and americium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 548–554.
- (103) Sueda, K.; Sadgrove, M. P.; Huckle, J. E.; Leed, M. G. D.; Weber, W. M.; Doyle Eisele, M.; Guilmette, R. A.; Jay, M. Orally Administered DTPA Penta-Ethyl Ester for the Decorporation of Inhaled ²⁴¹Am. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 1563–1571.
- (104) Bruenger, F. W.; Kuswik-Rabiega, G.; Miller, S. C. Decorporation of aged americium

- deposits by oral administration of lipophilic polyamino carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 112–118.
- (105) Miller, S. C.; Wang, X.; Bowman, B. M. Pharmacological properties of orally available, amphipathic polyaminocarboxylic acid chelators for actinide decorporation. *Health Phys.* **2010**, *99*, 408–412.
- (106) Reddy, J. D.; Cobb, R. R.; Dungan, N. W.; Matthews, L. L.; Aiello, K. V.; Ritter, G.; Eppler, B.; Kirk, J. F.; Abernethy, J. A.; Tomisaka, D. M.; Talton, J. D. Preclinical toxicology, pharmacology, and efficacy of a novel orally administered diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) formulation. *Drug Dev. Res.* **2012**, *73*, 232–242.
- (107) Wilson, J. P.; Cobb, R. R.; Dungan, N. W.; Matthews, L. L.; Eppler, B.; Aiello, K. V.; Curtis, S.; Boger, T.; Guilmette, R. A.; Weber, W.; Doyle Eisele, M.; Talton, J. D. Decorporation of systemically distributed americium by a novel orally administered diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) formulation in beagle dogs. *Health Phys.* **2015**, *108*, 308–318.
- (108) Rahman, Y. E.; Rosenthal, M. W.; Cerny, E. A. Intracellular plutonium: removal by liposome-encapsulated chelating agent. *Science* **1973**, *180*, 300–302.
- (109) Rahman, Y. E.; Rosenthal, M. W.; Cerny, E. A.; Moretti, E. S. Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents. *J. Lab. Clin. Med.* **1974**, *83*, 640–647.
- (110) Blank, M. L.; Byrd, B. L.; Cress, E. A.; Washburn, L. C.; Snyder, F. Liposomal preparations of calcium- or zinc-DTPA have a high efficacy for removing colloidal Ytterbium-169 from rat tissues. *Toxicology* **1984**, *30*, 275–281.
- (111) Phan, G.; Ramounet-Le Gall, B.; Manceau, J.; Fanet, M.; Benech, H.; Fritsch, P.; Fattal, E.; Deverre, J. R. Targeting of diethylene triamine pentaacetic acid encapsulated in liposomes to rat liver: an effective strategy to prevent bone deposition and increase urine elimination of plutonium in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* **2004**, *80*, 413–422.
- (112) Phan, G.; Le Gall, B.; Grillon, G.; Ruit, E.; Fouillit, M.; Benech, H.; Fattal, E.; Deverre, J. R. Enhanced decorporation of plutonium by DTPA encapsulated in small PEG-coated liposomes. *Biochimie* **2006**, *88*, 1843–1849.
- (113) Phan, G.; Le Gall, B.; Deverre, J.-R.; Fattal, E.; Benech, H. Predicting plutonium decorporation efficacy after intravenous administration of DTPA formulations: study of pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships in rats. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2030–2035.
- (114) Deblonde, G. J.-P.; Sturzbecher-Hoehne, M.; Abergel, R. J. Solution thermodynamic stability of complexes formed with the octadentate hydroxypyridinonate ligand 3,4,3-LI(1,2-HOPO): a critical feature for efficient chelation of lanthanide(IV) and actinide(IV) ions. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8805–8811.
- (115) Paquet, F.; Montegue, B.; Ansoborlo, E.; Hengé-Napoli, M.-H.; Houpert, P.; Durbin, P. W.; Raymond, K. N. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing neptunium retention in the rat after simulated wound contamination. *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *76*, 113–117.
- (116) Kullgren, B.; Jarvis, E. E.; An, D. D.; Abergel, R. J. Actinide chelation: biodistribution and *in vivo* complex stability of the targeted metal ions. *Toxicol. Mech. Methods* **2012**, *23*, 18–26.
- (117) Durbin, P. W.; Kullgren, B.; Xu, J.; Raymond, K. N. New agents for *in vivo* chelation of uranium(VI): efficacy and toxicity in mice of multidentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands. *Health Phys.* **1997**, *72*, 865–879.
- (118) Ohmachi, Y.; Imamura, T.; Ikeda, M.; Shishikura, E.; Kim, E.; Kurihara, O.; Sakai, K. Sodium bicarbonate protects uranium-induced acute nephrotoxicity through uranium-decorporation by urinary alkalization in rats. *J. Toxicol. Pathol.* **2015**, *28*, 65–71.
- (119) Ubios, A. M.; Braun, E. M.; Cabrini, R. L. Lethality Due to Uranium Poisoning Is Prevented by Ethane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP). *Health Phys* **1994**, *66*, 540.
- (120) Martinez, A. B.; Cabrini, R. L.; Ubios, A. M. Orally administered ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate reduces the lethal effect of oral uranium poisoning. *Health Phys* **2000**, *78*, 668.

- (121) Sawicki, M.; Lecercelé, D.; Grillon, G.; Le Gall, B.; Sérandour, A.-L.; Poncy, J.-L.; Bailly, T.; Burgada, R.; Lecouvey, M.; Challeix, V.; Leydier, A.; Pellet-Rostaing, S.; Ansoborlo, E.; Taran, F. Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for *in vitro* and *in vivo* uranium(VI) chelation. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2768–2777.
- (122) Starck, M.; Laporte, F. A.; Oros, S.; Sisommay, N.; Gathu, V.; Solari, P. L.; Creff, G.; Roques, J.; Auwer, Den, C.; Lebrun, C.; Delangle, P. Cyclic phosphopeptides to rationalize the role of phosphoamino acids in uranyl binding to biological targets. *Eur. J. Chem.* **2017**, *23*, 5281–5290.
- (123) Starck, M.; Sisommay, N.; Laporte, F. A.; Oros, S.; Lebrun, C.; Delangle, P. Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 11557–11562.

Chapitre II : Projet, Stratégie de décorporation macromoléculaire des actinides

A Agents chélatants macromoléculaires : Une stratégie de décorporation des actinides originales

Les stratégies de décorporation des actinides mises en place depuis la fin des années 40 se basent exclusivement sur l'optimisation de l'affinité entre le cation et le ligand pour augmenter le taux d'excrétion de l'actinide. Ainsi de nombreuses molécules ont été développées en modulant les fonctions chimiques et les structures. Cette façon d'augmenter l'efficacité des agents chélatants a été pertinente et a permis l'adoption du DTPA pour traiter des cas de contamination avec des actinides (IV), ainsi que la découverte des fonctions HOPO et CAM, mimes de sidérophores, qui sont particulièrement bien adaptées pour la complexation du plutonium (IV). Aujourd'hui les connaissances accumulées sur la biodistribution des actinides et des molécules chélatantes permettent de dire qu'un maximum d'efficacité a été atteint avec cette stratégie. En effet, les agents chélatants utilisés (DTPA) ou envisagés (1,4,3-Li(1,2-HOPO)) augmentent l'excrétion des actinides (IV) solubles circulant dans le sang mais n'atteignent pas les actinides retenus dans les organes ou hors du système sanguin. Pour dépasser cette limite d'efficacité de décorporation, il faut développer des solutions pour décorporer les actinides retenus hors du système sanguin.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les meilleurs agents chélatants qui ont été testés en phase clinique, par exemple, le sel calcique de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (Ca-DTPA), fonctionnent d'autant mieux qu'ils sont administrés à l'aide d'un système de délivrance. Cependant la biodisponibilité ainsi que le ciblage spécifique des formulations restent à améliorer. En effet, il apparaît clairement que le foie, les poumons, les reins et les os constituent des compartiments de rétention particulièrement difficiles à atteindre après une contamination par des radionucléides.

La vectorisation de chélates décorporants et leur biodisponibilité au niveau de ces organes cibles sont donc des enjeux majeurs mais qui sont cependant encore mal maîtrisées.

Les systèmes vecteurs (liposomes, nanoparticules, ...) sont maintenant reconnus comme de puissants outils pour le transport *in vivo* et la délivrance sélective dans des cellules cibles d'agents de contraste pour l'imagerie, et d'agents chimiothérapeutiques très divers. En augmentant la biodisponibilité du principe actif ainsi que la concentration dans les tissus cibles, c'est l'efficacité thérapeutique qui est accrue. Ces nanovecteurs ont permis des percées incontestables dans le diagnostic et le traitement de certains cancers par exemple. Cependant, leur utilisation clinique par voie orale (pulmonaire ou digestive) reste très limitée.

Quelle que soit la voie d'internalisation et la biodistribution ciblées, il est fondamental de formuler des systèmes vecteurs nanométriques dont la taille n'excède pas les 50-100 nm afin d'améliorer leur diffusion dans les différents fluides biologiques. Il est également indispensable de cibler les compartiments de stockage biologiques des radionucléides aussi bien au niveau des organes de rétention (poumons, foie, squelette) mais également au niveau cellulaire. Enfin, la stratégie développée doit présenter une toxicité limitée et être industriellement accessible (technique et coût).

Les enjeux économiques et sociétaux concernant le développement de nouveaux agents de décorporation, ou l'amélioration des composés actuels, qui répondent aux critères mentionnés (voie d'administration, biodisponibilité, ciblage, toxicité et coût) apparaissent donc considérables tant du point de vue civil (accidents liés à l'industrie du nucléaire) que militaire (domaine de la défense, guerre, terrorisme).

Ce projet de thèse explore une stratégie de fonctionnalisation macromoléculaire pour vectoriser les agents chélatants vers les compartiments de rétention des actinides et tenter d'améliorer leur biodistribution et excrétion (Figure 20).



Figure 20 : Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides.

Une approche macromoléculaire assure une **vectorisation** des chélates *via* un ciblage indirect des grands organes (poumons, foie, reins ...) par piégeage (effet de taille et adsorption physico-chimique). D'autre part, cela permet d'activer la phagocytose par les macrophages (particulièrement nombreux autour des grands organes) et d'assurer une pénétration intracellulaire massive contrairement à une utilisation de chélates qui, sous leur forme moléculaire, portent globalement une charge négative qui ne les prédispose pas à traverser les membranes cellulaires et donc à pénétrer des cellules. Ces différents compartiments se comportent, comme nous l'avons vu, comme de véritables sanctuaires vis-à-vis des actinides.

L'organisation macromoléculaire d'un décorporant devrait également se traduire par une augmentation considérable de sa **capacité** (nombre de sites séquestrants par unité de surface). Ceci pourrait permettre de pallier le manque de sélectivité chimique intrinsèque des fonctions chélatantes utilisées (carboxylate, hydroxypyridonate etc.) et d'obtenir un effet « cluster » qui devrait déplacer, en considérant l'unité monomérique, l'équilibre de complexation vers la forme chélatée.

Être capable, entre autres choses, de délivrer l'agent thérapeutique spécifiquement dans les lieux de rétention, représente une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité de chélation et *in fine* la décorporation des actinides. Les verrous principaux à lever pour mener à bien cette stratégie sont : le contrôle de la taille des objets qui doit être compatible avec une application biologique ; un taux de fonctionnalisation élevé (effet cluster) afin de bénéficier d'un taux intracellulaire important de fonctions chélates transportées.

Les structures du DTPA et du Li-HOPO, qui sont les deux agents chélatants des actinides les plus efficaces à ce jour, sont composées de fonctions chélatantes, carboxylates ou hydroxypyridinones, greffées sur un squelette polyaminé. Les fonctions carboxylate du DTPA s'articulent autour d'un squelette triéthylèneimine et les fonctions HOPO du Li-HOPO autour d'une spermine.

Le polyéthylèneimine ou PEI s'est ainsi vite imposé comme une matrice de fonctionnalisation logique pour greffer des fonctions chélatantes.

B Polyéthylèneimines fonctionnalisés par des fonctions complexantes

Le PEI peut se trouver sous plusieurs formes : linéaire (JetPEI), réticulé (bPEI) et dendrimérique. Il partage le même monomère, de type éthylèneimine dont le nombre d'hydrogènes dépend du degré de ramification de l'amine (I/II ou III) comme le montre la figure 21.

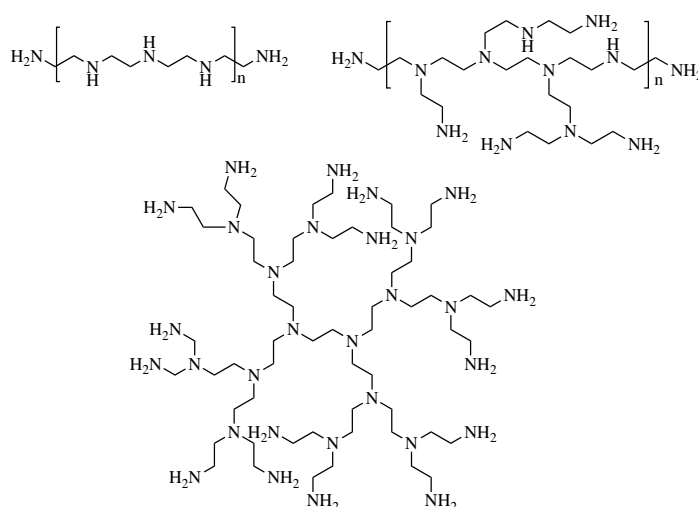


Figure 21 : Forme linéaire (JetPEI), réticulée (bPEI) et dendrimérique du PEI.

C'est la forte charge positive globale, provenant de ses groupements ammonium, qui confère au PEI une certaine toxicité à cause des interactions non spécifiques avec un bon nombre de constituants biologiques (membranes et protéines négatives entre autres).

Nous avons rapidement envisagé d'utiliser un polyéthylèneimine branché (bPEI) afin de préparer un analogue polymérique du DTPA et de sa version phosphonate pour étudier leur capacité à complexer l'uranium (VI) ainsi que le plutonium (IV). Il est à noter que cette fonctionnalisation avec des fonctions chélatantes négatives devrait réduire sa charge cationique globale et contribuer à diminuer les interactions non spécifiques. Ce polymère a été très largement étudié¹²⁴. Ses analogues méthylènes carboxylates¹²⁵ et méthylènes phosphonates¹²⁶ ont déjà fait l'objet d'études pour le piégeage de métaux lourds et de radioisotopes respectivement.

Même si le DTPA qui est utilisé actuellement dans le cadre d'une contamination au Pu, s'est montré peu efficace pour la décorporation de l'uranyle. Son analogue macromoléculaire, fonctionnalisé avec des groupements méthylène carboxylate ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$), appelé PEI-MC, pourrait permettre, en ciblant indirectement les grands organes qui constituent le siège de rétention de l'uranyle et du Pu, de pallier le

manque de contre mesures dans le cas de contamination par l'uranyle et d'améliorer, pour ces mêmes raisons, l'efficacité de décorporation du Pu (IV).

Le second polymère appelé PEI-MP utilise une fonctionnalisation par des groupements méthylène phosphonate ($-\text{CH}_2\text{PO}_3^{2-}$). Il a été envisagé en se basant sur l'affinité connue des phosphonates pour la matrice osseuse (à l'origine du développement des bis-phosphonates actuellement utilisés dans le traitement de l'ostéoporose), qui demeure un compartiment « sanctuaire » dans le cas d'une contamination au Pu.

La plupart des PEI branchés commerciaux présentent une répartition de leurs amines I/II/III proche de 33:33:33¹²⁷. Le squelette ramifié d'un PEI branché nous a semblé plus adapté à l'obtention d'une répartition de fonctionnalisation équilibrée des fonctions chélatantes. En effet, c'est la seule matrice qui permet, après fonctionnalisation, d'obtenir à la fois des groupements iminodiacétate ($-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$) (en périphérie) et iminoacétates ($-\text{N}(\text{CH}_2)\text{COO}^-$) de façon théoriquement équivalente).

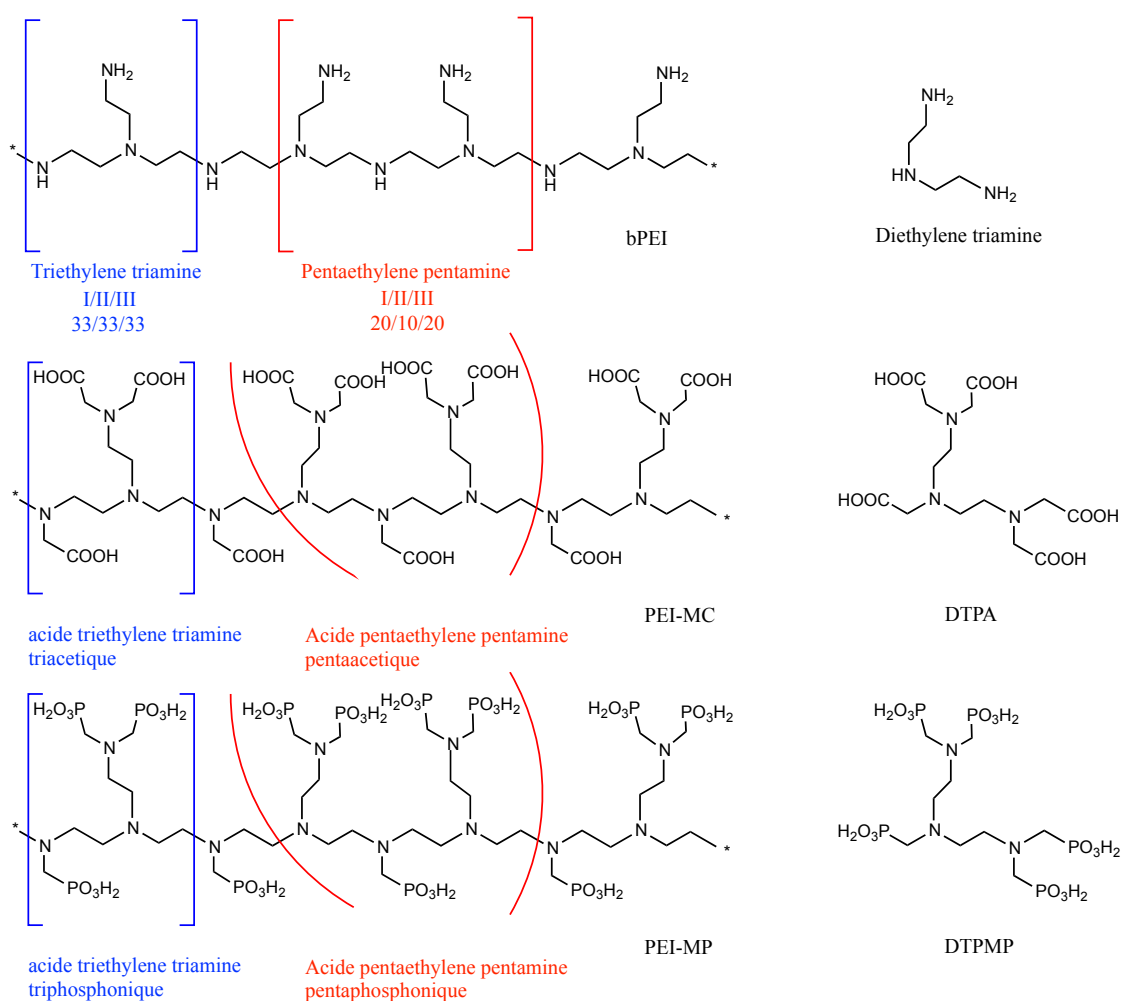


Figure 22 : Unités monomériques du bPEI (non fonctionnalisé), du PEI-MC et du PEI-MP (fonctionnalisé) en comparaison à leur dérivé moléculaire Diéthylènetriamine, DTPA et DTPMP.

Il est évident que l'unité monomérique de base du bPEI (Figure 22 en bleu), de type triéthylènetriamine branché (traduisant la répartition de type I/II/III ~ 33:33:33), ne constitue pas un homologue structurel du diéthylènetriamine linéaire du DTPA. En effet, une fois fonctionnalisée par des groupements chélatants de type méthylène carboxyliques, l'unité monomérique du polymère ne contiendra que trois fonctions chélatantes contre cinq pour le DTPA. La remarque serait équivalente si on considérait les dérivés phosphoniques du bPEI. Ce point fondamental sera à garder à l'esprit lors de l'évaluation de l'efficacité chélatante des versions polymériques.

On aurait pu, arbitrairement, considérer une unité monomérique supérieure, basée sur un squelette de type pentaéthylènepentamine (Figure 22 en rouge) qui traduirait une répartition des amines I/II/III de 20:10:20 plus en accord avec le nombre de fonctions chélatantes du DTPA.

Cependant, dans la suite du manuscrit, nous utiliserons les monomères basiques correspondants de formule brute $[C_6H_{15}N_3]_n$, $[C_{12}H_{21}N_3O_6]_n$, et $[C_9H_{24}N_3P_3O_9]_n$ issus de la répartition I/II/III ~ 33:33:33 pour décrire respectivement le bPEI de départ, le PEI-MC et le PEI-MP.

C Références

- (124) Jäger, M.; Schubert, S.; Ochrimenko, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4755–4767.
- (125) Masotti, A.; Giuliano, A.; Ortaggi, G. Efficient Complexation-Ultrafiltration Process for Metal Ions Removal from Aqueous Solutions Using a Novel Carboxylated Polyethylenimine Derivative (PEI-COOH). *CAC* **2010**, *6*, 37–42.
- (126) Jarvis, N. V.; Zeevaart, J. R.; Wagener, J. M.; Louw, W. K. A.; Dormehl, I. C.; Kilian, E.; Milner, R. J. Metal-ion speciation in blood plasma incorporating the water-soluble polymer, polyethylenimine functionalised with methylenephosphonate groups, in therapeutic radiopharmaceuticals : *Radiochimica Acta*. *Radiochim. Acta* **2002**, *90*, 237–246.
- (127) Harpe, von, A.; Petersen, H.; Li, Y.; Kissel, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J. Controlled Release* **2000**, *69*, 309–322.

Chapitre III : Polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC)

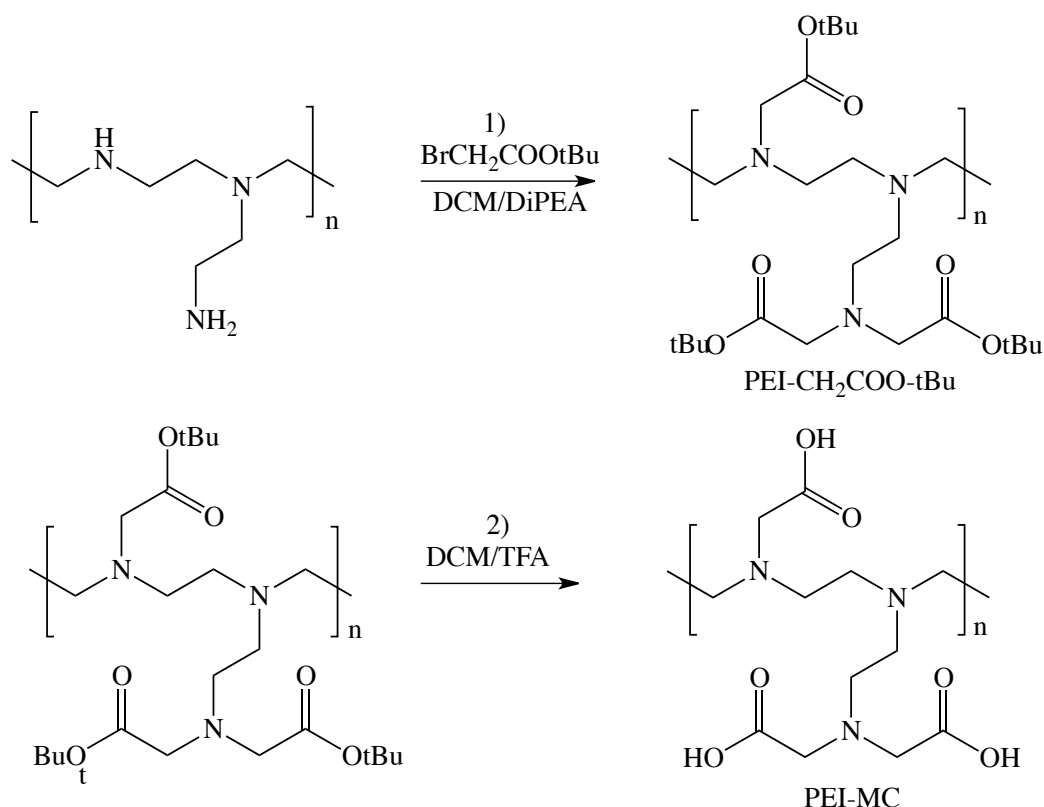
Le polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC) est issu de la fonctionnalisation du PEI par des groupements méthylène carboxylate. C'est un polymère soluble appartenant à la famille des polyaminocarboxylates qui peut complexer une large gamme de métaux lorsque ses fonctions acide carboxylique sont déprotonées. Cette affinité pour une grande variété de cations a été démontrée par Masotti *et al.* qui ont utilisé le PEI-MC pour extraire d'une solution les métaux qu'elle contenait (Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , ...) ¹²⁸. En milieu biologique, les fonctions acide carboxylique, qui ont des pKa de l'ordre de 3,5, se déprotonnent pour former des carboxylates qui développent de fortes affinités pour les actinides. A notre connaissance, aucune étude en rapport avec l'utilisation de PEI-MC pour la complexation d'actinides en milieu biologique ou physiologique antérieure à ce projet, n'a été publiée. Il en est de même pour les données relatives à la biodistribution et à la toxicologie du PEI-MC chez l'humain.

A Synthèse et caractérisation du PEI-MC

I Synthèse

Le PEI branché utilisé (bPEI, 25 kDa MW, Sigma-Aldrich), contient une distribution proche de 33:33:33, correspondant respectivement au pourcentage d'amines I, II et III. Pour ce type de bPEI, quelle que soit sa masse moléculaire moyenne, la formule brute traduisant cette répartition d'amines peut être écrite de la façon suivante $[(C_2H_6N)_{0,33} (C_2H_5N)_{0,33} (C_2H_4N)_{0,33}]_n$.

Le Polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC) a été synthétisé en deux étapes à partir du bPEI commercial (Figure 23). La première étape de synthèse consiste en une N-alkylation des amines I et II du bPEI produite par la substitution nucléophile du brome du bromoacétate de tertibutyle (1) pour aboutir au PEI-CH₂COO-tBu. Les fonctions ester tert-butyles sont ensuite hydrolysées en milieu acide (TFA) lors d'une deuxième étape pour générer le produit final (cf. Annexe II).



*Figure 23 : Schéma de synthèse du PEI-MC
 (Note : l'état de protonation des amines n'a pas été considéré)*

II Détermination du taux de fonctionnalisation

Le taux de fonctionnalisation a été estimé lors de la première étape par RMN du proton après purification du PEI-CH₂COO-tBu sur colonne d'exclusion stérique. Un spectre typique, présenté figure 24, comporte un pic à 1,38 ppm attribuable aux protons des groupements tert-butyle avec une intégration (H_{tBu}) et un massif de pics situé entre 2,2 et 5,2 ppm attribué aux protons des méthylènes du bPEI initial (CH₂-CH₂-N) et à ceux des méthylènes des fonctions greffées (N-CH₂-COOtBu) avec une intégration (H_{CH2}).

Considérant la répartition initiale [(C₂H₆N)_{0,33} (C₂H₅N)_{0,33} (C₂H₄N)_{0,33}]_n des amines du bPEI commercial ainsi qu'un taux de fonctionnalisation théorique de 100%, la formule du PEI-CH₂COOtBu peut s'écrire de la façon suivante : [(C₁₄H₂₆NO₄)_{0,33} (C₈H₁₅NO₂)_{0,33} (C₂H₄N)_{0,33}]_n. En effet, chaque amine I peut fixer deux ligands -CH₂COOtBu, chaque amine II un seul, tandis que les amines III restent non fonctionnalisées. Cette distribution permet donc de fixer un maximum de 0,99 motifs -CH₂COOtBu (2x0,33+0,33). Si une intégration de 8,91 H (0,99 x 9,9 étant le nombre de protons par groupement tBu) est attribuée au massif correspondant aux H_{tBu}, alors le massif correspondant aux H_{CH2} (CH₂ des amines I, II, III + CH₂COOtBu) doit théoriquement intégrer pour 5,94 H (1,98 CH₂ d'amines I, II, III et 0,99 CH₂COOtBu). Un rapport H_{tBu}/H_{CH2} de 1,5 correspond donc à un taux de fonctionnalisation théorique de 100%. Le taux de fonctionnalisation expérimental peut donc être calculé après intégration des massifs H_{tBu} et H_{CH2} à l'aide de l'équation 1 :

$$\frac{\left(\frac{H_{tBu}}{H_{CH2}}\right)_{exp} \times 100}{1,5} = \text{Taux de fonctionnalisation (\%)} \quad (\text{Équation 1})$$

Dans l'équation 1 le taux de fonctionnalisation du PEI-MC est exprimé en fonction de H_{tBu} qui correspond à l'intégration expérimentale des protons des groupements méthyle du tertbutyle et de H_{CH2} correspondant à l'intégration des protons des groupements méthylène des amines I, II, III + CH₂COOtBu.

Ce rapport d'intégration, établi à partir des spectres RMN ¹H issus des produits de la première étape, permet d'attribuer des taux de fonctionnalisation de l'ordre de 90 % (Figure 24).

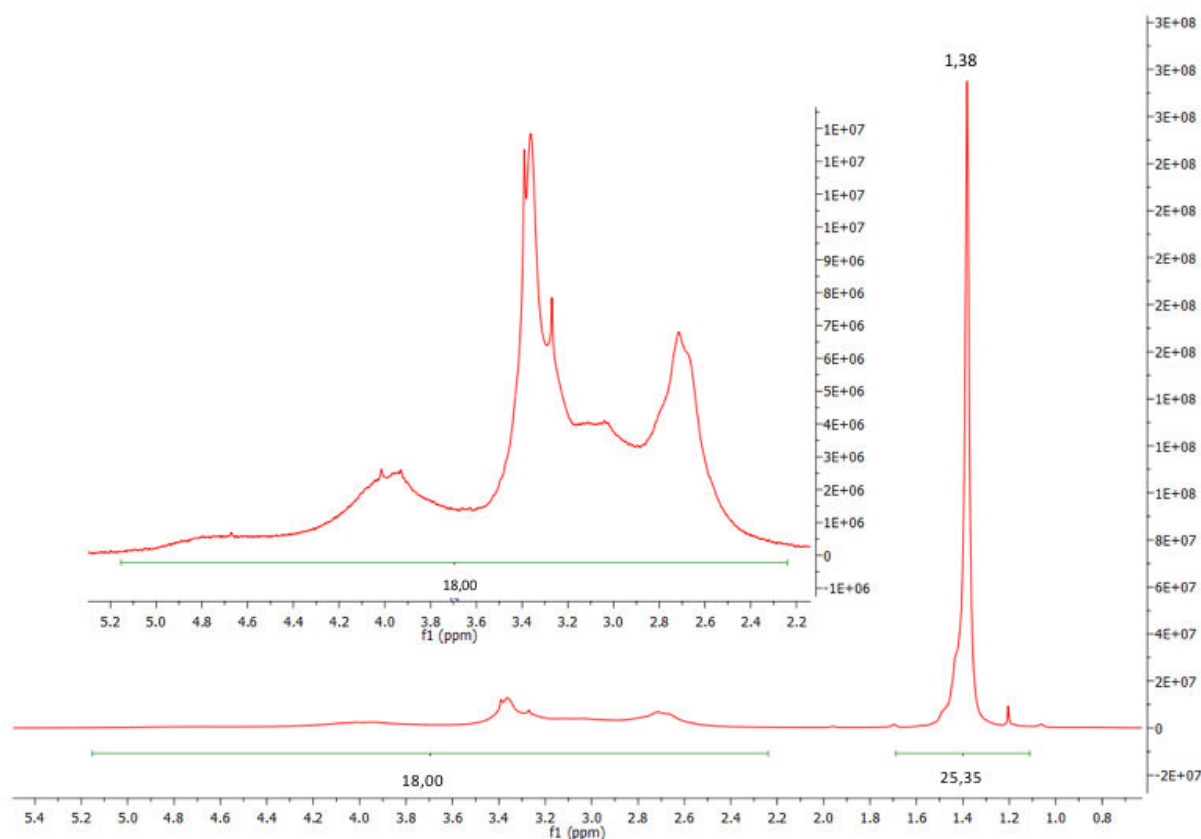


Figure 24 : RMN ^1H du PEI- $\text{CH}_2\text{COO-tBu}$

III Détermination du rendement d'hydrolyse des groupements ester

La déprotection totale des fonctions ester a également été suivie par RMN ^1H . Elle se traduit par la disparition du massif à 1,38 ppm des protons des groupements tert-butyle. (cf. Annexe II)

Après la déprotection des fonctions ester tert-butyles, le pH a été ramené à 7,0 avec de l'hydroxyde de sodium et le PEI-MC a été dialysé sous gradient de chlorure de sodium afin d'obtenir un PEI-MC sous forme de carboxylates (sels de sodium) compatible avec une utilisation en milieu biologique. Les ions chlorures présents en tant que contre-ions des fonctions ammonium ont été quantifiés par un dosage au sel de Mohr (cf. Annexe II). Environ un ion chlorure est présent par monomère de PEI-MC. Dans la suite de ce projet le monomère de PEI-MC sera alors défini par la formule brute $[(\text{C}_{11,2}\text{H}_{17,4}\text{N}_3\text{O}_{5,4}\text{Na}_{2,7})\text{Cl}]_n$ de masse $375,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ce monomère respectant la distribution de 33/33/33 des amines I, II et III ainsi que le taux de fonctionnalisation.

A l'issue de la déprotection des fonctions esters sur le bPEI-CH₂COO-tBu, une analyse infrarouge du PEI-MC a été effectuée à pH 7,0 (Figure 25). Les élongations antisymétriques $\nu_{as}(-\text{COO}^-)$ à 1596 cm⁻¹ et symétriques $\nu_s(-\text{COO}^-)$ à 1402 cm⁻¹ des fonctions carboxylate (déprotonées à pH 7,0) confirment leur hydrolyse totale. Les fonctions carboxylate présentent aussi une bande d'absorption à 1677 cm⁻¹ correspondant aux élongations des fonctions carbonyles $\nu(\text{C}=\text{O})$ ¹²⁹ et une bande d'absorption à 1183 cm⁻¹ correspondant aux vibrations des liaisons C-O. La bande d'absorption située à 1627 cm⁻¹ correspond aux vibrations des amines du polymère¹³⁰.

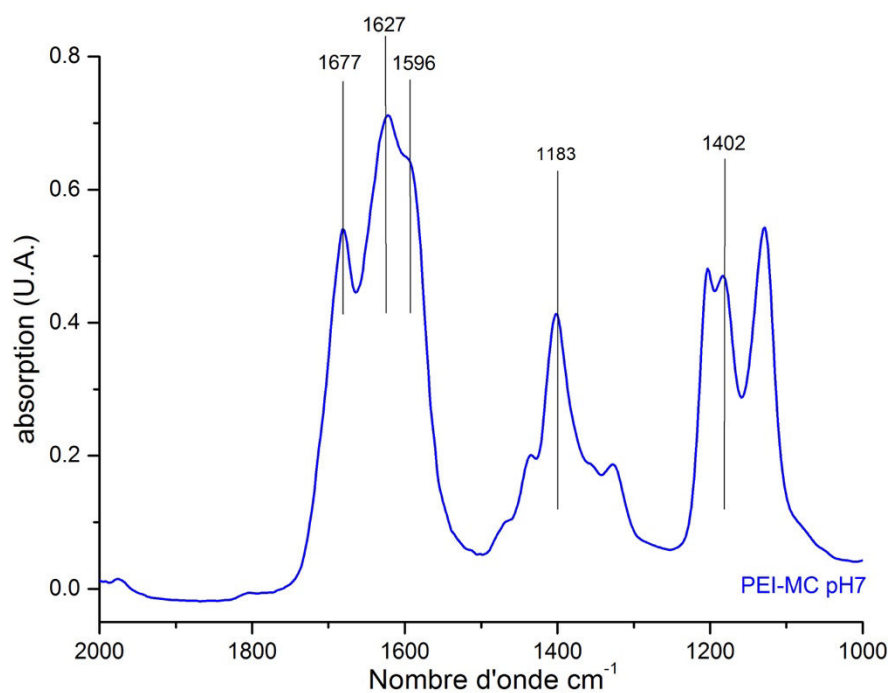


Figure 25: Spectre infrarouge du PEI-MC à pH 7,0.

B Caractérisation physico-chimique du complexe PEI-MC-UO₂

La caractérisation physico-chimique du complexe PEI-MC-U est indispensable pour évaluer la capacité de ce dernier à complexer l'uranyle en milieu biologique. Ainsi, la capacité maximale du PEI-MC en uranyle a été définie en traçant sa courbe de charge. L'implication supposée des fonctions carboxylate dans le processus de complexation a été confirmée par spectroscopie infrarouge (IR) et l'environnement atomique de l'uranium a été identifié par spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) et par dynamique moléculaire (DM). Pour des raisons expérimentales, le milieu biologique a été simplifié par une solution aqueuse de tampon salin trishydroxyméthylaminométhane (TBS) à pH 7,0 et des concentrations en uranyle de 10^{-4} M ont été sélectionnées pour permettre l'obtention d'un rapport signal sur bruit exploitable avec les techniques spectroscopiques utilisées. Les détails expérimentaux de chaque mesure et résultats sont décrits plus précisément dans la partie expérimentale (cf. Annexe).

I Courbe de charge du PEI-MC avec l'uranyle

La première étape de la caractérisation du système PEI-MC-U a été de définir, en milieu physiologique, la capacité de charge maximum du polymère avec l'uranyle. Pour cela, la fraction d'uranyle complexé par le PEI-MC a été quantifiée par ICP-OES, pour des équivalences uranyle : PEI-MC variant de 0 à 2. L'excès d'uranyle (non complexé) a été séparé par ultrafiltration.

a Influence du pH sur le système PEI-MC-U

D'un point de vue expérimental, il a été nécessaire de simplifier le milieu biologique en l'assimilant à une solution physiologique de TBS à pH 7,0 (force ionique fixée à 0,15 M). Dans ce milieu pseudo-physiologique, l'absence de protéines et autres métabolites, qui peuvent stabiliser les formes solubles de l'uranyle, peut entraîner la formation d'espèces hydrolysées insolubles de l'uranyle. Or pour l'élaboration de la courbe de charge la formation d'espèces hydrolysées de l'uranyle doit rester minoritaire pour pouvoir séparer l'uranyle libre du complexe PEI-MC-U par ultrafiltration.

- A pH 7,0 la simulation de la spéciation (JChess) présentée figure 26, pour une concentration d'uranyle fixée à 10^{-4} M, indique que la majorité de l'uranyle précipite et qu'il ne reste en solution qu'environ 27% de l'uranyle de départ sous la forme des espèces $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ (22%) et UO_2OH^+ (5%).

- A pH 5,0, cette même simulation indique qu'environ 60% de l'uranyle est en solution sous la forme d'espèces UO_2^{2+} (30%), UO_2OH^+ (8,4%), $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ (15%) et $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ (7%) et donc qu'environ 40% précipite.

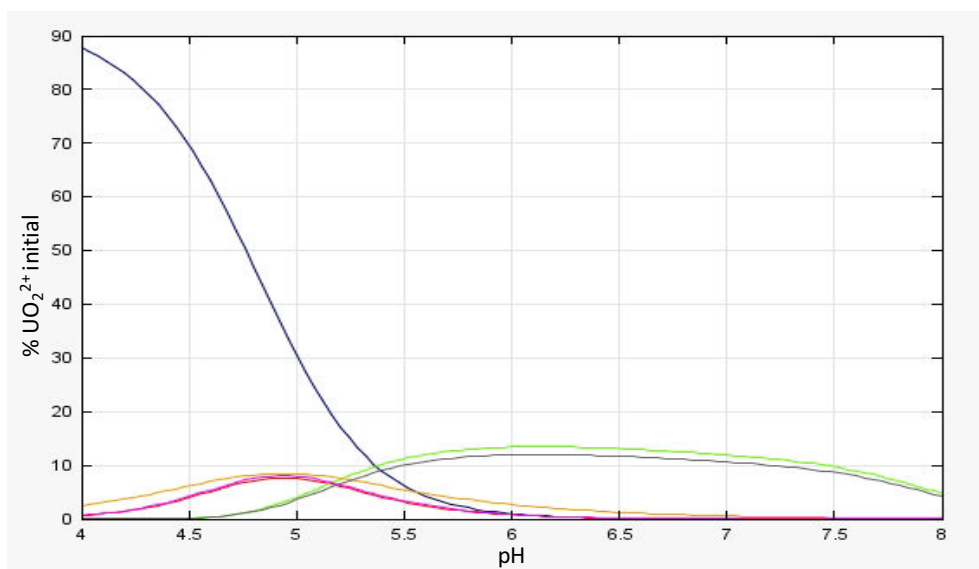


Figure 26: Simulation de la spéciation des fractions solubles de l'uranyle ($U = 10^{-4} M$) en fonction du pH dans une solution de NaCl 150 mM, en bleu UO_2^{2+} , en orange UO_2OH^+ , en rouge $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$, en rose $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$, en vert $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ et en gris $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ (JCHESS).

Afin de trouver une valeur de pH à laquelle les espèces qui précipitent restent négligeables dans les conditions opératoires, nous avons préparé une solution d'uranyle ($10^{-4} M$) dans une solution de TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris) à pH 5,0 qui a ensuite été ultracentrifugée sur Amicon® (Millipore, MWCO 10 kDa) pour séparer les espèces solubles et insolubles d'uranyle. Après le dosage de l'uranium par ICP-OES, il s'avère que $95 \pm 2 \%$ de l'uranyle est capable de passer à travers la membrane de 10 kDa.

La fraction insoluble semble donc surestimée par la simulation. Cette différence provient sans doute du tampon trishydroxyméthylaminométhane (Tris) qui, par des effets de solvation, stabilise les formes libres d'uranyle. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé dans le cas du Np(V).

Le PEI-MC étant un polyaminocarboxylate, sa capacité à complexer les métaux dépend de l'état de protonation de ses fonctions acide carboxylique. Le pKa de ces dernières se situant autour de 3,5, soit largement en dessous du pH physiologique (7,4), le PEI-MC est donc considéré comme complètement déprotoné dans des conditions biologiques ce qui lui permet d'être sous une forme optimale pour la complexation (Figure 27).

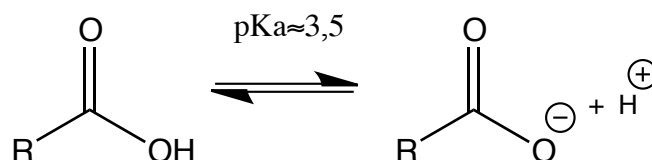


Figure 27 : Equation chimique de la déprotonation de la fonction acide carboxylique du PEI-MC.

La valeur du pH pour la courbe de charge ayant été fixée à pH 5,0, l'état de déprotonation du PEI-MC à ce pH a tout d'abord été vérifié. Pour cela, les spectres infrarouge à pH 5,0 et à pH 7,0 du PEI-MC ont été comparés (Figure 28). Il paraît clair qu'à pH 5,0, les fonctions acide carboxylique sont déprotonées puisque les élongations antisymétriques $\nu_{as}(-\text{COO}^-)$ à 1596 cm^{-1} et symétriques $\nu_s(-\text{COO}^-)$ à 1402 cm^{-1} n'ont pas été déplacées en énergie. Plus globalement, les spectres infrarouge à pH 5,0 et à pH 7,0 du PEI-MC sont très similaires et permettent de conclure quant à la déprotonation des fonctions acide carboxylique dès pH 5,0.

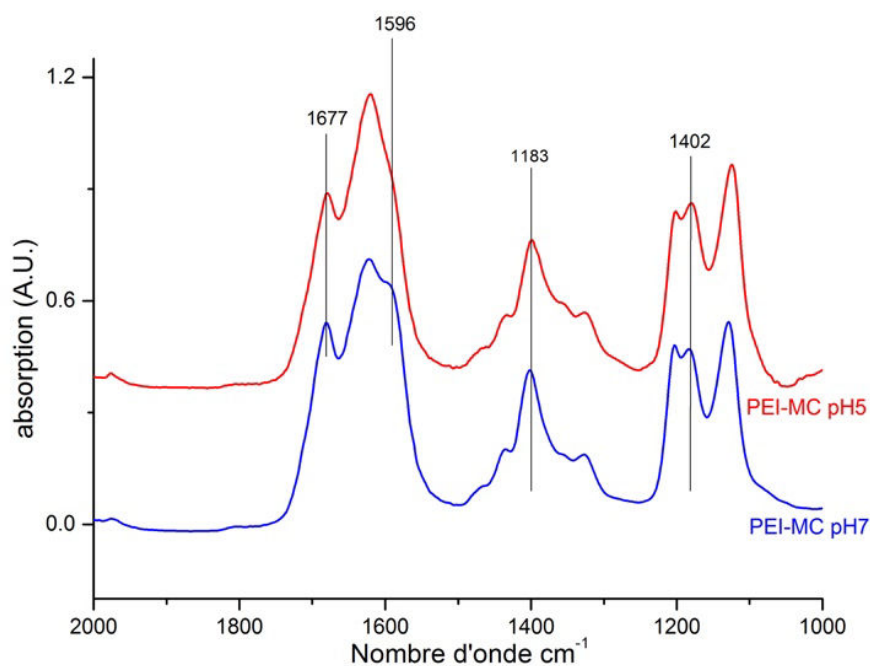


Figure 28: Spectres infrarouge du PEI-MC à pH 7,0 (bleu) et à pH 5,0 (rouge).

b Courbe de charge du complexe PEI-MC-U

Le taux de charge maximum atteint par le PEI-MC a été déterminé par un dosage basé sur la séparation des formes complexées et libres de l'uranyle. Cette courbe a été obtenue en faisant varier, à concentration d'uranyle fixe ($1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$), le rapport uranyle : monomère de PEI-MC entre 0 à 2 dans un milieu TBS à pH 5,0. Les formes libres de l'uranyle ont été séparées des formes complexées par ultracentrifugation sur filtres Amicon®.

Le complexe PEI-MC-U a ensuite été minéralisé, puis la fraction d'uranium complexé a été dosée par ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) aux longueurs d'ondes caractéristiques de l'uranium (405 nm et 389 nm) (cf. Annexe III). Les résultats sont représentés sous forme d'un graphique exprimant l'uranyle complexé au polymère (rapporté en unité monomérique), en fonction du rapport uranyle : monomère initial du système pour faire apparaître un plateau symbolisant le maximum de charge.

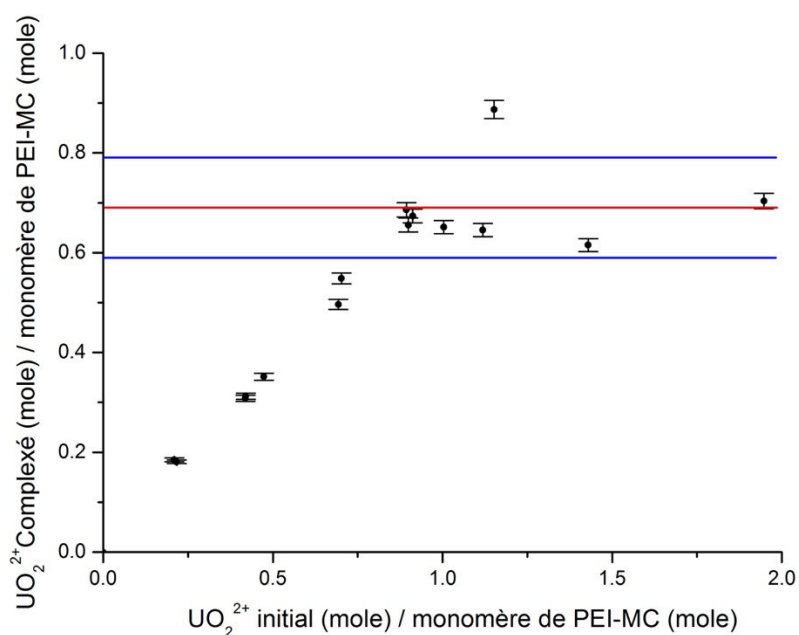


Figure 29: Courbe de charge du PEI-MC avec l'uranyle. En rouge la charge maximale moyenne en uranium du PEI-MC et son intervalle de confiance à 95% en bleu.

On obtient une courbe où le PEI-MC en excès, complexe l'uranyle de façon linéaire jusqu'à atteindre un plateau, aux environs de 0,8-0,9 équivalent (UO₂²⁺_{initial} : monomère [(C_{11,2}H_{17,4}N₃O_{5,4}Na_{2,7})Cl⁻]), symbolisant alors la saturation du polymère. Ainsi la charge maximale moyenne en uranyle du PEI-MC, symbolisée par la ligne rouge sur la figure 29, est de $0,69 \pm 0,10 \text{ mol.mol}^{-1}$ de monomère, soit environ $0,49 \pm 0,07 \text{ mg d'uranyle complexé par mg de PEI-MC}$. Cette valeur sera discutée à la fin de ce chapitre.

II Spectroscopie infrarouge du complexe PEI-MC-U

La spectroscopie IR a permis de caractériser les fonctions chimiques impliquées dans la complexation de l'uranyle. Des solutions de PEI-MC libre (10 mg.L⁻¹) et de PEI-MC-U (0,2 équivalent uranyle : monomère) ont été déposées sur un diamant ATR puis séchées. Leur spectre a été enregistré alors qu'un film humide se formait. Tous les spectres ont été enregistrés à pH 7,0 pour être dans des conditions proches du milieu physiologique. Par ailleurs les bandes d'absorption des fonctions carboxylate, situées autour de 1350 cm⁻¹, peuvent être masquées par les bandes d'absorption des groupements nitrate provenant du nitrate d'uranyle¹³¹. Les spectres ont donc été enregistrés une seconde fois avec du chlorure d'uranyle (cf. Annexe IV).

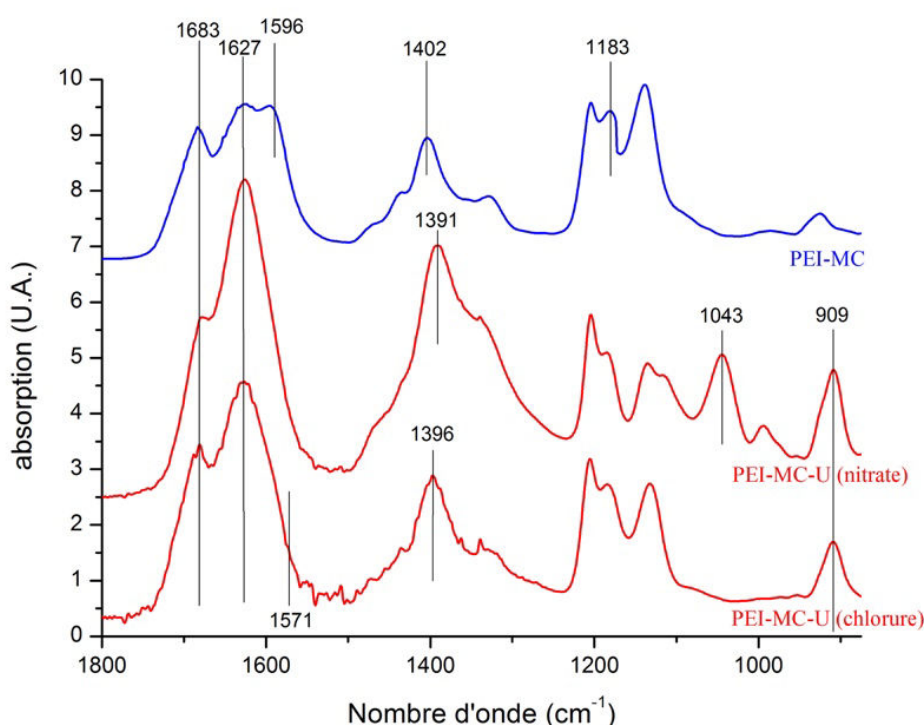


Figure 30 : Spectres infrarouge du PEI-MC libre (bleu), du PEI-MC-U (milieu nitrate) et de PEI-MC-U (milieu chlorure) (rouge) à pH 7,0.

Les spectres du complexe PEI-MC-U présentent des bandes d'absorption à 909 cm⁻¹ correspondant aux élongations antisymétriques des liaisons transdioxo de l'uranyle. Dans la littérature cette bande d'absorption est rapportée pour l'uranyle penta-aquo [UO₂(H₂O)₅]²⁺ à 962 cm⁻¹¹³². Ce déplacement vers les plus basses énergies traduit l'affaiblissement des liaisons U-O_{ax} causé par l'entrée de fonctions électrodonneuses dans la sphère de coordination de l'uranium. L'uranium est donc complexé. Les bandes d'absorption des fonctions carboxylate subissent également des modifications en présence d'uranium. Ainsi la bande d'absorption des carbonyles ν (C=O) à 1683 cm⁻¹ est moins intense après complexation.

Les bandes d'absorption correspondant aux élongations antisymétriques des fonctions carboxylate sont déplacées de 1596 cm^{-1} à 1571 cm^{-1} (à 1571 cm^{-1} la bande se présente sous forme d'un épaulement de la bande d'absorption des amines du polymère (1627 cm^{-1})). Les bandes d'absorption correspondant aux élongations symétriques sont déplacées de 1402 cm^{-1} à 1391 cm^{-1} (nitrate) ou à 1396 cm^{-1} (chlorure). Ces déplacements vers les plus basses énergies des bandes d'absorption des fonctions carboxylate traduisent une baisse de la densité électronique localisée sur les fonctions $-\text{COO}^-$ ce qui montre également l'implication des fonctions carboxylate dans la complexation de l'uranyle.

La modification de l'écart entre les bandes d'absorption antisymétrique et symétrique $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ des fonctions carboxylate après complexation est liée à leur mode de coordination. Ainsi si $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ diminue après complexation, les fonctions carboxylate complexent le métal de façon bidente alors que si $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ augmente, les fonctions carboxylate le complexent de façon monodente¹³³. Dans le cas du PEI-MC-U, $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ est difficile à estimer à cause de la bande d'absorption des amines du polymère qui, même si elle ne se déplace pas, parasite la bande d'absorption correspondant aux élongations antisymétriques des fonctions carboxylate (ν_{as}).

Ainsi, la spectroscopie IRFT a permis de démontrer que l'uranyle est complexé par les fonctions carboxylate du PEI-MC et que les amines ne participent pas à sa sphère de coordination. En revanche, il est impossible de conclure de façon certaine sur le mode de coordination (monodente ou bidente) des fonctions carboxylate.

III Spéciation du complexe PEI-MC-U

La spectroscopie infrarouge a montré que la complexation de l'uranium se faisait uniquement par les fonctions carboxylate du polymère. Pour compléter la caractérisation du site de complexation, une approche par Spectroscopie d'Absorption X combinée à une étude théorique en dynamique moléculaire a été mise en œuvre.

a Principe de la Spectroscopie d'Absorption X

La Spectroscopie d'Absorption X (SAX) étant une spectroscopie non usuelle, un bref rappel de son principe permettra de clarifier les développements de ce chapitre. La SAX est une technique de caractérisation basée sur l'interaction lumière/matière. Les rayons X étant très énergétiques (1 à 150 keV) ils peuvent être absorbés par la matière par effet photoélectrique. Localement c'est un phénomène quantique qui se crée, un trou profond se forme par l'éjection d'un photoélectron d'une couche électronique donnée de l'atome absorbé. L'énergie minimum nécessaire à la formation du trou profond correspond alors au seuil d'absorption.

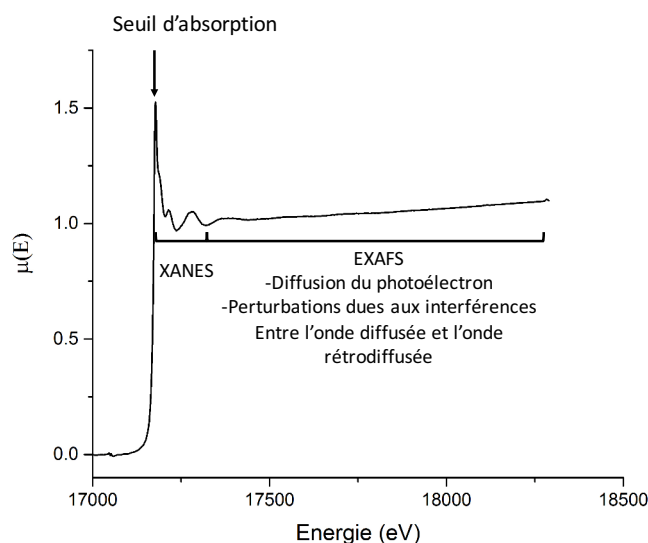


Figure 31 : Spectre d'absorption X de l'uranium (VI) au seuil L_{III} (correspondant à une transition électronique de la couche $2p_{3/2}$)

Sur un spectre de SAX (Figure 31), la partie post seuil est appelée XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Elle donne des informations sur l'état des électrons de valence de l'atome absorbé. Si l'énergie des rayons X absorbés est supérieure à l'énergie du seuil, le photoélectron sera éjecté avec une énergie cinétique non nulle et une onde électromagnétique sortante associée. Il se crée ainsi un système d'interférences entre l'onde sortante et les ondes rétrodiffusées par le potentiel des atomes voisins.

Les interférences résultantes sont, soit constructives, soit destructives et forment les oscillations post seuil qui constituent le signal EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) (Figure 32). Ce signal contient les informations de distance et de nature, des plus proches voisins de l'atome absorbeur et permet de préciser l'arrangement autour de ce dernier.

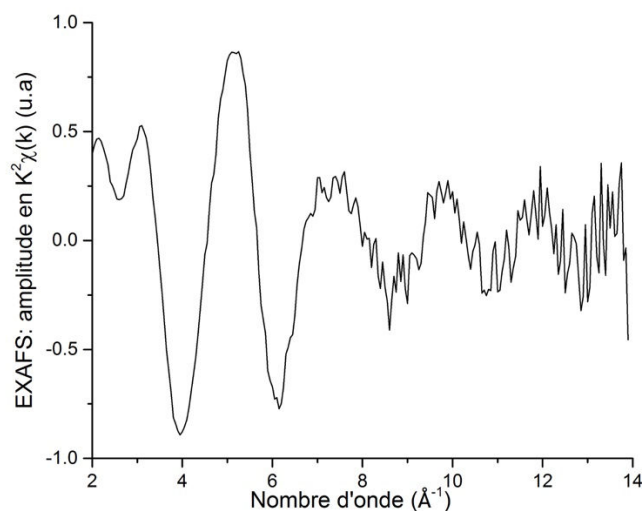


Figure 32 : Spectre EXAFS représenté en $k^2(\chi(k))$ au seuil L_{III} de l'uranium (VI).

Le lecteur pourra se référer à l'article de M. Newville pour plus de précision sur la théorie de l'EXAFS¹³⁴.

Le seuil L_{III} utilisé dans l'ensemble de ce travail correspond à une transition électronique à partir d'une couche de cœur $2p_{3/2}$.

Dans la suite de ce manuscrit nous présenterons les spectres EXAFS et les modules des transformées de Fourier associées. Le signal EXAFS est exprimé en k (assimilé à un espace réciproque). La transformée de Fourier de ce signal permet d'obtenir une fonction de distribution radiale (pseudo-radiale elle n'est pas corrigée de la phase) dans l'espace réel (R).

Le résultat de la transformée de Fourier est un nombre complexe dont la partie imaginaire contient l'information de la phase. En représentant le module de la transformée de Fourier on obtient une fonction de distribution radiale non corrigée de la phase ($R+\phi$). Pour autant, l'analyse de la partie imaginaire permet de rendre compte directement des variations du déphasage ce que ne permet pas le module (ce dernier étant une somme de carrés).

b EXAFS du complexe PEI-MC-U

Le spectre EXAFS du complexe PEI-MC-U a été enregistré au seuil L_{III} de l'uranium (17166 eV) pour une équivalence uranyle : monomère de PEI-MC de 0,04. La figure 33 présente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 9. Pour cet ajustement, le nombre d'oxygènes équatoriaux a été fixé à 5 pour un total de 7 oxygènes dans la première sphère de coordination (présence de deux oxygènes axiaux pour former le groupement uranyle). L'uranyle (VI) est souvent décrit avec 5+2 oxygènes dans sa première sphère de coordination lorsqu'il est en milieu aqueux¹³². Ces nombres de coordination ont été fixés.

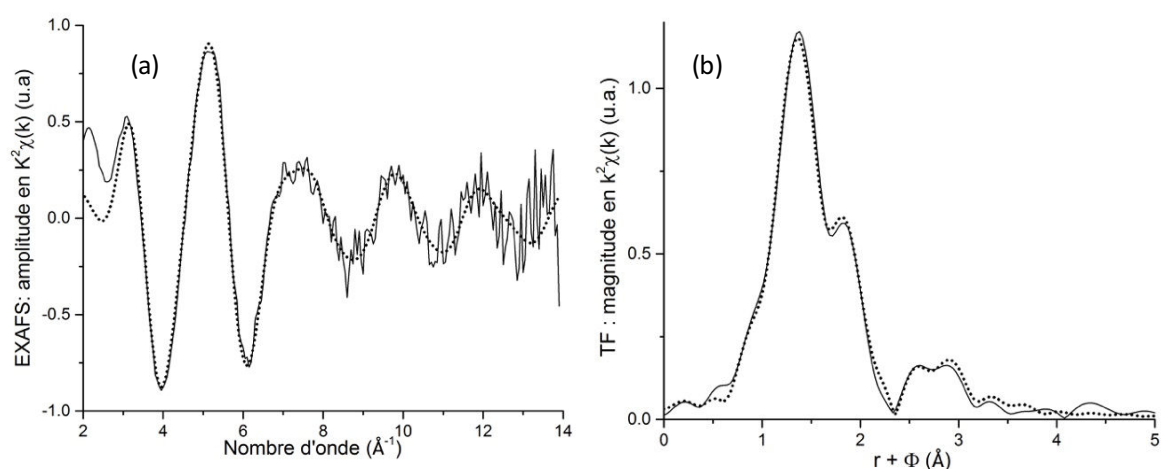


Figure 33 : (a) Spectre EXAFS du PEI-MC-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (b) transformée de Fourier correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Le module de la transformée de Fourier (Figure 33b) laisse apparaître un pic et un épaulement à $r + \Phi = 1,50 - 1,90 \text{ \AA}$ qui est caractéristique de la première sphère de coordination de l'uranyle. Celle-ci comprend les atomes d'oxygène axiaux (2) et équatoriaux (5) (fixés). Il peut être noté qu'en laissant le nombre d'oxygènes équatoriaux variable, la valeur de 5,0(2) est obtenue, ce qui justifie pleinement le choix d'une coordinence fixe égale à 5+2. La partie équatoriale de la première sphère de coordination, révèle une double contribution des 5 oxygènes correspondant au mode de complexation des groupements carboxylate du polymère. Ainsi 2,9 oxygènes sont situés à 2,31 \AA et correspondent à des fonctions monodentes alors que les 2,1 oxygènes à 2,45 \AA correspondent aux fonctions bidentes. La présence d'une seconde sphère de coordination est aussi visible, entre $r + \Phi = 2,2$ et 3,2 \AA . Elle est composée de 2,9 carbones provenant des fonctions carboxylate monodentes à 3,41 \AA et de chlore. Il faut cependant ajouter 0,4 atomes de chlore à 3,00 \AA pour augmenter la qualité de l'ajustement en faisant diminuer le R_{facteur} de 0,38 % à 0,16% le facteur Q de 0,5 à 0,2.

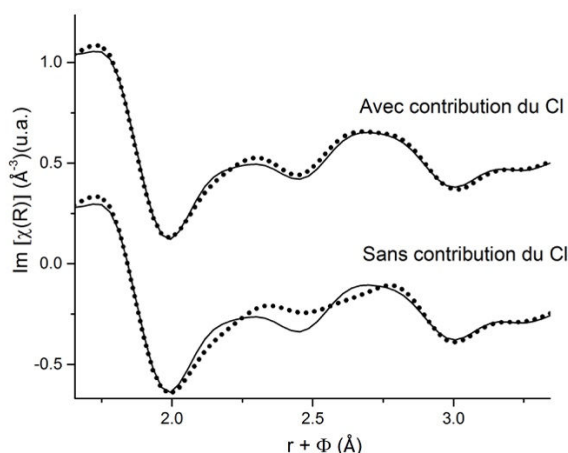


Figure 34 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MC-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (en haut) avec la contribution de 0,4 atome de chlore (en bas) sans atome de chlore. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Compte tenu de la présence de chlore en tant que contre-ion des ammoniums du polymère et en tant qu'électrolyte (NaCl) fixant la force ionique du mélange, une contribution du chlore doit être envisagée. Comme le montre la figure 34 où est comparé l'ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MC-Th avec et sans la contribution du chlore, l'ajout de 0,4 atomes de chlore à 3,00 Å augmente la qualité de l'ajustement graphiquement dans la zone comprise entre $r+\Phi=2,5$ Å.

Tableau 9 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour le spectre EXAFS du PEI-MC-U. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MC-U	2 O_{ax} à 1,78 (1) Å $\sigma^2 = 0,0028 \text{ \AA}^2$	2,9 C_{mon} à 3,41 (2) Å $\sigma^2 = 0,0033 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,1$ $e_0 = 1,75 \text{ eV}$ $R_{\text{facteur}} = 0,16\%$ $Q = 0,19$
	2,9 (3) O_{mon} à 2,31 (2) Å $\sigma^2 = 0,0079 \text{ \AA}^2$	0,4 Cl à 3,00 (2) Å $\sigma^2 = 0,0049 \text{ \AA}^2$	
	2,1 (3) O_{bid} à 2,45 (2) Å $\sigma^2 = 0,0059 \text{ \AA}^2$		

Les distances U-O obtenues, que ce soit pour des atomes d'oxygène de fonctions carboxylate mono- ou bidentes, sont en accord avec les travaux de M. A. Denecke *et al.* sur les modes de complexation des carbonates avec l'uranyle¹³⁵. Dans son article M. A. Denecke *et al.* rapportent que les distances U-O pour des carbonates monodentes sont de 2,28 Å et pour des fonctions bidentes de 2,47 Å.

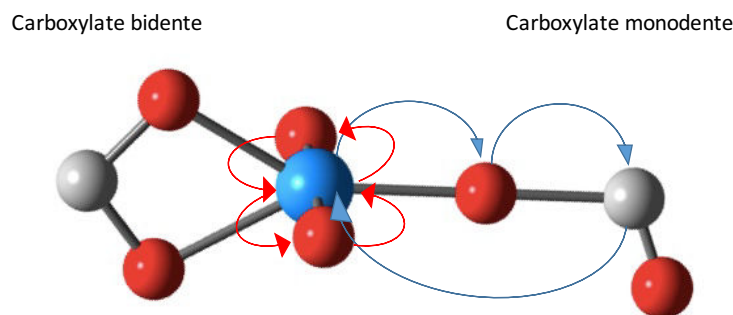


Figure 35 : Schéma simplifié d'un ion uranyle coordonné de façon monodente (à droite) et bidente (à gauche) à deux fonctions carboxylate avec les chemins de diffusion multiple (la diffusion quadruple O-U-O : flèches rouges et la diffusion triple P-O-U : flèches bleues) utilisés lors de l'ajustement du spectre EXAFS du PEI-MP-U.

Il peut être noté que seuls les carbones des fonctions carboxylate monodentes ont été pris en compte pour l'ajustement. En effet, grâce aux phénomènes de diffusions multiple (ici diffusion triple) liée à l'angle de liaison U-O-C (Figure 35), leur contribution au signal EXAFS est amplifiée, ce qui n'est pas le cas pour les carbones des fonctions carboxylate bidentes à cause de l'angle U-O-C.

Comme on peut le voir sur la figure 36 l'uranyle dans le complexe PEI-MC-U est complexé par trois fonctions carboxylate monodentes et une bidente. Il a donc une coordinance de sept et présenterait avec ses deux atomes d'oxygène axiaux et ses cinq atomes d'oxygène équatoriaux une structure bipyramidale pentagonale.

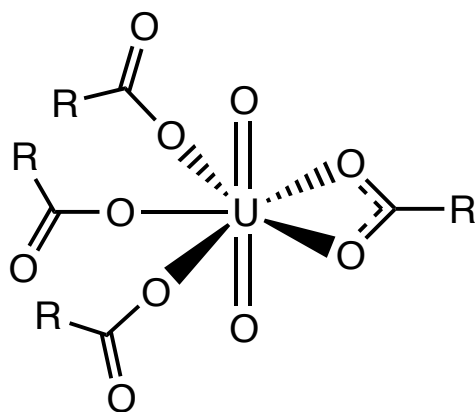


Figure 36 : Représentation schématique de la première et de la deuxième sphère de coordination de l'uranyle dans le complexe PEI-MC-U. (R représente la chaîne polymérique).

c Dynamique moléculaire de complexe PEI-MC-U

La simulation par dynamique moléculaire (DM) du cation uranyle entouré du PEI-MC en milieu aqueux a permis de préciser l'arrangement spatial autour de l'uranium. Ces calculs ont été réalisés par M. Duvail de l'ICSM (cf. Annexe V). Pour simplifier le système et pour des raisons de temps de calcul, les chaînes polymériques ont été assimilées à quatre monomères libres $[(C_{16}H_{24}N_4O_8) \cdot Cl]_n$ et le temps de simulation a été limité à 9 ns. A cause de l'encombrement stérique, seul trois monomères de PEI-MC ont leurs fonctions carboxylate capables d'entrer dans la sphère de coordination de l'uranyle.

La figure 35 montre un instantané de la modélisation de l'interaction du PEI-MC avec l'uranyle. Le cation métallique est complexé par quatre fonctions carboxylate des trois monomères de PEI-MC. Trois de ces fonctions carboxylate sont monodentes tandis que la dernière est bidente.

A partir des fonctions de distribution radiale présentées figure 38, les distances moyennes $U-O_{ax}$, $U-O_{eq}$ (composées de $U-O_{mon}$ et $U-O_{bid}$), $U-C$ ont été calculées. Elles sont répertoriées dans le tableau 10.

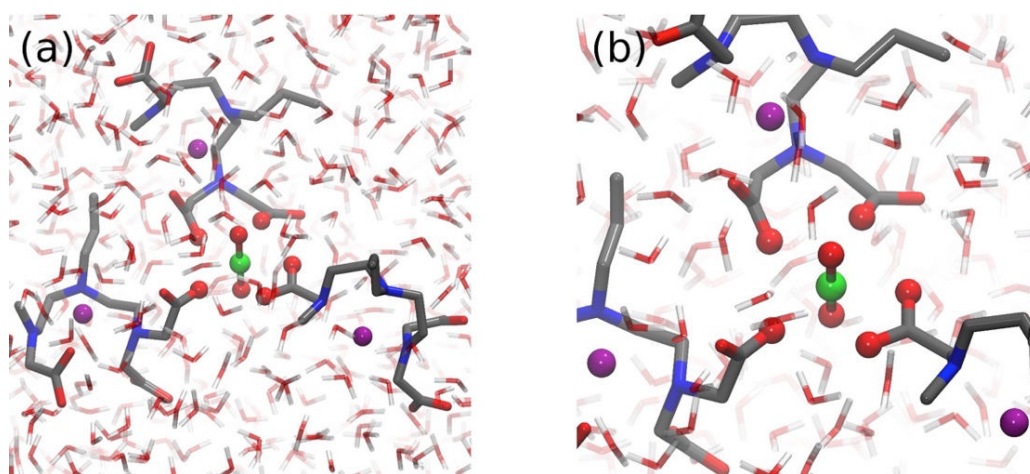


Figure 37 : Instantanés issus de la simulation de dynamique moléculaire à 9 ns montrant la première sphère de coordination de l'uranyle : sont représentés (a) les monomères entiers PEI-MC et (b) le zoom sur la première sphère de coordination. (Formalisme d'illustration : UO_2^{2+} est représenté en vert et rouge, Na^+ en violet, l'oxygène en rouge, l'hydrogène en blanc, l'azote en bleu, et le carbone en gris. Par soucis de clarté, les hydrogènes du monomère ne sont pas présentés.).

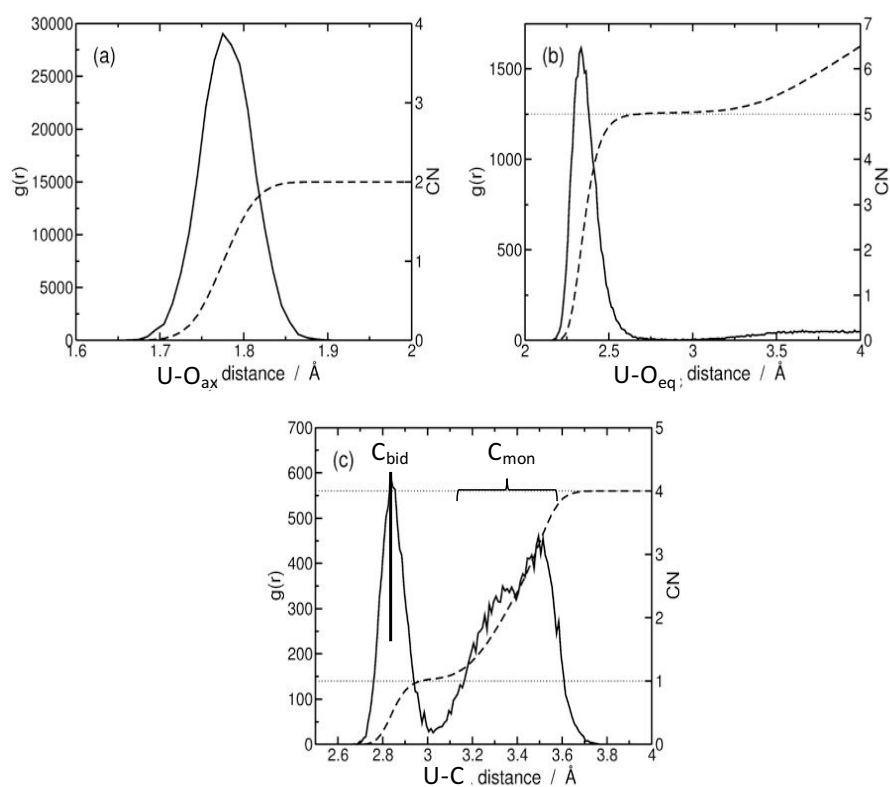


Figure 38 : Fonctions de distribution radiale calculées par DM pour les distances U-O_{ax} (a), U-O_{eq} (b), U-C (c). Le nombre de coordination représente l'intégrale du pic et est représenté par la courbe pointillée.

Ainsi, pour les oxygènes axiaux, la distance moyenne calculée est de 1,78 Å avec un facteur Debye Waller associé de 0,0010 Å². Dans le plan équatorial sont localisés 5,05 atomes d'oxygènes. Concernant ces atomes d'oxygène équatoriaux, les distances calculées les séparent en deux populations : les atomes d'oxygène des fonctions carboxylate monodentes aux nombres de 2,49 situés à 2,32 Å et les 2,56 atomes d'oxygène des fonctions carboxylate bidentes à 2,40 Å avec des facteurs de Debye Waller associés de 0,0010 et 0,0023 Å². La différence de distance entre les deux types d'oxygène (0,08 Å) n'est pas suffisamment importante pour donner lieu à deux contributions distinctes. La différenciation des distances U-O_{bid} et U-O_{mon} est faible (Figure 38b) car dans le calcul de DM, il y a des changements de coordination des fonctions carboxylate du monomère, qui passent de mono à bidente et inversement toutes le 2-3 ns.

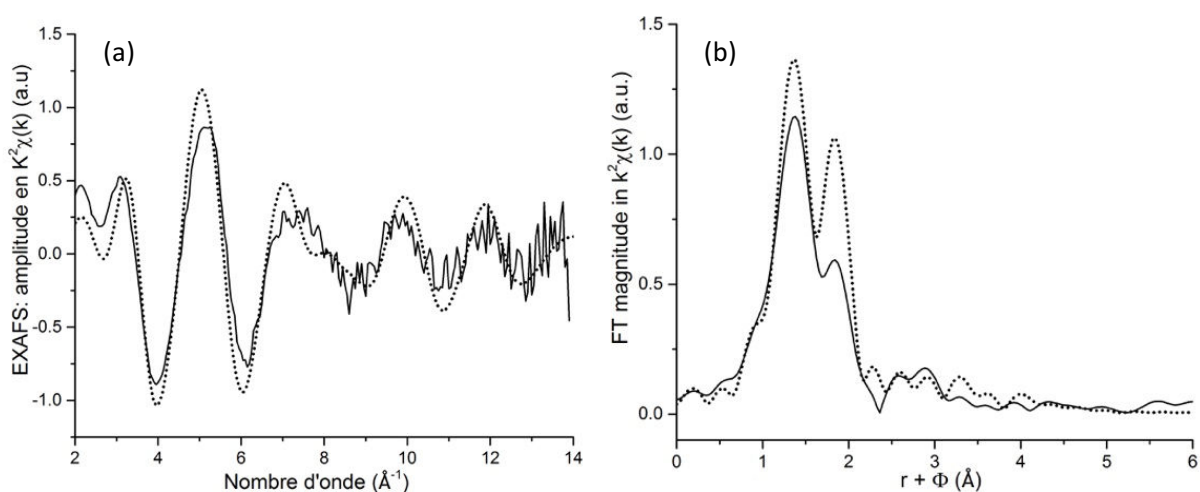
La seconde sphère de coordination est séparée en deux populations d'atomes de carbone bien distinctes comme le montre la fonction de distribution radiale présentée figure 38c. Une première population est composée de 2,95 atomes de carbone à 3,39 Å correspondant aux fonctions carboxylate monodentes (C_{mon}) et une deuxième population qui est composée de 1,05 atomes de carbone à 2,85 Å correspondant aux fonctions carboxylate bidentes (C_{bid}) avec des facteurs de Debye Waller associés de 0,0010 et 0,0023 Å² respectivement.

Tableau 10 : Données structurales calculées par simulation de dynamique moléculaire de l'uranyle dans l'eau en présence de trois monomères PEI-MC.

Atomes	Distance (Å)	Nombre de coordination	Facteur Debye-Waller associé (Å ²)
O _{ax}	1,78	2	0,0010
O _{eq}	2,36	5,05	0,0034
O _{bid}	2,40	2,49	0,0052
O _{mono}	2,32	2,56	0,0023
C _{bi}	2,85	1,05	0,0029
C _{mono}	3,39	2,95	0,0153

Il peut être noté que facteur Debye-Waller associé la contribution des C_{mon} est très élevée. En cause son pic très large de fonction de distribution radiale (Figure 38c).

La **superposition** des spectres EXAFS expérimental et obtenu en moyennant les instantanés calculés par DM est présentée sur la figure 39 dans l'espace des k ($k^2\chi(k)$) et réel ($R+\Phi$).



*Figure 39 : (a) **Superposition** des spectres EXAFS expérimental et calculé à partir de la DM du PEI-MC-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (b) transformées de Fourier correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe calculée (pointillés).*

Il est rappelé que le spectre calculé par DM ne résulte de l'ajustement d'aucun paramètre. L'amplitude des deux spectres diffère à cause de la méthode de calcul du spectre EXAFS simulé qui a des difficultés à rendre compte des fluctuations structurales de la liaison UO_2^{2+} . Comme il est montré dans le tableau 11, les nombres d'atomes d'oxygène et d'atomes de carbone présents en première et en seconde sphère de coordination calculés par DM et obtenus par EXAFS sont semblables. Ce très bon accord atteste du double mode de coordination des fonctions carboxylate qui complexent l'uranyle de façon monodente (3 fonctions) et bidente (1 fonctions).

Tableau 11 : Comparaison entre les paramètres d'ajustement EXAFS et les données structurales calculées par DM de l'uranyle complexé par le PEI-MC.

Echantillon	EXAFS	DM
PEI-MC-U	2 O _{ax} à 1,78 (1) Å $\sigma^2 = 0,0028 \text{ \AA}^2$	2 O _{ax} à 1,78 Å $\sigma^2 = 0,0010 \text{ \AA}^2$
	2,9 (3) O _{mon} à 2,31 (2) Å $\sigma^2 = 0,0079 \text{ \AA}^2$	2,56 O _{mon} à 2,32 Å $\sigma^2 = 0,0023 \text{ \AA}^2$
	2,1 (3) O _{bid} à 2,45 (2) Å $\sigma^2 = 0,0059 \text{ \AA}^2$	2,49 O _{bid} à 2,40 Å $\sigma^2 = 0,0052 \text{ \AA}^2$
	2,9 C _{mon} à 3,41 (2) Å $\sigma^2 = 0,0033 \text{ \AA}^2$	1,05 C _{bid} à 2,85 Å $\sigma^2 = 0,0029 \text{ \AA}^2$
		2,95 C _{mon} à 3,39 Å $\sigma^2 = 0,0153 \text{ \AA}^2$

Les facteurs de Debye-Waller des O_{mon} calculés par la DM sont systématiquement sous-estimés par rapport à ceux obtenus par ajustement EXAFS. L'utilisation de monomères pour la simulation alors que le système est composé de chaînes polymériques fausse l'estimation du désordre du système (effets de solvant).

RESUME

Au cours de ce chapitre, le PEI-MC, un analogue polymérique du DTPA ayant un monomère de formule brute $[(C_{12}H_{19}N_3O_6Na_3)^+ Cl^-]_n$, a pu être synthétisé et purifié à partir du bPEI commercial avec un taux de fonctionnalisation de 90%.

Nous avons pu montrer que la charge maximum du PEI-MC en uranyle est de $0,69 \pm 0,08$ mol d'uranyle par mole de monomère soit environ 0,49 mg d'uranyle par mg de PEI-MC. L'étude préliminaire en spectroscopie infrarouge a révélé une interaction entre les fonctions carboxylate et l'uranyle. La nature des interactions n'a en revanche pu être élucidée que partiellement avec un mode de coordination monodente des fonctions carboxylate. La spectroscopie EXAFS, combinée à l'étude théorique de dynamique moléculaire, réalisées sur le système PEI-MC-U ont montré qu'un mode de coordination mixte des fonctions carboxylate est à considérer. Les distances sont en accord avec la littérature¹³⁵ ($U-O_{mon} = 2,28 \text{ \AA}$, $U-O_{bid} = 2,47 \text{ \AA}$).

C Caractérisation physico-chimique des complexes PEI-MC-Pu et PEI-MC-Th

Comme il a été expliqué dans le chapitre I, les cas de contamination avec du plutonium sont traités par administration de DTPA. Cette agent chélatant du Pu(IV) favorise son excrétion sanguine, cependant son efficacité est limitée par sa faible distribution aux organes.

En tant qu'analogue polymérique du DTPA, le PEI-MC pourrait être un agent décorporant macromoléculaire capable de promouvoir l'excrétion du Pu(IV) retenu dans les compartiments extra sanguins (os, foie). La caractérisation physico-chimique du complexe PEI-MC-Pu est alors indispensable pour évaluer la capacité de ce dernier à complexer le Pu(IV) en milieu biologique. Une stratégie similaire à celle adoptée pour la caractérisation du complexe PEI-MC-U a été employée et un complexe de PEI-MC-Pu a pu être préparé en milieu pseudo-physiologique et a ensuite été caractérisé par spectroscopie EXAFS.

L'activité massique du Pu-239 étant importante ($2,30 \times 10^9 \text{ Bq.g}^{-1}$), sa manipulation est délicate et doit obligatoirement se faire en enceinte confinée (boite à gants). Au sein de notre laboratoire l'élaboration d'une courbe de charge associée à la formation du complexe PEI-MC-Pu, suivie par dosage spectrophotométrie UV-vis, n'est pas possible techniquement car nos installations ne sont pas adaptées. Nous avons donc choisi d'utiliser le Th(IV) pour élaborer la courbe de charge associée à la formation du complexe PEI-MC-Th analogue du complexe PEI-MC-Pu. Le Th(IV) est connu pour posséder des caractéristiques physico-chimiques très similaires à celles du Pu(IV). Cependant, l'activité massique du Th-232 est de $4,1 \times 10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ ce qui le rend plus facile à manipuler. Nous reviendrons dans la suite de ce chapitre sur ces similitudes chimiques. Le complexe PEI-MC-Th a aussi donné lieu à une étude en spectroscopie EXAFS en conditions pseudo-physiologiques. Ainsi les sites de complexation du Th(IV) et du Pu(IV) du PEI-MC ont pu être comparés.

Pour des raisons expérimentales, le milieu biologique a également été simplifié par une solution aqueuse de tampon salin trishydroxyméthylaminométhane (TBS) à pH 7,0 et les concentrations de Th(IV) et Pu(IV) sont comprises entre 10^{-2} et 10^{-5} M ce qui est très supérieur à une concentration réaliste de métal dans le corps après une contamination mais nécessaire pour avoir des spectres EXAFS exploitables dans un délai d'acquisition raisonnable. Les détails expérimentaux de chaque mesures et résultats sont décrits plus précisément dans les Annexes.

I EXAFS du complexe PEI-MC-Pu

Afin de sonder l'interaction Pu(IV)-PEI-MC en milieu biologique, la sphère de coordination du Pu(IV) dans le complexe PEI-MC-Pu a été étudiée en spectroscopie EXAFS au seuil L_{III} du plutonium (18057 eV). Un spectre UV-vis de ce complexe a également pu être enregistré avant la mesure EXAFS pour confirmer l'absence de formes colloïdales de Pu(IV).

Le complexe PEI-MC-Pu a été préparé par ajout de 100 μL d'une solution de PuCl_4 ($5 \times 10^{-5} \text{M}$, pH 0,0) à 100 μL dans une solution de PEI-MC ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) contenant du TBS ($[\text{NaCl}] = 1500 \text{ mM}$, $[\text{Tris}] = 500 \text{ mM}$) à pH 1,0 pour obtenir un rapport Pu(IV) : monomère de PEI-MC de 0,002. Le pH a été ajusté à 7,0 par ajout de soude à 0,1 M. Le volume final de l'échantillon a été fixé à 500 μL de façon à ce que les concentrations finales soient : $[\text{Pu}] = 1 \times 10^{-5} \text{M}$, $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$, $[\text{Tris}] = 50 \text{ mM}$ (cf. Annexe V). Le spectre UV-visible du complexe PEI-MC-Pu a été enregistré dans ce milieu et comparé au spectre UV-vis du Pu^{4+} de la solution mère figure 40.

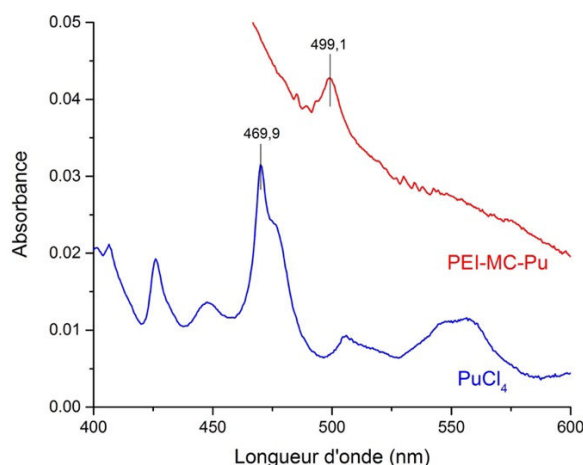


Figure 40 : Spectres UV-vis du complexe PEI-MC-Pu ($\text{Pu(IV)} = 0,01 \text{ mM}$) en milieu TBS pH 7,0 en rouge et du complexe PuCl_4 ($\text{Pu(IV)} = 0,05 \text{ mM}$) en milieu HCl pH 0,0.

Le spectre UV-vis de Pu^{4+} en milieu HCl 1M (pH = 0,0) présente la bande d'absorption à 469 nm, caractéristique du Pu(IV) en milieu hydrochlorique concentré¹³⁶. Le spectre du complexe PEI-MC-Pu enregistré en milieu TBS pH 7,0, présente une très forte bande d'absorption (invisible sur le spectre) autour de 300 nm due au PEI-MC ce qui déforme fortement la ligne de base. Néanmoins une bande d'absorption à 499 nm est clairement visible et correspond à du Pu(IV) complexé au PEI-MC. Pour comparaison, dans la littérature le spectre UV-vis du complexe Pu(NTA)_2 présente une bande d'absorption à une longueur d'onde similaire (autour de 500 nm) à pH 6,7¹³⁷. Malheureusement il n'a pas été possible de calculer la concentration molaire du complexe PEI-MC-Pu à partir de l'absorption mesurée car l'absorption du polymère fausse la mesure de la ligne de base.

Le spectre EXAFS du complexe PEI-MC-Pu a ensuite été enregistré. La figure 41 représente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 12.

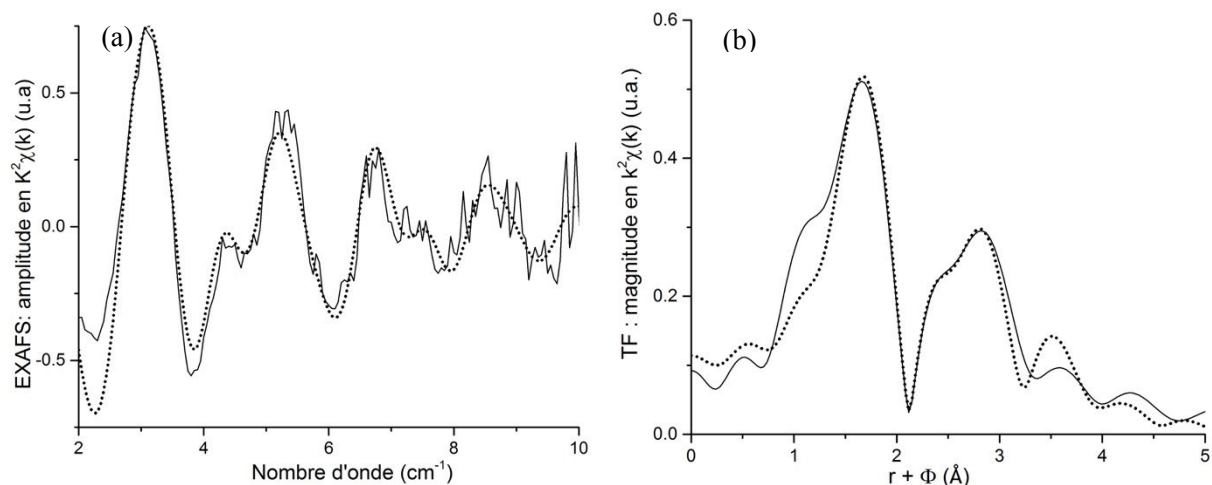


Figure 41 : (a) Spectre EXAFS du PEI-MC-Th au seuil L_{III} du thorium ; (b) transformée de Fourier correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

L'ajustement des données EXAFS du complexe PEI-MC-Pu a été réalisé à partir des chemins de diffusion rapportés par J. Aupiais *et al.* pour le complexe Pu(IV)-DTPA¹³⁸ en utilisant un mode de coordination 5+3 pour définir la première sphère de coordination du Pu(IV) (cf. Annexe V).

D'après ce mode de coordination nous avons fixé le nombre d'atomes d'oxygène à 5 et le nombre d'atomes d'azote à 3 pour former la première sphère de coordination du Pu(IV) dans le complexe PEI-MC-Pu. Ainsi en ajustant les données EXAFS, les distances trouvées pour ces 5 atomes d'oxygène et ces 3 atomes d'azote sont respectivement de 2,34 et 2,66 \AA . La seconde et troisième sphère de coordination du Th(IV) sont composées des 5 atomes de carbone α des fonctions carboxylate et des 9 atomes de carbone en position β des fonctions carboxylate situés à 3,37 et 3,45 \AA (Figure 42).

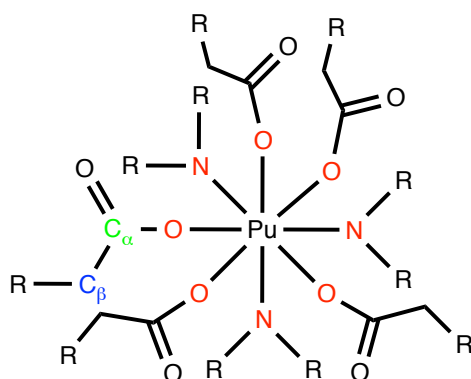


Figure 42 : Représentation schématique de la sphère de coordination du Pu(IV) dans le complexe PEI-MC-Pu. (Formalisme R représente la chaîne polymérique). On peut noter l'absence de 4 C (β).

Tableau 12 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour le spectre EXAFS du complexe PEI-MC-Pu. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MC-Pu	5 O à 2,34 (1) Å $\sigma^2 = 0,0093 \text{ \AA}^2$	5 C(α) à 3,38 (1) Å $\sigma^2 = 0,0116 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = -5,52 \text{ eV}$
	3 N à 2,66 (2) Å $\sigma^2 = 0,0171 \text{ \AA}^2$	9 C(β) à 3,45 (2) Å $\sigma^2 = 0,0116 \text{ \AA}^2$	$R_{\text{facteur}} = 2,1\%$ $Q = 0,022$

Il semble que la sphère de coordination du Pu(IV) lorsqu'il est complexé avec des aminocarboxylates soit très stable. En effet que ce soit dans le complexe PEI-MC-Pu que nous décrivons ou dans les complexes Pu-DTPA¹³⁸ ou Pu-NTA¹³⁹ la première sphère de coordination ne subit que très peu de modification (Tableau 13). La similitude des sites de complexation du Pu(IV) dans les complexes Pu-DTPA et PEI-MC-Pu semble confirmer que le PEI-MC interagit avec le Pu(IV) de la même façon que le DTPA.

Tableau 13 : Comparaison des sphères de coordination du Pu(IV) dans les complexes PEI-MC-Pu, Pu-DTPA¹³⁸ et Pu-NTA¹³⁹.

PEI-MC-Pu	Pu-DTPA	Pu-NTA
5 O à 2,34 (1) Å	5 O à 2,30 Å	6 O à 2,34 Å
3 N à 2,66 (2) Å	3 N à 2,61 Å	2 N à 2,74 Å
5 C(α) à 3,38 (1) Å	5 C(α) à 3,34 (1) Å	
9 C(β) à 3,48 (2) Å	9 C(β) à 3,40 (2) Å	

II Le thorium (IV) comme analogue du plutonium (IV)

La courbe de charge correspondant à la formation du complexe PEI-MC-Pu n'a pas pu être réalisée car il nous est techniquement impossible de procéder à l'ensemble des manipulations requérant du plutonium. Nous avons donc utilisé le Th(IV) pour simuler le comportement du Pu(IV), leurs caractéristiques physico-chimiques présentant des similitudes. En revanche le thorium a une activité massique beaucoup plus faible que le plutonium ($4,1 \times 10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ pour le Th-232 contre $2,3 \times 10^9 \text{ Bq.g}^{-1}$ pour le Pu-239). Le thorium n'existe qu'au degré d'oxydation +IV en solution alors que le plutonium peut se présenter sous des degrés d'oxydation allant de +III à +VI. Dans des conditions physiologiques ces deux actinides sont à considérer à leur degré d'oxydation +IV. Le thorium et le plutonium ont également des rayons atomiques relativement proches, 179 pm pour le thorium et de 159 pm pour le plutonium, ce qui leur permet d'atteindre des sites de complexation similaires. Ils ont aussi des électronégativités très semblables 1,3 pour le thorium et 1,28 pour le plutonium.

Le thorium (IV) comme le plutonium (IV) ont une propension à former des espèces poly-hydroxydes et poly-oxydes en solution qui sont très peu solubles. Ils ont des affinités similaires pour les citrates et la transferrine et en cas de contamination ces deux actinides ciblent l'os et le foie où ils sont largement retenus¹⁴⁰. Il n'en reste pas moins que cette analogie est à considérer avec précaution et l'élaboration d'une courbe de charge avec le Pu(IV) serait à envisager (au CEA par exemple).

III Courbe de charge du complexe PEI-MC-Th

La première étape de la caractérisation du système PEI-MC-Th a été de définir, en milieu physiologique, la capacité de charge maximum du polymère en Th(IV). Pour cela, la fraction de thorium complexé par le PEI-MC a été quantifiée par colorimétrie, pour des équivalences Th(IV) : PEI-MC variant de 0 à 4.

a Influence du PH sur le système PEI-MC-Th

D'un point de vue expérimental, il a été nécessaire de simplifier le milieu biologique en l'assimilant à une solution physiologique de TBS à pH 7,0 (force ionique fixée à 0,15 M). Dans ce milieu physiologique l'absence de protéines et autres métabolites, qui pouvaient stabiliser les formes libres de de thorium conduit à la formation d'espèces hydrolysées insolubles

La figure 43 montre la spéciation simulée du thorium en fonction du pH. L'élaboration de la courbe de charge étant basée sur la séparation du thorium libre et du complexe PEI-MC-Th par ultrafiltration il est important que le thorium reste sous forme soluble (cf. Annexe III).

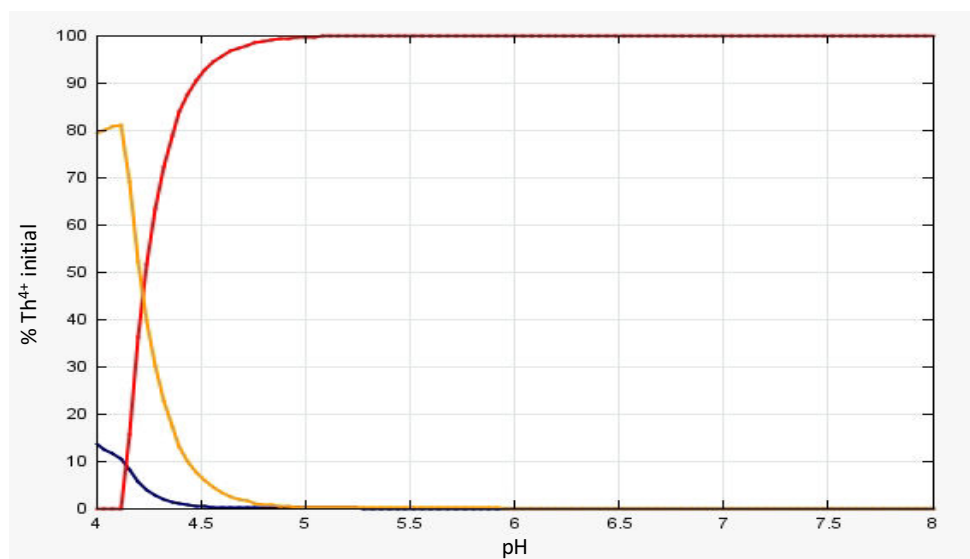


Figure 43 : Spéciation (simulée) des fractions solubles du thorium ($[Th(IV)] = 1mM$) en fonction du pH avec en bleu Th^{4+} , en orange $(ThOH)^{3+}$ et en rouge $Th(OH)_4(s)$, (logiciel Jchess, BASSIST 2007).

La simulation réalisée via le logiciel Jchess montre qu'à pH 7,0, sans NTA, plus de 99% du thorium se trouverait sous forme de thorium hydrolysé Th(OH)₄ (courbe rouge figure 43). La formation d'hydroxyde de thorium insoluble à partir de la fraction de thorium non complexé au PEI-MC est problématique pour l'étape de séparation par ultracentrifugation car elle fausserait les données.

Pour éviter la formation d'une phase colloïdale, le thorium doit donc être protégé et pour cela nous avons utilisé le NTA. La figure 44 montre la modification de spéciation du Th(IV) en fonction du pH en présence de deux équivalents de NTA.

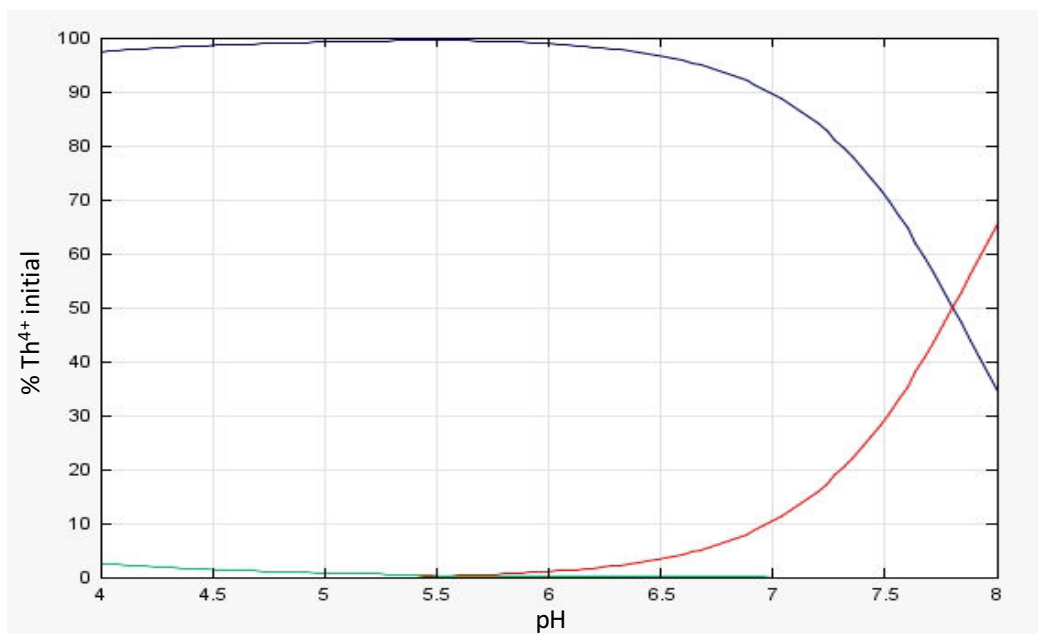


Figure 44 : Spéciation (simulée) des fractions solubles du thorium ($[Th(IV)] = 1\text{ mM}$) en présence de deux équivalents de NTA en fonction du pH avec en bleu $Th(NTA)_2^{2-}$, en vert $(ThNTA)^+$, en orange $(ThOH)^{3+}$ et en rouge $Th(OH)_4(s)$, (logiciel Jchess, BASSIST 2007).

En présence de deux équivalents de NTA la simulation montre qu'à pH 7,0, 90% du thorium est sous forme $Th(NTA)_2^{2-}$ (nous considérerons dans la suite de ce manuscrit que ce complexe est chargé deux fois négativement car les amines sont impliquées dans la complexation) et seulement 10% du thorium initial s'hydrolyserait et précipiterait ($Th(OH)_4$). Ainsi pour l'élaboration de la courbe de charge en thorium, le pH a été fixé à 7,0 par du tampon TBS et le thorium a été protégé par deux équivalents de NTA.

b Courbe de charge du complexe PEI-MC-Th

La courbe de charge associée à la formation du complexe PEI-MC-Th a été élaborée pour des équivalences Th(IV) : monomère de PEI-MC variant entre 0 et 4 en effectuant un dosage basé sur la séparation des formes complexées et moléculaires de thorium. Chaque point de cette courbe a été obtenu à concentration constante de Th(IV) ($6,06 \times 10^{-4}$ M), à volume constant (400 μ L) et dans un milieu TBS à pH 7,0.

Le complexe PEI-MC-Th formé, les formes libres de Th(IV) ont été séparées des formes complexées par ultracentrifugation sur filtres Amicon®. Le complexe PEI-MC-Th a ensuite été minéralisé, puis la quantité de Th(IV) complexée au PEI-MP a été dosée par colorimétrie UV-vis grâce à la formation d'un complexe de xylénol orange (cf. Annexe III). Les résultats sont représentés selon les mêmes conventions graphiques que pour PEI-MC-U (Figure 45).

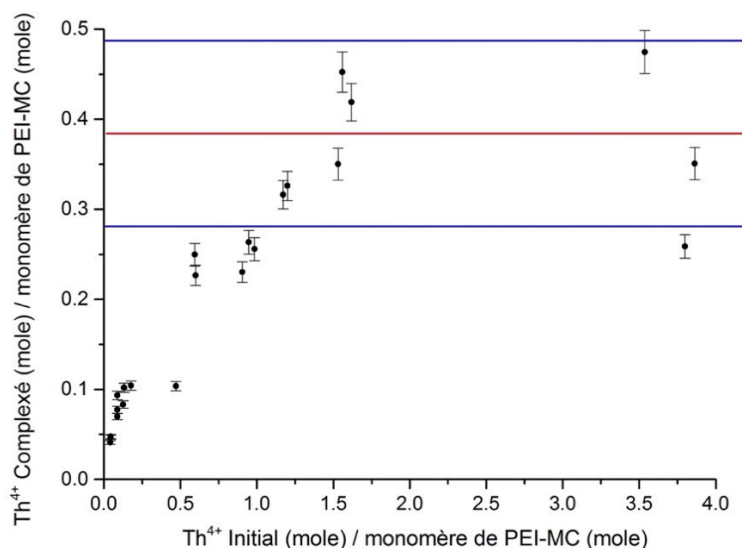


Figure 45 : Courbe de charge du PEI-MC avec le Th(IV). En rouge la charge maximale moyenne en Th(IV) du PEI-MC et son intervalle de confiance en bleu.

La courbe de charge obtenue montre que le PEI-MC, en excès, complexé le thorium de façon linéaire jusqu'à atteindre un plateau, aux environs de 1,25 - 1,75 équivalent $(\text{Th(IV)})_{\text{initial}}$: monomère $[(\text{C}_{11,2}\text{H}_{17,4}\text{N}_{3,4}\text{O}_{5,4}\text{Na}_{2,7})^+\text{Cl}^-]$, symbolisant la saturation du polymère. Ainsi la charge maximale moyenne en Th(IV) du PEI-MC, symbolisée par la ligne rouge sur la figure 45, est de $0,38 \pm 0,10$ mol.mol⁻¹ de monomère, soit $0,24 \pm 0,06$ mg de thorium complexé par mg de PEI-MC.

c Détermination et comparaison des concentrations efficaces médianes CE_{50} et des facteurs de Hill associés à la formation des complexes PEI-MC-Th et DTPA-Th

A partir des données expérimentales qui ont servi à l'élaboration de la courbe de charge il a été possible de représenter les données en faisant apparaître la quantité de Th(IV) complexé en fonction de la concentration d'unité monomérique de PEI-MC $[(C_{11,2}H_{17,4}N_3O_{5,4}Na_{2,7})Cl]_n$ notée dans ce chapitre PEI-MC_{N3} (N3 par homologie au squelette diéthylènetriamine du DTPA). La même courbe a également été tracée en prenant en compte le monomère de PEI-MC analogue au DTPA comportant cinq fonctions carboxylate $[(C_{19}H_{26,5}N_5O_9Na_{4,5})Cl]_n$ noté PEI-MC_{N5}. Le contrôle, lié à la formation du complexe DTPA-Th, a été réalisé lors d'une étude antérieure au sein du laboratoire. La courbe de charge associée à la formation du complexe DTPA-Th a été élaborée pour des équivalences Th(IV) : DTPA variant entre 0 et 4. Chaque point de cette courbe a été obtenu à concentration constante de Th(IV) ($4,09 \times 10^{-4} M$), à volume constant (300 μL) et dans un milieu TBS à pH 7,0. A partir de leurs données il a aussi été possible de tracer la même courbe : quantité de Th(IV) complexé en fonction de la concentration de DTPA.

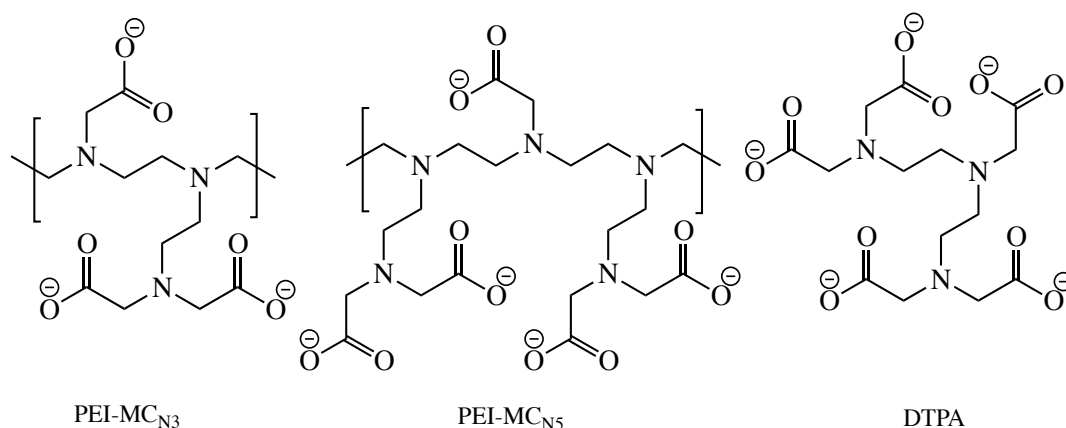


Figure 46 : Monomères de PEI-MC N3 et N5 utilisés pour établir les courbes dose-réponse et le DTPA.

A partir de ces courbes dose-réponse, il est possible d'accéder à la concentration efficace médiane (CE_{50}) et à sa pente (ou facteur de Hill). La CE_{50} représente la concentration pour laquelle la réponse correspondante vaut 50 % de l'efficacité maximale (Figure 47). La pente à la CE_{50} constitue le facteur de Hill. Ce dernier peut être utilisé pour traduire l'effet de coopérativité d'un système multi sites. S'il est supérieur à 1, la coopérativité est positive : l'efficacité de complexation augmente avec son degré d'avancement (le fait de fixer des actinides favorise les futures complexations). S'il est inférieur à 1, il y a anti-coopérativité : l'efficacité de complexation décroît avec son état d'avancement (plus on complexe d'actinides, plus c'est difficile d'en fixer). Un facteur de Hill égal à 1 se traduit par une efficacité de complexation dans laquelle les sites de fixation sont indépendants les uns des autres.

Ces deux données permettent de caractériser l'efficacité de complexation du système étudié. Au niveau de la dose minimale requise, par le biais de la CE_{50} , mais aussi au niveau de la plage de concentration de la dose. En effet plus le facteur de Hill est grand, plus la variation de la dose autour de la CE_{50} est restreinte pour atteindre la réponse maximale ou minimale (loi du tout ou rien). Ainsi, dès lors qu'on atteint et dépasse la CE_{50} , la réponse sera maximale.

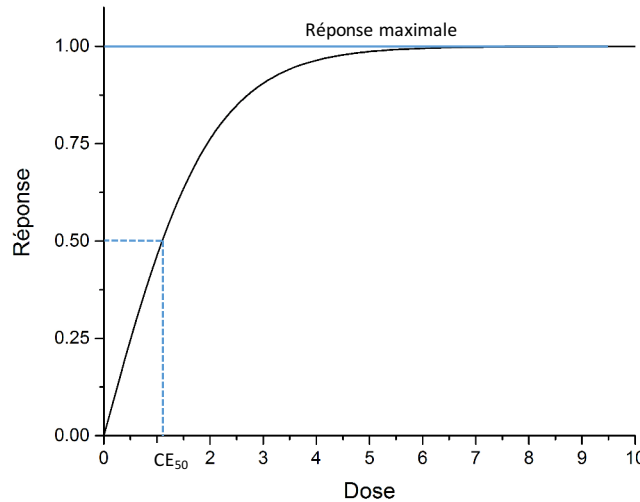


Figure 47 : Exemple de courbe dose-réponse et représentation graphique de la CE_{50} et du facteur de Hill.

Mathématiquement, le modèle généralisé de ce type de courbe dose-réponse est décrit par l'équation à quatre paramètres suivante¹⁴¹ :

$$y = a + \frac{(b-a)}{1 + \left(\frac{c}{x}\right)^n} \quad (\text{Equation 2})$$

Le paramètre « a » représente la réponse minimale en l'absence de dose, « b » représente l'asymptote maximale (réponse correspondant au plateau à la dose optimale), « c » est la concentration efficace médiane (CE_{50}) (concentration à laquelle 50% de la réponse maximale est atteinte) et « n » est le facteur de Hill.

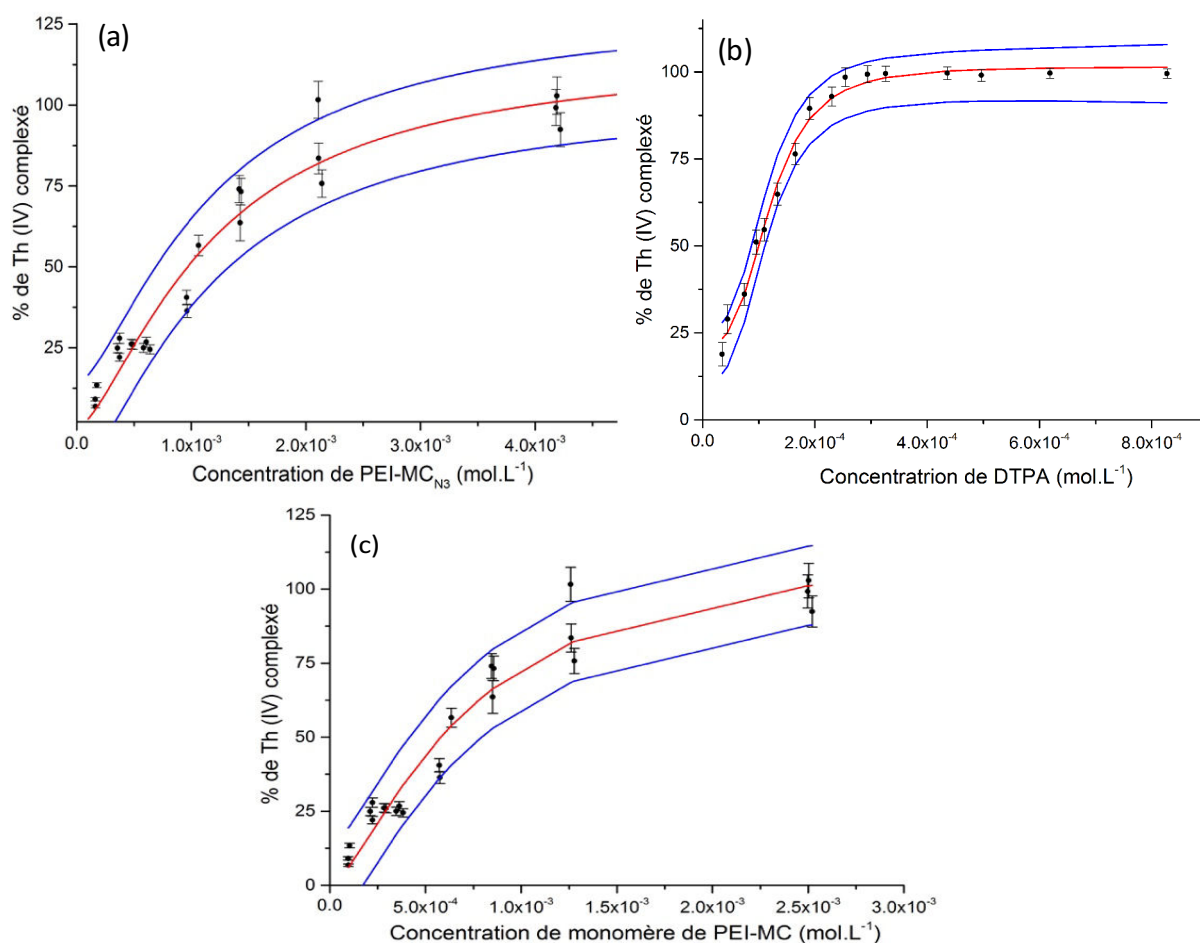


Figure 48 : Courbes dose-réponse représentant la fraction molaire de Th(IV) complexé en fonction des concentrations de PEI-MC_{N3} (a), de DTPA (b) et de PEI-MC_{N5} (c). (Formalisme : en rouge ajustement des points expérimentaux, en bleu intervalle de confiance à 95%).

La figure 48 représente l'ajustement des points expérimentaux avec l'équation à quatre paramètres (équation 2). Ces trois courbes présentent un plateau au environ de 100% de Th(IV) complexé. L'analyse mathématique de ces courbes permet l'extraction de la CE₅₀ et du facteur de Hill. Le paramètre « a » représentant la réponse minimale en l'absence de ligand a été fixé à 0 puisque, comme nous l'avons vu, la présence combinée de NTA et de TBS qui préviennent l'hydrolyse et la précipitation du Th(IV). Les paramètres d'ajustement sont répertoriés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Paramètres obtenus pour les complexes PEI-MC_{N3}-Th PEI-MC_{N5}-Th et DTPA-Th à partir de l'ajustement des valeurs expérimentales par l'équation à quatre paramètres (Equation 2). Le R² traduit la qualité de l'ajustement.

paramètres	a	b	c	n	R ²
PEI-MC _{N3} -Th	0	116 ± 12	11,73 ± 2,13 x10 ⁻⁴	1,47 ± 0,23	0,94
PEI-MC _{N5} -Th	0	117 ± 12	0,71 ± 0,13 x10 ⁻⁴	1,46 ± 0,23	0,94
DTPA-Th	0	106 ± 4	1,27 ± 0,08 x10 ⁻⁴	1,88 ± 0,22	0,97

A l'issue de cette étude, il apparaît que le PEI-MC est un complexant du Th(IV) présentant une efficacité de complexation pour le Th(IV) similaire à celle du DTPA. En effet dans les conditions d'analyse tous les systèmes présentent un maximum d'efficacité d'environ 100% de thorium complexé.

La CE_{50} associée à la formation du complexe PEI-MC_{N3}-Th est cependant environ dix fois plus élevée que celle du contrôle DTPA-Th (égale à $11,73 \times 10^{-4}$ M contre $1,27 \times 10^{-4}$ M). Ceci traduit le fait que le monomère basé sur le squelette de l'homologue structurel du DTPA ne présente pas suffisamment de sites chélatant que le DTPA. La CE_{50} associée à PEI-MC_{N5}-Th est quant à elle, égale à $0,71 \times 10^{-4}$ M, ce qui est environ deux fois plus faible que celle associée à la formation du complexe DTPA-Th. Ceci pourrait confirmer l'importance des cinq fonctions carboxylate pour avoir le site de complexation complet du Th(IV). Ceci est une spéculation car il est évident que le passage du monomère PEI-MC_{N3} à PEI-MC_{N5} permet d'effectuer une translation horizontale de la courbe. Néanmoins, il n'est pas ridicule de dire que le PEI-MC présente une CE_{50} comparable à celle du DTPA vis-à-vis de la complexation du Th(IV).

Tout d'abord il est surprenant de noter que le facteur de Hill du DTPA est bien supérieur à 1 (1,88). En effet, comment considérer une coopérativité, sachant que chaque molécule de DTPA ne comporte qu'un seul site de complexation du Th(IV)? Cette pseudo-coopérativité pourrait être liée aux conditions de dosage où la concentration de DTPA doit être trop élevée pour que les sites de complexation du Th(IV) soit suffisamment éloignés les uns des autres pour être considérés comme indépendants. Ainsi, plusieurs molécules de DTPA pourraient être impliquées dans la complexation d'un cation. Autrement dit, les conditions favorisent une complexation intermoléculaire plutôt qu'intramoléculaire, ce qui se traduit par une coopérativité apparente.

Concernant le PEI-MC, le facteur de Hill, quant à lui, est identique quel que soit le monomère considéré (~ 1,46). Ceci pourrait être lié à l'aspect macromoléculaire qui étirerait la plage utile de concentration dans laquelle se produit le changement de pente qui du coup s'infléchit. Même s'il diminue par rapport au contrôle de DTPA, on note toutefois qu'il demeure supérieur à 1, ce qui semblerait indiquer une certaine coopérativité (réelle du coup) dans le phénomène de coordination du Th(IV).

IV EXAFS du complexe PEI-MC-Th

Afin de sonder l'interaction entre Th(IV) et le PEI-MC en milieu biologique, la sphère de coordination du Th(IV) dans le complexe PEI-MC-Th a été étudiée en spectroscopie EXAFS au seuil L_{III} du thorium (16300 eV). Comme nous l'avons vu précédemment, la complexation du Th(IV) en milieu pseudo-physiologique se fait à partir du complexe $\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}$ pour éviter l'hydrolyse du thorium. Le NTA (acide nitrilotriacétique), comme le PEI-MC, complexe le Th(IV) *via* des fonctions carboxylate. La caractérisation de la sphère de coordination de Th(IV) par spectroscopie EXAFS ne pouvant pas déterminer l'origine des fonctions carboxylate complexantes (NTA ou PEI-MC), il a été décidé de ne pas utiliser de NTA. A la place, un protocole de formation du complexe PEI-MC-Th a été mis en place pour utiliser le large excès de PEI-MC pour empêcher l'hydrolyse du thorium. Le Th(IV) a été complexé au polymère en milieu acide nitrique pH 1,0 puis le pH de la solution contenant ce complexe a été ajusté à 7,0. Ce protocole, du fait du large excès de PEI-MC n'est pas transposable pour l'élaboration d'une courbe de charge.

Ainsi le complexe PEI-MC-Th a été préparé à partir de la dissolution de 4,10 mg de PEI-MC dans 50 μL d'une solution de TBS ($[\text{NaCl}] = 1500 \text{ mM}$, $[\text{Tris}] = 500 \text{ mM}$) à pH 1,0. 22 μL d'une solution de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ ($8,9 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 1,0) sont ensuite ajoutés pour obtenir un rapport Th : monomère de PEI-MC de 0,02. Le volume final de l'échantillon a été fixé à 500 μL de façon à ce que les concentrations finales soient : $[\text{Th}] = 0,4 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$, $[\text{Tris}] = 50 \text{ mM}$. Le pH a été ajusté à 7,0 par ajout de soude à 0,1 M (cf. Annexe V).

Le spectre EXAFS du complexe PEI-MC-Th a ensuite été enregistré. La figure 49 représente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 15.

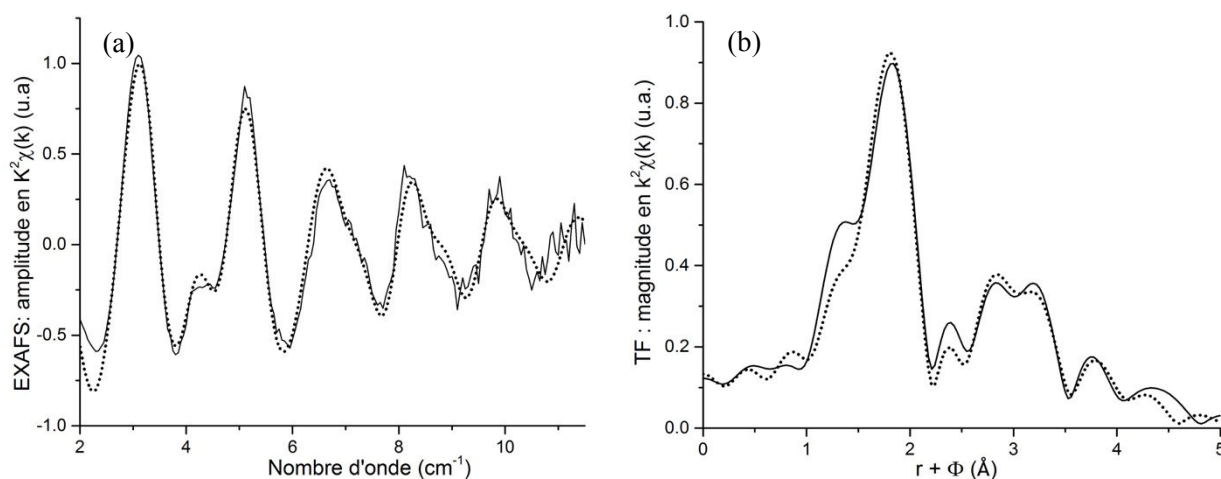


Figure 49 : (a) Spectre EXAFS du PEI-MC-Th au seuil L_{III} du thorium ; (b) transformée de Fourier correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

La stratégie d'ajustement des données EXAFS du complexe PEI-MC-Th est la même que pour le complexe PEI-MC-Pu (cf. Annexe V). Ainsi la première sphère de coordination du Th(IV) dans le complexe PEI-MC-Th est donc composée de 5 atomes d'oxygène et de 3 atomes d'azote situés à des distances d'environ 2,40 et 2,80 Å respectivement. La seconde sphère de coordination du Th(IV) est composée des 5 atomes de carbone α des fonctions carboxylate et de 9 atomes de carbone en position β des fonctions carboxylate situées à 3,42 et 3,58 Å (cf. Figure 42).

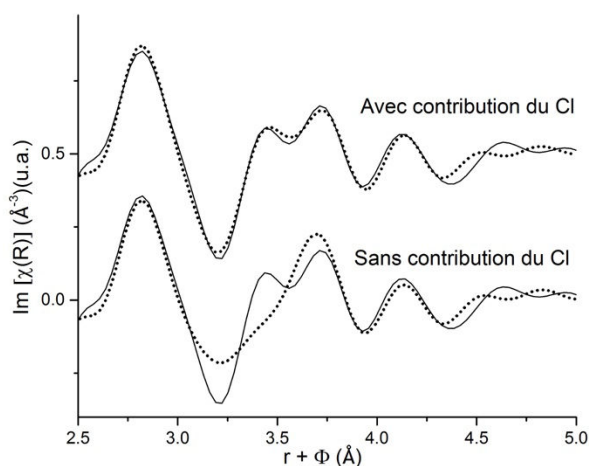


Figure 50 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MC-Th au seuil L_{III} du thorium ; (en haut) avec la contribution de 2,5 atomes de chlore (en bas) sans atome de chlore. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

De façon analogue au complexe PEI-MC-Pu, la contribution d'atomes de chlore doit être envisagée. Comme le montre la figure 50 où est représenté l'ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MC-Th avec et sans la contribution du chlore, l'ajout de 2,5

Chapitre III : Polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC)

atomes de chlore à 3,88 Å augmente la qualité de l'ajustement graphiquement dans la zone comprise entre $r+\Phi = 3,0$ et 4,0 Å et fait diminuer le R_{facteur} de 2,4% à 1,0% et le facteur Q de 0,11 à 0,05 ce qui confirme une augmentation réelle de la qualité de l'ajustement.

Tableau 15 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour le spectre EXAFS du PEI-MC-Th. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte de l'agitation thermique, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est notée entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd et 3 ^{ème} sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MC-Th	5 O à 2,40 (1) Å $\sigma^2 = 0,0038 \text{ \AA}^2$	5 C(α) à 3,42 (1) Å $\sigma^2 = 0,0086 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = 6,26 \text{ eV}$
	3 N à 2,80 (2) Å $\sigma^2 = 0,0360 \text{ \AA}^2$	9 C(β) à 3,58 (2) Å $\sigma^2 = 0,0086 \text{ \AA}^2$	$R_{\text{facteur}} = 1,0\%$ Q = 0,05
		2,5 (5) Cl à 3,88 (2) Å $\sigma^2 = 0,0091 \text{ \AA}^2$	

L'analyse en spectroscopie EXAFS du complexe PEI-MC-Th a permis de définir la sphère de coordination du Th(IV) dans des conditions pseudo-physiologiques.

Comme le montre le tableau 16, les complexes PEI-MC-Th et Th-DTPA partagent le même site de complexation. Dans les deux cas le Th(IV) est entouré de cinq atomes d'oxygène et de trois atomes d'azote constituant la première sphère de coordination. Les couches supérieures de coordination sont quant à elles constituées 5 atomes de carbone en position α et 9 en position β des fonctions carboxylate.

Tableau 16 : Comparaison de la sphère de coordination du complexe PEI-MC-Th formé avec les sphères de coordination du Th(IV) dans les complexes Th-DTPA¹³⁸ et Th-NTA¹³⁹.

PEI-MC-Th	Th-DTPA	Th-NTA
5 O à 2,40 (1) Å	5 O à 2,40 Å	6 O à 2,40 Å
3 N à 2,80 (2) Å	3 N à 2,71 Å	2 N à 2,76 Å
5 C(α) à 3,42 (1) Å	5 C(α) à 3,43 Å	
9 C(β) à 3,58 (2) Å	9 C(β) à 3,50 Å	
2,5 Cl à 3,88 (2) Å		

Il est intéressant de noter que dans le complexe $\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}$, les distances Th-O et Th-N dans ce complexe sont similaires à celles trouvées par spectroscopie EXAFS pour le PEI-MC-Th.

Cette comparaison entre les sites de complexation développés par le PEI-MP, le DTPA et le NTA montre que le PEI-MC est assez flexible pour s'adapter à la géométrie de complexation du Th(IV) et se comporter comme un complexe moléculaire. Quelque soit l'architecture du ligand, les groupements aminocarboxylate assurent une coordinance stable et relativement similaire. Ainsi la présence de la chaîne polymérique n'engendre aucune contrainte stérique particulière, ce qui laisse penser que le PEI-MC peut se comporter comme un pseudo DTPA vis-à-vis du cation tout en étant capable de se distribuer plus largement aux organes. Ceci est un point encourageant pour la suite du projet.

RESUME

Au cours de ce chapitre le PEI-MC un analogue polymérique du DTPA ayant un monomère de formule brut $[(C_{12}H_{19}N_3O_6Na_3)^+Cl]_n$ a été complexé en conditions pseudo-physiologiques (pH 7,0 $[NaCl]=150$ mM) au Pu(IV)(PEI-MC-Pu) et au Th(IV) (PEI-MC-Th).

Le maximum de charge du PEI-MC en Th(IV) est d'environ $0,24$ mg.mg⁻¹ de PEI-MC ($0,38$ mol.mol⁻¹ de monomère de PEI-MC). Le taux de charge maximum du complexe PEI-MC-Pu n'a pas pu être étudié à cause de l'activité spécifique trop importante du Pu-239.

Les CE_{50} et les facteurs de Hill ont pu être extraits des courbes dose-réponse. Pour les complexes PEI-MC-Th, la CE_{50} ($0,71 \times 10^{-4}$ M) est tout à fait comparable à celle trouvée avec le contrôle non polymérique DTPA-Th ($1,27 \times 10^{-4}$ M). Le facteur de Hill semble montrer une certaine coopérativité dans la fixation du Th(IV) (la capacité à complexer s'améliore avec l'avancement de la réaction).

Enfin l'étude de la spéciation du Th(IV) et du Pu(IV) dans les complexes qu'ils forment avec le PEI-MC a été réalisée au moyen de la spectroscopie EXAFS. Dans le cas des complexes de PEI-MC-Pu et PEI-MC-Th, les deux actinides (IV) sont complexés de façon très similaires par cinq fonctions carboxylate et trois amines sont dans leur sphère de coordination. Ce mode de complexation a déjà été décrit précédemment pour les complexes Th-DTPA et Pu-DTPA¹³⁸.

D Discussion

Cette étude a d'ores et déjà établi que le PEI-MC était un agent complexant de l'uranyle (VI) du Pu(IV) et du Th(IV). Cependant le PEI-MC a des modes de complexation qui diffèrent selon le degré d'oxydation et la nature de l'actinide chélaté.

Dans le complexe PEI-MC-U, dont les données EXAFS ont été corroborées par des calculs de dynamique moléculaire, l'uranyle est complexé par quatre fonctions carboxylate dont une bidente, qui proviennent de trois monomères. Au vu des distances $U-O_{\text{mon}}$ et $U-O_{\text{bid}}$ obtenues pour le complexe PEI-MC-U au cours de cette étude qui sont similaires à celles rapportées pour des complexes de carbonate d'uranyle ($U-O_{\text{mon}} = 2,28 \text{ \AA}$, $U-O_{\text{bid}} = 2,47 \text{ \AA}$) il semblerait que le PEI-MC soit assez flexible pour ne pas contraindre la sphère de coordination de l'uranyle. Le PEI-MC possède donc certaine analogie avec des ligands moléculaires de types carbonates.

Ceci est intéressant pour des applications de décontamination car le carbonate de calcium est actuellement la contre-mesure utilisée pour les cas de contamination par l'uranyle. Cependant le PEI-MC de par sa taille devrait être en mesure de se distribuer plus largement aux organes.

Tableau 17 : Résultats obtenus pour les taux de charge maximum du PEI-MC avec l'uranyle et le Th(IV) et les conclusions de spéciation des cations complexés au PEI-MC.

	PEI-MC-U	PEI-MC-Th	PEI-MC-Pu
Charge max :			
mol.mol ⁻¹ de monomère	0,69 ± 0,10	0,38 ± 0,10	
mg.mg ⁻¹ de monomère	0,49 ± 0,07	0,24 ± 0,06	
CE ₅₀ (M)		0,71 ± 0,13 x10 ^{-3§}	
Facteur de Hill		1,46 ± 0,23 [§]	
EXAFS :			
Paramètres	2,9 O _{mon} à 2,31 Å	5 O à 2,40 Å	5 O à 2,34 Å
d'ajustement	2,1 O _{bid} à 2,45 Å	3 N à 2,80 Å	3 N à 2,66 Å
	2,9 C _{mon} à 3,41 Å	5 C(α) à 3,42 Å	5 C(α) à 3,38 Å
Sphère de coordination	3 COO ⁻ monodentes	5 COO ⁻	5 COO ⁻
du cation	1 COO ⁻ bidente	3 N	3 N

[§] monomère PEI-MC_{N5}

Sur la base des données EXAFS, le Pu(IV) et le Th(IV) dans les complexes PEI-MC-Pu et PEI-MC-Th, semblent être entourés de cinq fonctions carboxylate.

On peut noter que les premières sphères de coordination du Pu(IV) et du Th(IV) sont complétées par trois atomes d'azote à des distances respectives de 2,67 Å et à 2,77 Å. Il est difficile de conclure sur la participation des atomes d'azote dans le processus de coordination des actinides (IV) sans avoir eu recours à des outils de chimie théorique car les atomes d'oxygène et d'azote ayant des nombres de masse proches (16 et 14), ils sont très similaires du point de vue de leurs propriétés de rétrodiffusion. Il est également impossible d'exclure la participation de molécule d'eau, en quantité variable, dans la sphère de coordination du Pu(IV) et du Th(IV). Néanmoins au vu des distances An(IV)-O, An(IV)-N et An(IV)...C(α) le PEI-MC et le DTPA semblent former le même polyèdre de coordination des actinides (IV). Ce qui démontre que le PEI-MC paraît adapté pour la complexation du Pu(IV) (résumé des données Tableau 17).

La différence de mode de complexation entre l'uranyle (VI) et les actinides (IV) est logique. Ainsi le site de complexation de l'uranyle (VI) est composé de quatre fonctions carboxylate contre cinq pour les actinides (IV). Ces nombres sont bien sûr à considérer avec précaution. De plus la sphère de coordination de ces derniers semble complétée par trois atomes d'azote. Cette différence de site de complexation entre ces deux actinides s'explique par la présence des deux oxygènes axiaux de l'uranyle qui occasionnent un encombrement stérique important et l'obligent à se coordonner au PEI-MC uniquement selon son plan équatorial. Le PEI-MC étant l'analogue polymérique du DTPA il est logique que son affinité pour les cations soit en relation avec celle du DTPA. Ce dernier a de plus grandes affinités pour les actinides (IV) que pour l'uranyle ($\log \beta$: DTPA-U = 11,5 ; DTPA-Th(IV)=26,6 ; DTPA-Pu(IV)=29,5)^{138,142}.

A l'issue des études de capacités de charge du PEI-MC avec l'uranyle (0,69 mol.mol⁻¹) et avec le Th(IV) (0,38 mol.mol⁻¹) il apparaît que le PEI-MC est capable de complexer environ deux fois plus d'uranyle que de Th(IV). Ceci est surprenant compte tenu des résultats de spectroscopie EXAFS qui présentent un site de complexation du Th(IV) analogue à celui du DTPA et une très forte affinité de ce dernier pour les actinides (IV). En l'absence d'ions compétiteurs cette différence de capacité de charge peut s'expliquer par les différences de mode de coordination du PEI-MC vis-à-vis de l'uranyle (VI) et du Th(IV).

Il est intéressant de noter que les distances Th-O, Th-N et Pu-O, Pu-N du site de complexation des actinides (IV) sont environ 0,1 Å plus courtes dans le cas du complexe de plutonium. Ce phénomène a déjà été remarqué pour les complexes Th-DTPA et Pu-DTPA¹³⁸ et correspond au phénomène de contraction actinidique.

D'après les résultats obtenus en spectroscopie EXAFS, le PEI-MC peut être considéré comme l'analogue polymérique du DTPA pour la complexation des actinides (IV). Au cours de ce chapitre il a été possible, à partir des courbes dose-réponse associées à la formation des complexes PEI-MC-Th et DTPA-Th, de comparer les CE_{50} et les facteurs de Hill de ces deux complexes. Ces valeurs sont très comparables pour les deux systèmes. Cependant une différence d'efficacité entre le PEI-MC et le DTPA pourrait trouver une explication thermodynamique liée à la réduction d'ordre globale du système plus importante dans le cas d'une complexation polymérique. Cette hypothèse n'est valable qu'à condition que les affinités entre DTPA-Th et PEI-MC-Th soient du même ordre de grandeur.

D'après les valeurs des facteurs de Hill (>1) la formation des complexes PEI-MC-Th et DTPA-Th est basée sur un phénomène coopératif entre les sites de complexation. Dans le cas du DTPA-Th où chaque molécule correspond à un site de complexation qui est spatialement isolé cette coopérativité est surprenante. Surtout que le complexe est de type 1 : 1.

Imaginons maintenant une contamination fictive avec de l'uranyle (IV) ou du Pu(IV) sous forme soluble. Il est possible d'utiliser les capacités de charge maximale en uranyle et en Th(IV) du PEI-MC définies précédemment pour estimer la quantité de PEI-MC nécessaire pour décorporer l'ensemble de l'uranyle ou du Pu(IV) en cas de contamination humaine. Bien sûr cette mise en situation est hypothétique car elle ne tient pas compte de la compétition des cations biologiques ni de la bio-cinétique de distribution du polymère ou de l'actinide. L'uranyle est retenu principalement dans les reins et les os (25% et 15%) alors que le plutonium est retenu principalement dans l'os et le foie (50 et 30%).

Si une personne est contaminée avec 198 μg d'uranyle, ce qui correspond à cinq fois la quantité admise par jour pour une personne de 70 kg (la dose journalière admise par l'OMS est de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'uranium élémentaire), alors environ 59,5 μg d'uranyle seraient retenus dans ses os et ses reins. Pour décorporer cette quantité d'uranyle il faudrait, en supposant que 10% du PEI-MC se distribue à l'os et aux reins, 1,3 mg de PEI-MC.

Maintenant si cette même personne est contaminée par 35 μg de Pu(IV) soit 80 kBq de Pu-239 (activité incorporée correspondant à la valeur de la dose équivalente réglementaire annuelle (0,02 Sv)), alors environ 30 μg seraient retenus au niveau de l'os et du foie. Pour décorporer cette quantité de Pu(IV) il faudrait, en supposant que 10% du PEI-MC se distribue à l'os et au foie, et que le PEI-MC a le même taux de charge en Th(IV) et en Pu(IV), 1,3 mg de PEI-MC.

Ces quantités, en supposant que la toxicité soit tolérable, ne semblent pas démesurées par rapport aux posologies habituelles d'autres drogues couramment utilisées (plusieurs grammes de DTPA peuvent être injectés en cas de traitement de longue durée).

E Références

- (128) Masotti, A.; Giuliano, A.; Ortaggi, G. Efficient Complexation-Ultrafiltration Process for Metal Ions Removal from Aqueous Solutions Using a Novel Carboxylated Polyethylenimine Derivative (PEI-COOH). *C.A.C.* **2010**, *6*, 37–42.
- (129) Deng, S.; Ting, Y.-P. Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu(II), Pb(II) and Ni(II). *Water Research.* **2005**, *39*, 2167–2177.
- (130) Ghoul, M.; Bacquet, M.; Crini, G.; Morcellet, M. Novel sorbents based on silica coated with polyethylenimine and crosslinked with poly(carboxylic acid): Preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *90*, 799–805
- (131) Goebbert, D. J.; Garand, E.; Wende, T.; Bergmann, R.; Meijer, G.; Asmis, K. R.; Neumark, D. M. Infrared Spectroscopy of the Microhydrated Nitrate Ions $\text{NO}_3^-(\text{H}_2\text{O})_{(1-6)}$. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 7584–7592.
- (132) Lucks, C.; Rossberg, A.; Tsushima, S.; Foerstendorf, H.; Scheinost, A. C.; Bernhard, G. Aqueous Uranium(VI) Complexes with Acetic and Succinic Acid: Speciation and Structure Revisited. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12288–12300.
- (133) Palacios, E. G.; Juárez-López, G.; Monhemius, A. J. Infrared spectroscopy of metal carboxylates. *Hydrometallurgy* **2004**, *72*, 139–148.
- (134) Newville, M. Fundamentals of XAFS. *revi. Mineral. geochem.* **2004**, 1–43.
- (135) Denecke, M. A.; Reich, T.; Bubner, M.; Pompe, S.; Heise, K. H.; Nitsche, H.; Allen, P. G.; Bucher, J. J.; Edelstein, N. M.; Shuh, D. K. Determination of structural parameters of uranyl ions complexed with organic acids using EXAFS. *J. Alloys Compd.* **1998**, *271-273*, 123–127.
- (136) Lee, M. H.; Park, Y. J.; Kim, W. H. Absorption spectroscopic properties for Pu(III, IV and VI) in nitric and hydrochloric acid media. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2007**, *273*, 375–382.
- (137) Rusin, P. A.; Clark, D. L.; Quintana, L.; Brainard, J. R.; Strieteimeier, B. A.; Talt, C. D.; Ekberg, S. A.; Palmer, P. D.; Newton, T. W. Solubilization of plutonium hydrous oxide by iron-reducing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *28*, 1686–1690.
- (138) Aupiais, J.; Bonin, L.; Auwer, Den, C.; Moisy, P.; Siberchicot, B.; Topin, S. On the use of speciation techniques and ab initio modelling to understand tetravalent actinide behavior in a biological medium: An IV DTPA case. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3759–3770.
- (139) Bonin, L.; Guillaumont, D.; Jeanson, A.; Auwer, Den, C.; Grigoriev, M.; Berthet, J. C.; Hennig, C.; Scheinost, A.; Moisy, P. Thermodynamics and Structure of Actinide(IV) Complexes with Nitrilotriacetic Acid. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 3943–3953
- (140) Ansoborlo, E.; Prat, O.; Moisy, P.; Auwer, Den, C.; Guilbaud, P.; Carriere, M.; Gouget, B.; Duffield, J.; Doizi, D.; Vercouter, T.; Moulin, C.; Moulin, V. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* **2006**, *88*, 1605–1618
- (141) Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$ estimation. *Pharmaceut. Statist.* **2011**, *10*, 128–134.
- (142) Ansoborlo, R.; Amekraz, B.; Moulin, C.; Moulin, V. R.; Taran, F. D. R.; Bailly, T. O.; Burgada, R.; Heng Napoli, M.-H. L. N.; Jeanson, A. L.; Auwer, Den, C.; Bonin, L.; Moisy, P. Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chimie* **2007**, *10*, 1010–1019.

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Le polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP) est issu de la fonctionnalisation du PEI par des groupements méthylène phosphonate. Ces fonctions, dérivées des groupements phosphate, ont montré, en plusieurs occasions, leur capacité à complexer des cations et il semblerait qu'elles aient une affinité pour les ions uranyles. Dans l'hydroxyapatite, constituant de la matrice osseuse, les groupements phosphate sont liés au calcium et sont capables de capter des lanthanides¹⁴³. Dans l'autunite ou la méta-autunite, espèces minérales de phosphate d'uranium et calcium hydratées, les groupements phosphate sont liés à l'uranyle¹⁴⁴. L'agent chélatant HEDP (acide 1-hydroxyethane-1,1'-diphosphonique) est capable de chélater l'uranyle avec ses fonctions bisphosphonates¹⁴⁵.

Le PEI-MP, grâce à un taux de fonctionnalisation élevé en fonctions phosphonate, a été envisagé pour la scintigraphie osseuse. Dans ce contexte il a été complexé avec du technétium (^{99m}Tc) et de l'étain (^{117m}Sn) et a fait l'objet de plusieurs études de bio-distribution^{146,147}. Les auteurs rapportent qu'une fois injectés en intraveineuse à des primates, les complexes PEI-MP-Tc-99m et PEI-MP-Sn-117m, de différents poids moléculaires, se distribuent aux organes. Ainsi le foie, les reins et l'os cortical font partie des cibles de ces complexes avec des quantités retenues variant selon le type de métal et le poids moléculaire du PEI-MP. De 5 à 22 % de la quantité de complexe de PEI-MP peut être retenue par l'os cortical avec une période de demi-résidence supérieure à quatre heures. Le foie et les reins retiennent quant à eux 20 % en moyenne du complexe injecté (Tableau 18-19).

Tableau 18 : Biodistribution et $t_{1/2}$ de résidence dans les organes de complexes PEI-MP-Sn-117m de différents poids moléculaires injectés par intraveineuse (iv) à des primates^{146,147}.

Fraction ^{117m} Sn	Maximum de charge % et $t_{1/2}$						Urine (%)	Sang $t_{1/2}$
	Sang	Foie	Rein	Poumon	Rate	Os		
3-8 kDa	17 %	13 %	13 %	13 %	11%	22 %	55 %	12 min
	8 min	10 min	12 min	12 min	/	> 4 h		
8-10 kDa	22 %	24%	13 %	16 %	10 %	5 %	25 %	20 min
	22 min	> 4 h	10 min	> 4 h	> 4 h	> 4 h		
10-30 kDa	24±2,7 %	23±1 %	15±1,1 %	11±1,4 %	10±1,3 %	5±1,3 %	40 %	5 min
	44±12 min	> 4 h	30±6 min	> 120 min	> 4 h	> 4 h		

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Tableau 19 : Biodistribution et $t_{1/2}$ de résidence dans les organes de complexes de PEI-MP-Tc-99m de différents poids moléculaires injectés en iv à des primates^{146,147}.

Fraction ^{99m} Tc	Maximum de charge et $t_{1/2}$						Urine	Sang $t_{1/2}$
	Sang	Foie	Rein	Poumon	Rate	Os		
3-10 kDa	15±4 % 10±1min	16±1 % 90±22min	36±4 % > 4 h	8±2 % 10±1,5min	10±1 % 75±2min	8±1 % > 4 h	40,6 %	5 min
10-30 kDa	15±3 % 10±1,5min	20±2 % 22±3min	18±4 % 20±3min	13±4 % 15±3min	13±1 % 60±9min	18±1 % > 4 h	52,5 %	6 min

Les contres mesures actuelles (DTPA, CaCO₃) ne permettent pas l'excrétion des actinides retenus dans le compartiment osseux. En cas de contamination avec de l'uranium par exemple, largement retenu dans la matrice osseuse, les agents chélatants usuels se révèlent inefficaces. Le développement d'un agent chélatant macromoléculaire capable de cibler l'os et ayant des fonctions complexantes phosphonate, qui ont, par ailleurs, prouvé leur efficacité pour la complexation de l'uranyle¹⁴⁸, pourrait donner un nouvel élan au développement d'agents chélatants adaptés aux cas de contaminations par l'uranium. Les actinides (IV) étant aussi retenus dans la région osseuse (50% pour le Pu(IV)), le PEI-MP pourrait augmenter leur excrétion et atteindre des compartiments où le DTPA n'a aucun effet (os, foie, tissus mous).

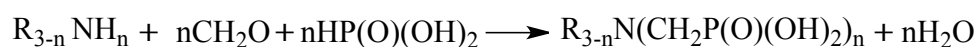
Dans la suite de ce travail de thèse, nous avons donc entrepris la complexation en milieu pseudo-physiologique du PEI-MP avec des ions U(VI) et Th(IV). L'étude physico-chimique des complexes PEI-MP-U et PEI-MP-Th en milieu physiologique est une première étape vers l'optimisation et l'utilisation de ces macromolécules chélatantes pour la décorporation de ces actinides.

A Synthèse et caractérisation du PEI-MP

I Synthèse

Le Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP) utilisé dans ce travail a été synthétisé à partir du même PEI branché (bPEI, 25kDa, Sigma-Aldrich) utilisé précédemment. La fonctionnalisation est effectuée en une seule étape selon une réaction de type Mannich décrite par K. Moedritzer et R.R. Irani¹⁴⁹.

Ce type de réaction implique une (poly)amine, du formaldéhyde et de l'acide phosphoreux, et procède selon l'équation générale suivante :



avec $n = 1, 2$ ou 3

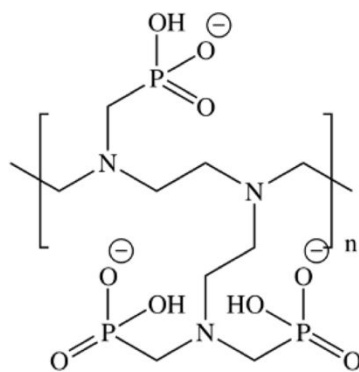
En fin de réaction, le produit est basifié avec Na_2CO_3 et purifié par ultrafiltration pour donner le PEI-MP sous forme de sel (cf. Annexe II).

II Détermination de la fonctionnalisation du PEI-MP

a Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire (37.25 % C, 14.39 % N, 5.09 % H) du PEI-MP donne un rapport molaire C/N de 2,59. En se basant sur des monomères moyens respectant la répartition des amines I/II/III proche de 33:33:33¹⁵⁰, le monomère de formule brute $(C_6H_{15}N_3)_n$ pour le PEI initial et $(C_9H_{24}N_3O_9P_3)_n$ pour le PEI-MP résultant, ce rapport molaire C/N expérimental, comparé à un C/N de 2 (pour le PEI initial), permet de calculer le taux de fonctionnalisation. Celui-ci est quantitatif (100%).

Dans la suite de ce chapitre, le monomère $[(C_9H_{18}N_3O_9P_3Na_6Cl)_n]$, ayant trois fonctions phosphonate, représenté sur la figure 51 a été choisi pour tous les calculs d'équivalence cation : monomère de PEI-MP.



Polyéthylèneimine méthyle phosphonate

Figure 51 : Représentation schématique du monomère de PEI-MP (état de protonation arbitraire).

b Spectroscopie IR

Le spectre infrarouge du PEI-MP à pH 7,0 (Figure 52) laisse apparaître sans ambiguïté les vibrations d'élongation des fonctions phosphonate $\nu(\text{P-O})$ entre 1200 et 850 cm^{-1} . Le massif d'absorption des phosphonates est séparé en trois ou quatre bandes¹⁵¹. Les bandes de plus haute énergie, centrées à 1130 et 1103 cm^{-1} correspondent aux $\nu_{\text{as}}(\text{P-O})$ des fonctions phosphonate protonées et déprotonées¹⁵²⁻¹⁵³ alors que les bandes de plus basses énergies, centrées sur 987 et 978 cm^{-1} correspondent aux $\nu_{\text{s}}(\text{P-O})$ des fonctions phosphonate protonées et déprotonées. Enfin la bande d'absorption située à 910 cm^{-1} correspond au $\nu_{\text{as}}(\text{P-OH})$.

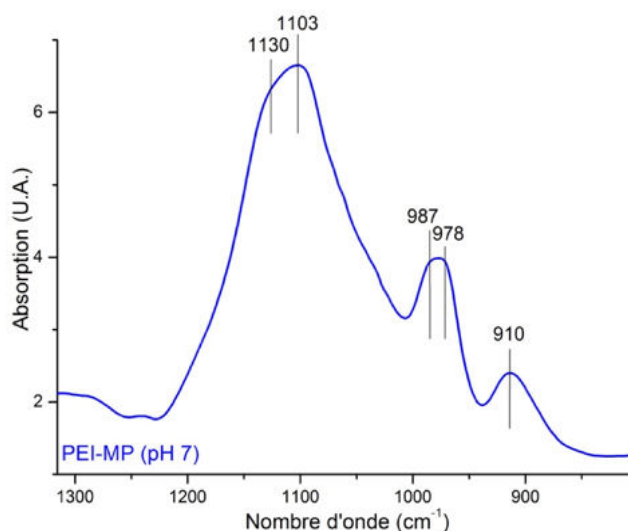


Figure 52 : Spectre infrarouge du PEI-MP à pH 7,0.

B Caractérisation physico-chimique du complexe PEI-MP-UO₂

La capacité du PEI-MP à complexer l'uranyle en milieu physiologique, a été étudiée de la même façon que pour le PEI-MC.

Ainsi, l'étude physico-chimique a consisté en :

- La mesure de la courbe de charge du polymère avec l'uranyle après des cycles complexation/ultracentrifugation/lavage puis dosage, par ICP-OES, de l'élément U dans les différentes fractions.
- La mise en évidence des fonctions impliquées dans la complexation par spectroscopie IR.
- L'étude de la sphère de coordination du cation par spectroscopie EXAFS.

Dans un deuxième temps, nous avons orienté l'étude vers les applications biologiques en mesurant la capacité du PEI-MP à perturber la sorption de l'uranyle sur des matrices osseuses biomimétiques synthétiques qui nous ont été fournies par D. Bourgeois de l'Institut de chimie séparative de Marcoule (ICSM).

De la même façon que précédemment, le milieu biologique a été simplifié en une solution aqueuse de tampon salin trishydroxyméthylaminométhane (TBS) à pH 7,0 avec des concentrations en uranium comprises entre 10⁻² et 10⁻⁴ M.

I Courbe de charge du complexe PEI-MP-U

La première étape de la caractérisation du système PEI-MP-U a été de définir, en milieu pseudo-physiologique, la capacité de charge maximum du polymère avec l'uranyle. Pour cela, la fraction d'uranyle complexé par le PEI-MP a été quantifiée par ICP-OES, pour des équivalences uranyle : monomère de PEI-MP initial variant de 0 à 3. L'excès d'uranyle (non complexé) a été séparé par ultrafiltration puis dosé par ICP-OES (cf. Annexe II).

a Influence du pH sur le système PEI-MP-U

Les conditions expérimentales dans lesquelles la courbe de charge du PEI-MP avec l'uranyle a été établie sont similaires à celles utilisées pour le complexe PEI-MC-U. Là aussi, le milieu biologique a été simplifié par une solution de TBS (pH 5,0 et force ionique fixée à 0,15 M) pour éviter la précipitation de l'uranyle en excès (cf. Chapitre III B).

Le PEI-MP étant un polyaminophosphonate, sa capacité à complexer les métaux va donc dépendre de l'état de protonation de ses fonctions acide phosphonique. Les pKa de ces dernières se situant autour de 2 pour la première acidité et de 7 pour la deuxième (Figure 53).

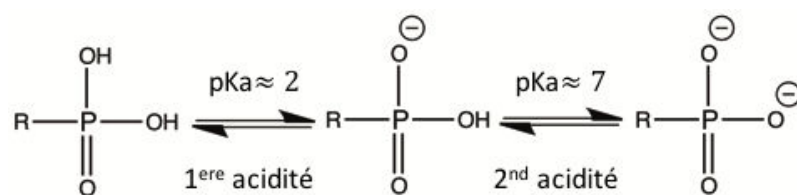


Figure 53 : Schéma des déprotonations successives de la première puis de la seconde acidité de la fonction acide phosphonique.

Pour l'élaboration de la courbe de charge, le pH a dû être fixé à 5,0 pour éviter la formation d'hydroxydes d'uranyle qui sont peu solubles. Les diagrammes de spéciation de l'uranyle à pH 5,0 et à pH 7,0 ont été largement décrits dans le chapitre III.

Les spectres infrarouge du PEI-MP à pH 5,0 et à pH 7,0 ont donc été comparés pour vérifier que l'état de protonation du PEI-MP dans ces conditions expérimentales n'est pas incompatible avec une réaction de complexation (Figure 54).

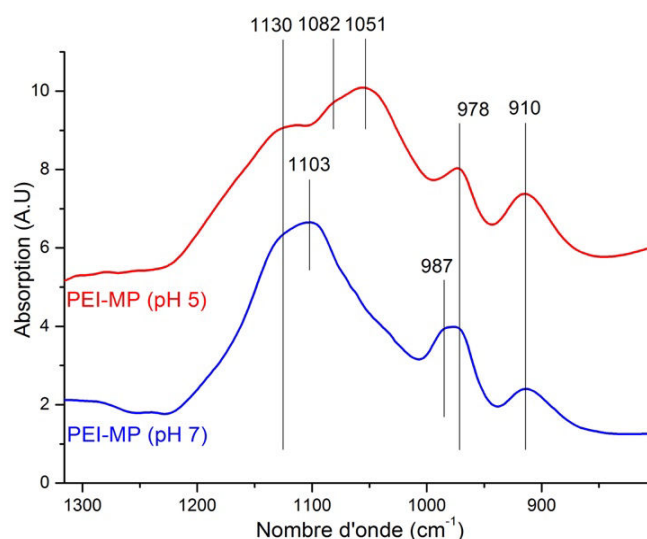


Figure 54 : Spectres infrarouge du PEI-MP à pH 7,0 (bleu) et à pH 5,0 (rouge) normalisés sur la bande d'absorption à 1652 cm^{-1} .

La comparaison des deux spectres montre qu'à pH 5,0, les principales différences proviennent des bandes d'absorption situées à 1082 et 1051 cm^{-1} qui résultent de la protonation de la seconde acidité des fonctions phosphonate. Ceci se traduirait, pour les fonctions phosphonate du PEI-MP à pH 5,0, par une charge totale de -1. Seules les fonctions liées à la première acidité sont totalement déprotonnées alors que celles liées à la seconde, sont neutres à ce pH. Cependant, l'équilibre de complexation du cation entre en compétition avec l'équilibre de protonation de la seconde fonction acide, ce qui permet de penser qu'à ce pH (5,0) la complexation sera favorisée (Figure 55).

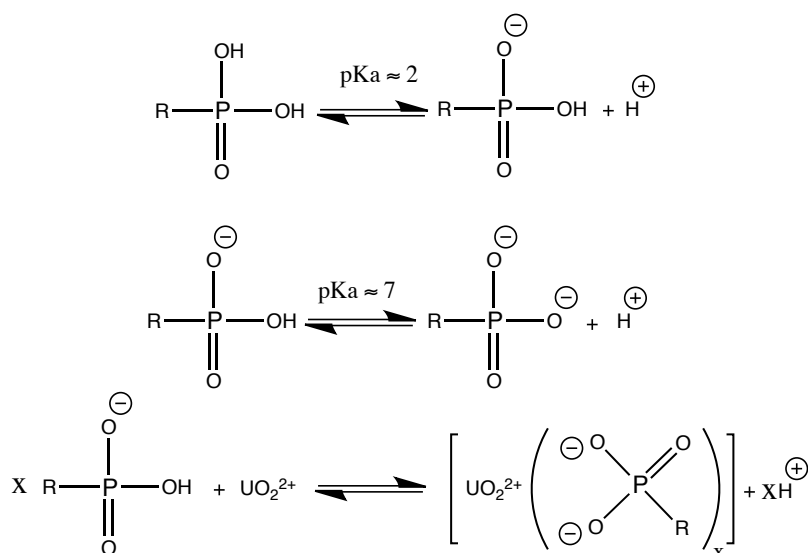


Figure 55 : Equations chimiques décrivant la première et seconde acidité des fonctions phosphonate ainsi que leur complexation au cation uranyle.

b Courbe de charge du complexe PEI-MP-U

Le taux de charge maximal en U du PEI-MP a été déterminé, de la même façon que pour le complexe PEI-MC-U, par un dosage suivi par ICP-OES de l'uranium. Les résultats sont représentés sous la forme d'un graphique (Figure 56) exprimant la quantité d'uranyle complexée par monomère de PEI-MP, en fonction de la quantité d'uranyle initiale par monomère de PEI-MP.

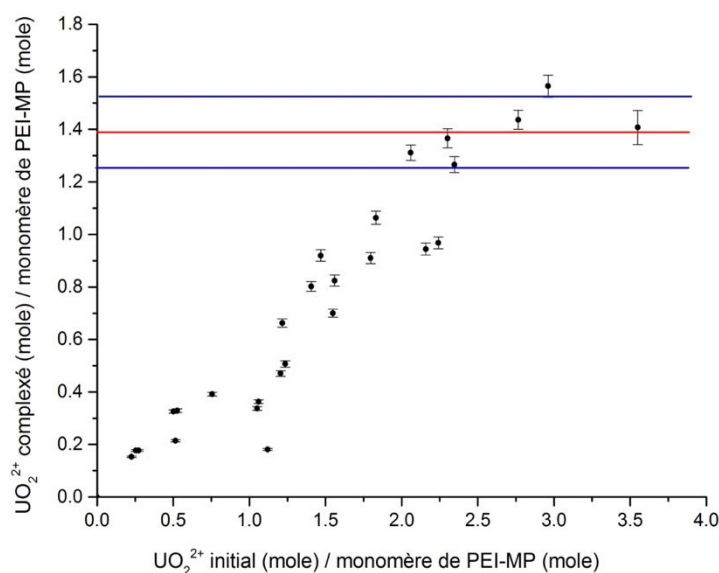


Figure 56 : Courbe de charge du PEI-MP avec l'uranyle à pH 5,0 avec en rouge, la charge maximale moyenne en uranyle et en bleu l'intervalle de confiance à 95%.

Cette courbe de charge montre que le PEI-MP complexe l'uranyle selon une relation linéaire jusqu'à atteindre un plateau situé entre 2,0 et 2,5 équivalents (uranyle initial : monomère de PEI-MP $[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_3\text{Na}_6\text{Cl}]_n$), indiquant la saturation des fonctions phosphonate. En considérant le régime de saturation atteint, la charge maximale moyenne en uranyle du PEI-MP symbolisée par la ligne rouge est de $1,39 \pm 0,14 \text{ mol.mol}^{-1}$ de monomère, soit $0,66 \pm 0,07 \text{ mg}$ d'uranyle complexé par mg de PEI-MP. Notons que des phénomènes d'hydrolyse de l'uranyle libre peuvent parasiter les résultats pour les points situés aux plus grandes équivalences et ainsi majorer la charge maximale moyenne en uranium du PEI-MP.

Contrairement aux complexes polymériques de thorium (cf. Chapitre III B) il n'a pas été possible de tracer une courbe dose-réponse de type : % d'uranyle complexée = f (concentration de monomère de PEI-MP) à partir des points de cette courbe de charge. En effet, des équivalences uranyle : monomère de PEI-MP plus grandes (>4) auraient été nécessaires pour atteindre la réponse minimale. Pour ces points, la quantité d'uranyle complexé est dominée par des phénomènes d'hydrolyse. Il n'a donc pas été possible de déterminer l' EC_{50} et le facteur de Hill associés à la formation du complexe PEI-MP-U.

II Spectroscopie infrarouge du complexe PEI-MP-U

La caractérisation des fonctions chimiques du PEI-MP impliquées dans la complexation de l'uranyle a été étudiée par spectroscopie infrarouge (mode réflectance totale atténuée (ATR)) en comparant des solutions de PEI-MP libre (10 mg.L⁻¹) et de PEI-MP-U (0,4 équivalent uranyle : monomère) déposées puis séchées sous forme de film sur le diamant ATR. Les spectres, présentés sur la figure 57, ont été enregistrés à pH 7,0.

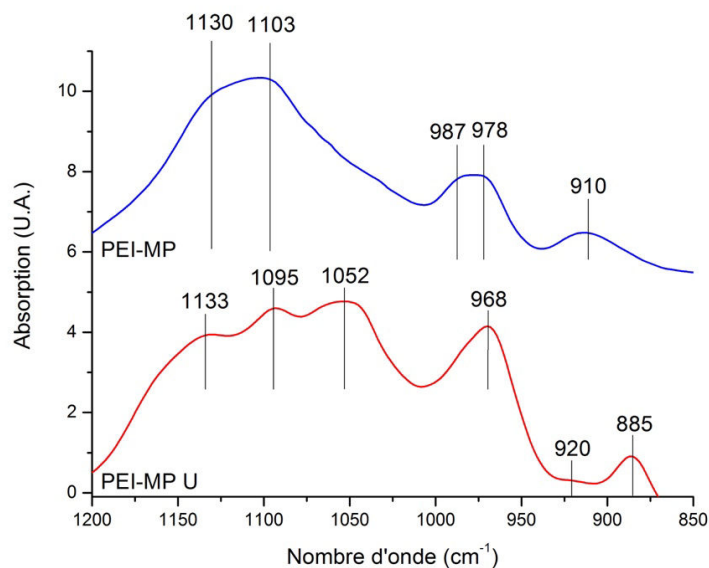


Figure 57 : Spectres infrarouge du PEI-MP libre (bleu), du PEI-MP-U (milieu nitrate) (rouge) à pH 7,0.

Le spectre IR du complexe PEI-MP-U présente un épaulement autour de 920 cm⁻¹ correspondant à la bande de vibration antisymétrique des élongations des liaisons trans dioxo de l'uranyle ($\nu_{as}(\text{UO}_2^{2+})$). Cette bande de vibration est décalée vers les faibles énergies par rapport au complexe penta-aquo uranyle¹⁵⁴ rapporté à 962 cm⁻¹ ce qui indique que l'uranyle est complexé à des ligands électroattracteurs. La présence de l'uranyle influe également sur les bandes attribuées aux fonctions phosphonate. Ainsi les deux bandes de plus haute énergie, référencées à 1130 et 1103 cm⁻¹ sur le spectre du PEI-MP libre, se séparent en trois bandes centrées autour de 1133, 1095 et 1052 cm⁻¹. La présence de l'uranyle provoque un décalage hypochromique de la bande de vibration $\nu_s(\text{P-O})$ des fonctions déprotonées qui est à l'origine de cette séparation. La bande de plus faible énergie, référencée à 910 cm⁻¹, est décalée vers les plus basses énergies, à 885 cm⁻¹. Enfin la deuxième bande de vibration correspondant aux $\nu_s(\text{P-O})$ centrée sur 978 cm⁻¹ subit une modulation d'intensité due à la complexation.

Les modifications que subissent les bandes des fonctions phosphonate liées à la présence de l'uranyle, et la bande de vibration trans dioxo de l'uranyle à 920 cm⁻¹ indiquent bien que l'uranyle est complexé par les fonctions phosphonate du PEI-MP.

III EXAFS du complexe PEI-MP-U

Le spectre EXAFS du complexe PEI-MP-U a été enregistré au seuil L_{III} de l'uranium pour une équivalence uranyle : monomère de PEI-MP de 0,01. La figure 58 présente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 20.

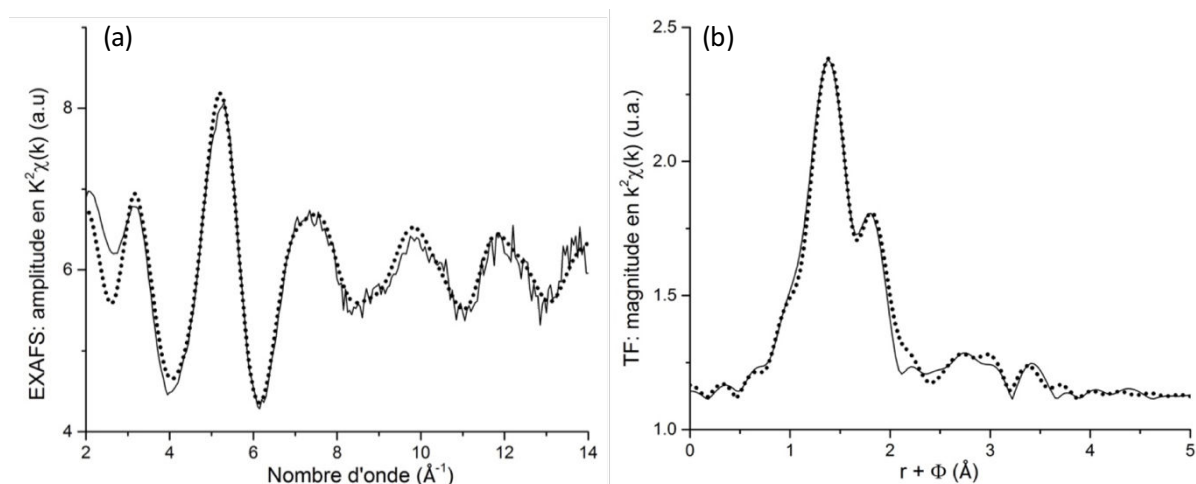


Figure 58 : (a) Spectre EXAFS du complexe PEI-MP-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (b) transformée de Fourier correspondante. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Le module de la transformée de Fourier (Figure 56b) laisse apparaître une contribution intense à $r+\Phi = 1,50 \text{ \AA}$ et un épaulement à $r+\Phi = 1,90 \text{ \AA}$ qui sont caractéristiques de la première sphère de coordination de l'uranyle. Cette dernière est composée de ses deux atomes d'oxygène axiaux (yle) et de 4,7 atomes d'oxygène équatoriaux à une distance moyenne de $2,35 \text{ \AA}$ ($U-O_{eq}$). La présence 3,3 atomes de phosphore dans la seconde sphère de coordination est caractérisée par une contribution visible à $r+\Phi = 2,0-3,2 \text{ \AA}$. Les atomes de phosphore sont situés à une distance de $3,77 \text{ \AA}$ ($U...P$). Cette contribution est clairement visible sur le module de la transformée de Fourier (Figure 58) mais également sur la partie imaginaire. Sur la figure 59 l'ajustement sans la contribution des atomes de phosphore est présenté. On peut noter que pour cet ajustement le chemin de diffusion quadruple de O-U-O a été pris en compte (cf. Annexe V). Sa contribution est visible à $r+\Phi = 3,6 \text{ \AA}$.

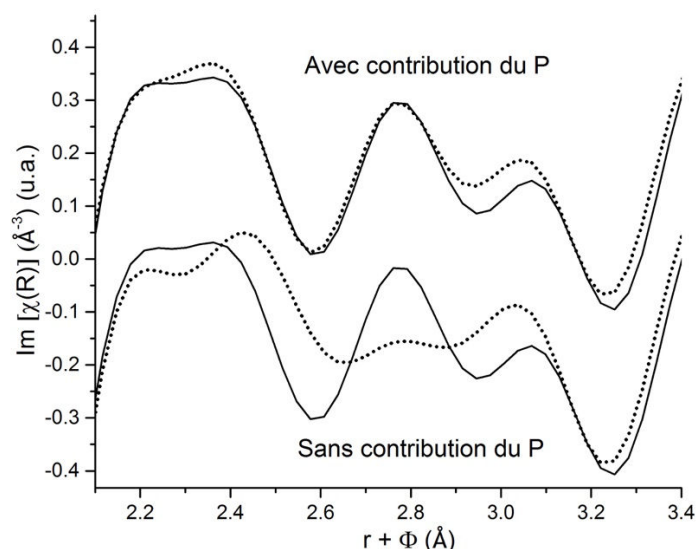


Figure 59 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MP-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (en haut) avec la contribution de 3,3 atome de phosphore, (en bas) sans atome de phosphore. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Enfin, compte tenu de la présence de chlore en tant que contre-ion des ammoniums du polymère et en tant qu'électrolyte (NaCl) fixant la force ionique du mélange une contribution du chlore a dû être envisagée. Comme le montre la figure 60 sur laquelle est représentée l'ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MP-U avec et sans la contribution du chlore, l'ajout de 0,5 atome de chlore à 2,86 Å augmente la qualité de l'ajustement graphiquement dans la zone comprise entre $r+\Phi = 2,1$ et 2,3 Å et fait diminuer le R_{facteur} de 0,57% à 0,43% et le facteur Q de 90×10^{-4} à 71×10^{-4} ce qui confirme une amélioration réelle de la qualité de l'ajustement.

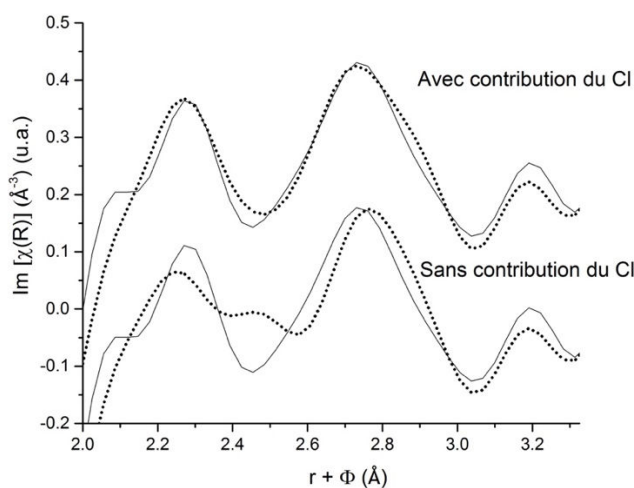


Figure 60 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MP-U au seuil L_{III} de l'uranium ; (en haut) avec la contribution de 0,5 atome de chlore, (en bas) sans atome de chlore. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Tableau 20 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour le spectre EXAFS de PEI-MP-U. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est notée entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MP-U	2 O _{ax} à 1,78 (1) Å $\sigma^2 = 0,0018 \text{ \AA}^2$	3,3 (5) P à 3,77 (3) Å $\sigma^2 = 0,0028 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = 3,14 \text{ eV}$
	4,7 (2) O _{eq} à 2,35 (1) Å $\sigma^2 = 0,0012 \text{ \AA}^2$	0,5 (3) Cl à 2,86 (2) Å $\sigma^2 = 0,0080 \text{ \AA}^2$	$R_{\text{facteur}} = 0,43\%$ $\text{CHI}_r^2 = 71 \times 10^{-4}$

En considérant que les fonctions phosphonate complexent l'uranyle de façon monodente, les 4,7 O_{eq} sont composés de 3,3 oxygènes provenant des fonctions phosphonate (O_p) et de 1,4 atomes d'oxygène provenant de molécules d'eau (O_{H2O}). La distance U-O_{H2O} est de 2,42 Å¹⁵⁵. Ainsi l'équation suivante permet de calculer la distance U-O_p qui vaut x :

$$\frac{1,4 \times 2,42}{4,7} + \frac{3,3 \times x}{4,7} = 2,35$$

La distance U-O_p est de 2,32 Å. Les distances U-O_p et U...P reportées dans le tableau 20 sont en accord avec les valeurs rapportées par Kubicki *et al.* pour des phosphates complexant de façon monodente un cation uranyle (U-O_p = 2,28 Å et U...P = 3,64 Å)¹⁵⁶. Ces distances sont aussi proches de celles décrites par Safi *et al.* pour un complexe d'uranyle-phosphopeptide présentant des liaisons U-phosphonates monodentes (U-O_p = 2,32 Å et U...P = 3,73 Å)¹⁵⁷.

Les mesures EXAFS ont ainsi permis de confirmer la complexation de l'uranyle par les fonctions phosphonate du PEI-MP, ce qui corrobore les résultats de l'analyse infrarouge. La sphère de coordination de l'uranyle est donc composée de trois fonctions phosphonate provenant du PEI-MP et, en se basant sur les distances de liaison, ce mode de coordination est monodente.

Comme on peut le voir sur la figure 61 l'uranyle dans le complexe PEI-MP-U a une coordinance de sept et présenterait avec ses deux atomes d'oxygène axiaux et ses cinq atomes d'oxygène équatoriaux une structure bipyramidale pentagonale.

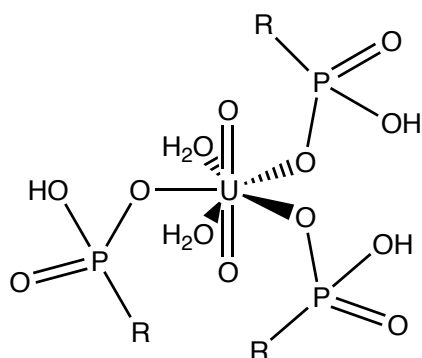


Figure 61 : Représentation schématique de la première et de la deuxième sphère de coordination de l'uranyle dans le complexe PEI-MP-U. (Formalisme R représente la chaîne polymérique).

RESUME

Au cours de ce chapitre le PEI-MP ayant un monomère de formule brut $[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_3\text{Na}_6\text{Cl}]_n$ a pu être synthétisé et purifié à partir du bPEI commercial avec un taux de fonctionnalisation proche de 100%.

Nous avons pu montrer que la charge maximum du PEI-MP en uranyle est de $1,39 \pm 0,14$ mol d'uranyle par mol de monomère soit environ $0,66 \pm 0,07$ mg d'uranyle par mg de PEI-MP. L'étude préliminaire en spectroscopie infrarouge a révélé une interaction entre les fonctions phosphonate et l'uranyle. La nature des interactions n'a en revanche pas pu être élucidée par spectroscopie IR. L'étude de spectroscopie EXAFS réalisée sur le complexe PEI-MP-U semble indiquer une complexation de l'uranyle par trois fonctions phosphonate monodentes. C'est l'utilisation du chemin de diffusion triple P-O-U pour l'ajustement des données EXAFS du complexe PEI-MP-U qui nous laisse supposer ce mode de liaison des fonctions phosphonate.

C Effet du PEI-MP sur une matrice minérale biomimétique de l'os en cas de contamination par l'uranyle

Dans le cadre d'un objectif de décorporation d'actinides par l'utilisation de macromolécules, rappelons que l'os est une cible pertinente car il peut retenir les actinides à sa surface et dans son volume. C'est particulièrement vrai dans le cas d'une contamination avec de l'uranyle où un phénomène d'incorporation de ce dernier, dans le volume de la matrice d'hydroxyapatite, se produit aux cours du temps (cf. Chapitre I B). L'os étant par ailleurs soumis à des phénomènes cycliques de résorption, l'uranyle piégé pourra être relargué dans le système sanguin provoquant ainsi une contamination chronique des reins. Les travaux de Dormehl *et al.* portant sur la scintigraphie osseuse menée sur des primates¹⁴⁶, ont montré que 18% de la quantité de PEI-MP injectée sous forme de complexe d'étain ou de technétium se localisait au niveau de l'os cortical. Notre travail trouve ici un point de comparaison avec l'utilisation clinique de ce type de polymère pour le traitement de la matrice osseuse.

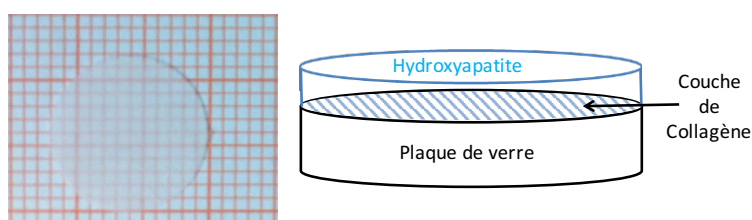


Figure 62 : Photographie d'une plaque biomimétique d'hydroxyapatite (HAp_{plq}) (à gauche). Schéma de la composition des HAp_{plq} (à droite) (échelle : 1 carreau = 1cm).

Afin de mesurer l'impact d'une localisation ciblée du PEI-MP sur une contamination par l'uranyle, des plaques biomimétiques d'hydroxyapatite (noté HAp_{plq}) ont été utilisées comme modèle de la matrice osseuse minérale. Les plaques biomimétiques d'hydroxyapatite (HAp_{plq}) utilisées au cours de ce projet ont été fournies par D. Bourgeois de l'ICSM¹⁵⁸. L'intérêt de travailler sur des HAp_{plq} provient principalement du fait que la fixation de l'HAP sur un support de verre simule la surface minérale osseuse et permet un dépôt de polymère et/ou d'uranyle bidimensionnel. Il y a aussi un intérêt pratique car les dépôts et les lavages sont plus facilement réalisables.

Une expérience type est représentée sur la figure 63. C'est un test de compétition qui consiste à mettre en contact les plaques biomimétiques d'hydroxyapatite (HAp_{plq}) avec une solution d'uranyle pour former un système binaire, HAp_{plq} -U et à comparer le résultat avec ces mêmes plaques ayant préalablement été recouvertes par le PEI-MP pour former un système ternaire, HAp_{plq} -PEI-MP-U.

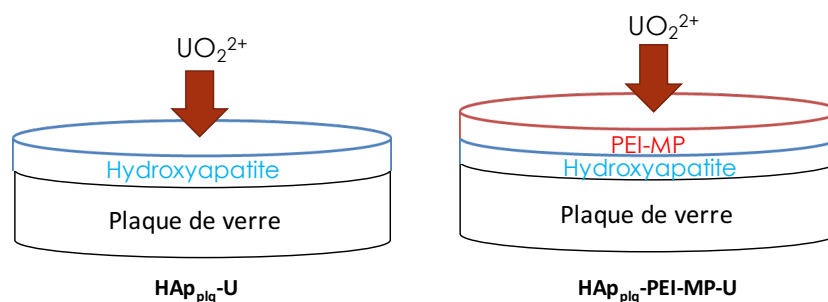


Figure 63 : Schéma de l'expérience de complexation de l'uranyle à la surface des plaques biomimétiques d'hydroxyapatite non recouverte (HAp_{plq}-U) ou recouverte (HAp_{plq}-PEI-MP-U) de PEI-MP.

La sorption du PEI-MP sur les HAp_{plq} est effectuée par trempage et la quantité de polymère sorbée est dosée par ICP-OES du phosphore.

Le taux d'uranyle retenu sur le substrat (systèmes binaire et ternaire) a été déterminé par dosage indirect de l'uranium (ICP-OES) restant dans les solutions de trempage.

Enfin, l'environnement de l'uranyle dans le système binaire HAp_{plq}-U et dans le système ternaire HAp_{plq}-PEI-MP-U a été déterminé par spectroscopie EXAFS. Les spectres EXAFS des systèmes HAp_{plq}-U et HAp_{plq}-PEI-MP-U ont été enregistrés au seuil L_{III} de l'uranium à partir de poudres (conditionnées en pastilles) récupérées par décapage des plaques HAp_{plq}-U et HAp_{plq}-PEI-MP-U. Sonder l'environnement atomique de l'uranyle dans ces deux systèmes (HAp_{plq}-U et HAp_{plq}-PEI-MP-U), a ainsi permis de préciser le rôle du PEI-MP sur la sorption de l'uranyle.

I Sorption du PEI-MP sur les substrats HAp_{plq}.

La production des supports HAp_{plq} est délicate à contrôler. Elle n'est donc pas standardisée. Chaque plaque est donc unique et présente des différences en terme de quantité d'hydroxyapatite. Ceci entraîne certainement une variabilité concernant le dépôt du PEI-MP, qui en toute logique devrait être proportionnelle à la surface de contact. Nous avons donc dans un premier temps tenté d'estimer une quantité moyenne du PEI-MP qui pourrait se fixer par support en réalisant un dosage du phosphore sur un échantillon de quatre HAp_{plq}.

Ainsi, quatre HAp_{plq} ont été recouvertes de PEI-MP par trempage pendant 48 heures dans une solution de polymère (10 mg.mL⁻¹ à pH 7,0) maintenue sous agitation orbitale. La quantité de PEI-MP retenue à la surface de chaque HAp_{plq} après 48 heures a pu être estimée par soustraction de la quantité de PEI-MP initialement présent dans la solution de trempage et de la quantité de PEI-MP restant en solution après le trempage (non sorbé sur les HAp_{plq}). Les quantités de PEI-MP en solution avant et après le trempage ont été obtenues après minéralisation (micro-onde 200Hz, 2h dans HNO₃ 65%) par le dosage du phosphore par ICP-EOS. Les résultats de sorption du PEI-MP sur les HAp_{plq} sont donnés par plaque dans le tableau 21.

Tableau 21 : Quantité de PEI-MP sorbé à la surface des HAp_{plq} (donnée avec l'incertitude expérimentale, moyenne de PEI-MP sorbé ± écart type standard).

HAp _{plq}	Quantité de PEI-MP sorbé (mg)
1	0,13 ± 0,01
2	0,03 ± 0,01
3	0,02 ± 0,01
4	0,19 ± 0,01
moyenne	0,09 ± 0,08

Il apparaît clairement que les résultats sont malheureusement très disparates. Les HAp_{plq} 2 et 3 n'ont pas retenu beaucoup de PEI-MP contrairement aux HAp_{plq} 1 et 4. Cela pourrait s'expliquer par une plus faible quantité d'hydroxyapatite présente à la surface des HAp_{plq} 2 et 3 qui aurait pour conséquence une faible surface de contact ne permettant pas de retenir la quantité de PEI-MP. Nous avons malgré tout considéré que la quantité moyenne de PEI-MP sorbé sur les quatre plaques est de 0,09 ± 0,08 mg par plaque. Cette valeur n'est qu'indicative. Il aurait fallu travailler sur beaucoup plus de plaques pour obtenir une valeur significative.

Par ailleurs, la surface des HAp_{plq} a été contrôlée par microscopie électronique à balayage avant et après le traitement de leur surface avec la solution de PEI-MP. Aucune altération de la porosité et/ou aucun dépôt inhomogène de PEI-MP n'ont été remarqués sur la surface des HAp_{plq} . (Figure 64)

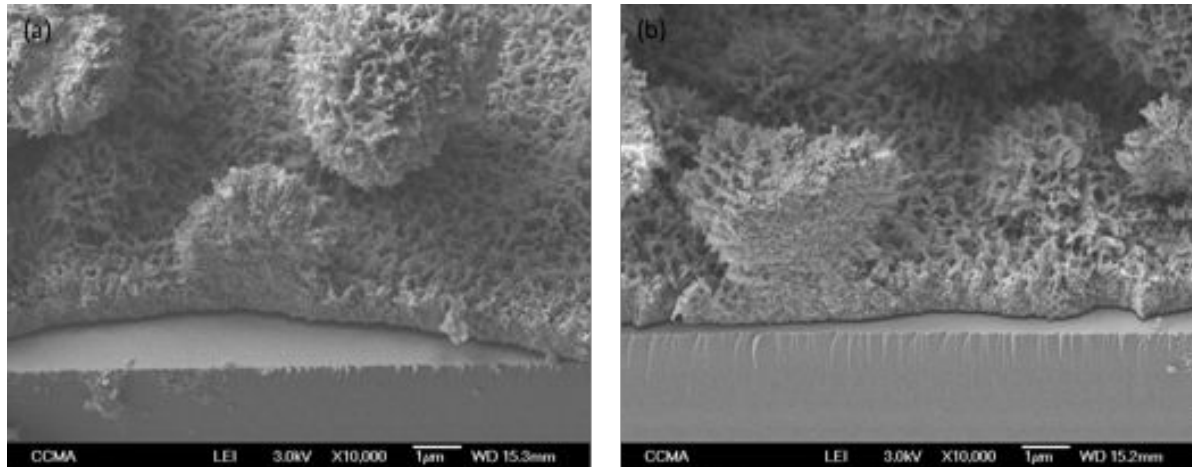


Figure 64 : Clichés de microscopie électronique à balayage d'une HAp_{plq} (a) avant et (b) après trempage dans une solution de PEI-MP (10 mg.mL^{-1}). (Agrandissement $\times 10000$).

II Taux d'uranyle dans les systèmes binaires, HAp_{plq}-U et ternaires, HAp_{plq}-PEI-MP-U

Quatre HAp_{plq} recouvertes de PEI-MP (HAp_{plq}-PEI-MP) et quatre HAp_{plq} natives ont été immergées indépendamment les unes des autres pendant trois heures dans 1,0 mL d'une solution d'uranyle 2×10^{-5} M tamponnée à pH 7,0 avec du TBS (980 μ L de TBS à pH 7,0 additionné de 20 μ L d'une solution de nitrate d'uranyle à 1 mM). Les solutions d'uranyle contenant les HAp_{plq}-PEI-MP et les HAp_{plq} natives ont été maintenues sous agitation orbitale pendant toute la durée du trempage. Toutes les plaques ont ensuite été rincées par une immersion de 15 min dans une solution de TBS à pH 7,0. Ce rinçage a pour but d'éliminer l'uranyle qui n'est pas chimisorbé sur les HAp_{plq}-PEI-MP-U et les HAp_{plq}-U. La quantité d'uranyle retenue sur les HAp_{plq}-PEI-MP-U et les HAp_{plq}-U a ensuite été estimée par dosage en retour de l'uranium restant en solution par ICP-OES. Les résultats sont reportés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Quantité d'uranyle sorbée à la surface des HAp_{plq}-PEI-MP et HAp_{plq} natives (donnée avec l'incertitude expérimentale, moyenne d'uranyle sorbé \pm écart type standard).

HAp _{plq} -PEI-MP	Quantité de d'uranium sorbée (mol)	HAp _{plq} natives	Quantité de d'uranium sorbée (mol)
1	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-8}$	5	$2,4 \pm 0,1 \times 10^{-8}$
2	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	6	$2,8 \pm 0,4 \times 10^{-8}$
3	$2,4 \pm 0,1 \times 10^{-8}$	7	$2,5 \pm 0,2 \times 10^{-8}$
4	$2,2 \pm 0,1 \times 10^{-8}$	8	$1,6 \pm 0,4 \times 10^{-8}$
moyenne	$2,5 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	moyenne	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-8}$

Pour les HAp_{plq}-PEI-MP, la quantité d'uranyle retenue en moyenne est de $2,5 \pm 0,4 \times 10^{-8}$ moles par plaque, ce qui donne un ratio U : PEI-MP de 0,12 si l'on suppose que tout l'uranyle est complexé par le polymère. Les HAp_{plq} (références) retiennent, quant à elles, $2,3 \pm 0,5 \times 10^{-8}$ moles d'uranyle (cf. Annexe VI). Ces données semblent donc indiquer que le PEI-MP n'a pas d'influence détectable sur la rétention de l'uranyle sur la matrice d'hydroxyapatite. Mais à nouveau cette moyenne est vraiment indicative vu la disparité des plaques.

Pour chaque HAp_{plq}-PEI-MP, le ratio uranyle : PEI-MP a été calculé (Tableau 23). On note que l'uranyle est bien en défaut sur chaque plaque par rapport au PEI-MP, ce qui est fondamental pour l'étude de spéciation.

Tableau 23 : Equivalence uranyle : PEI-MP à la surface des HAp_{plq}-PEI-MP.

HAp _{plq} -PEI-MP	Equivalence uranyle : PEI-MP
1	0,09
2	0,37
3	0,5
4	0,05
moyenne	0,12

III Spéciation de l'uranyle : EXAFS du système binaire $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$

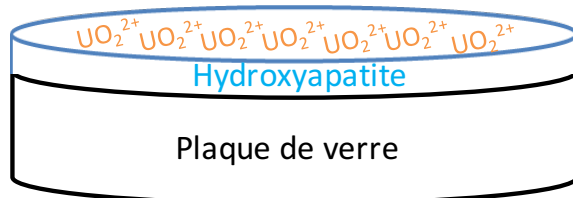


Figure 65 : Schéma du système binaire $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$.

L'environnement atomique de l'uranyle dans le système binaire $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ a été sondé par EXAFS. Ce système mime la rétention d'uranyle sur une matrice osseuse et constitue une référence visant à déterminer l'impact du PEI-MP sur l'interaction Uranyle-hydroxyapatite. Le spectre EXAFS et la transformée de Fourier associée ainsi que les courbes ajustées sont représentées sur la figure 66 et les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 24.

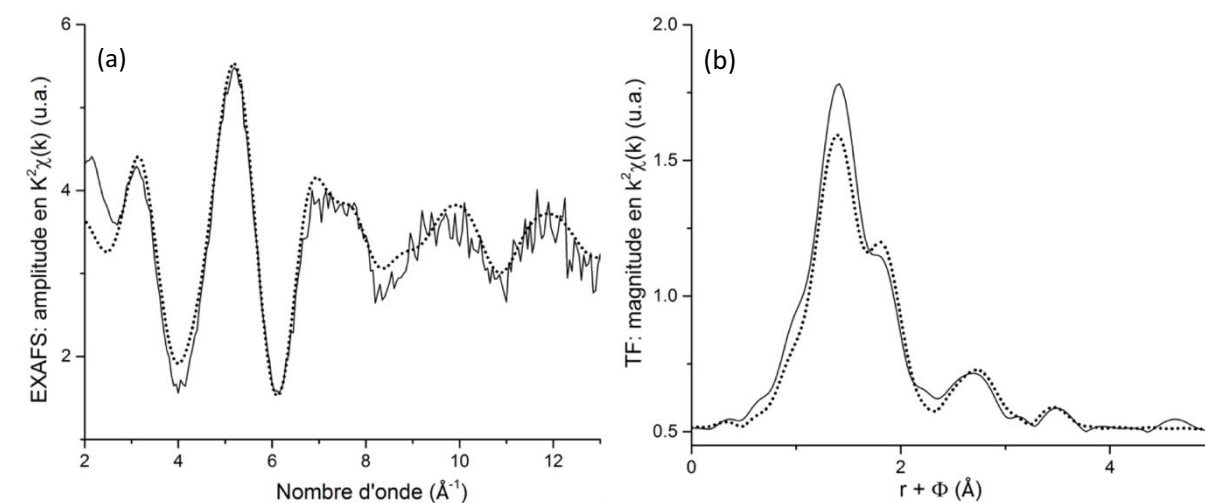


Figure 66 : (a) Spectre EXAFS du $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ au seuil L_{III} de l'uranium ; (b) la transformée de Fourier correspondante. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

La liaison axiale trans di-oxo de l'uranyle se caractérise sur le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS (Figure 66b) par une bande intense à $r + \Phi = 1,50 \text{ \AA}$. La partie équatoriale de la première sphère de coordination est composée de 5,5 atomes d'oxygène qui sont à une distance moyenne U-O_{eq} de $2,35 \text{ \AA}$. 2,8 atomes de phosphore et 0,7 atome de calcium forment la seconde sphère de coordination à des distances moyennes $\text{U}\dots\text{P}$ de $3,14 \text{ \AA}$ et $\text{U}\dots\text{Ca}$ de $3,90 \text{ \AA}$. La complexation de l'uranyle dans des matrices d'hydroxyapatite a déjà été décrite par spectroscopie EXAFS par Bargar *et*

*al.*¹⁵⁹ Mais les conditions expérimentales étudiées étaient quelque peu différentes de celles que nous présentons ici. L'uranyle était incorporé dans la matrice inorganique d'hydroxyapatite et non pas chimisorbé en surface. Dans ces conditions, les auteurs ont déterminé que les paramètres optimum d'ajustement étaient $U-O_{eq}=2,31 \text{ \AA}$, $U...P = 3,02 \text{ \AA}$ et $U...Ca = 3,80 \text{ \AA}$. Les distances $U-O_{eq}$, $U...P$ et $U...Ca$ déterminées par Bargar *et al.* dans le cas de l'insertion d'uranyle dans une matrice inorganique d'hydroxyapatite sont plus courtes que celles décrites dans notre étude du système $HAp_{plq}-U$. Cela peut s'expliquer par le fait que, dans notre cas l'uranyle reste probablement à la surface de la matrice d'hydroxyapatite, à l'interface solide-liquide.

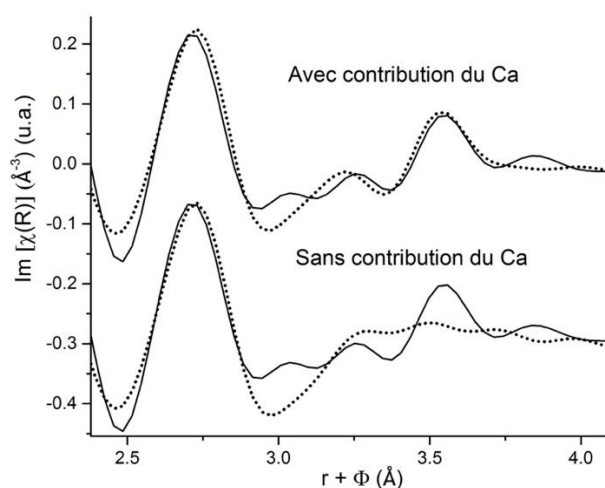


Figure 67 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du système $HAp_{plq}-U$ au seuil L_{III} de l'uranium ; (en haut) avec la contribution de 0,7 atome de calcium, (en bas) sans atome de calcium. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Compte tenu de la présence de calcium dans la maille d'hydroxyapatite (cf. Chapitre I B), la contribution d'atome de calcium a dû être envisagée pour l'ajustement du système $HAp_{plq}-U$. Comme le montre la figure 67 où est représenté l'ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du $HAp_{plq}-U$ avec et sans la contribution du calcium, l'ajout de 0,7 atome de calcium à $3,90 \text{ \AA}$ augmente la qualité de l'ajustement graphiquement dans la zone comprise entre $r+\Phi = 3,2$ et $3,8 \text{ \AA}$ et fait diminuer le R_{facteur} de $0,64\%$ à $0,55\%$ et le facteur Q de 58×10^{-4} à 50×10^{-4} ce qui confirme une augmentation réelle de la qualité de l'ajustement.

Les paramètres structuraux de l'uranyle sur la plaque $HAp_{plq}-U$ peuvent être comparés aux paramètres structuraux de l'uranyle dans le complexe PEI-MP-U. Comme le montre le tableau 24, l'environnement de l'uranyle dans les deux systèmes binaires $HAp_{plq}-U$ et PEI-MP-U est très similaire. Dans les deux cas la première et seconde sphère de coordination de l'uranyle sont composées d'atomes d'oxygène et de phosphore.

La présence de chlore, dans la sphère de coordination de l'uranyle complexé au PEI-MP, et la présence de calcium dans celle de l'uranyle complexé à l'hydroxyapatite, marque la différence principale de chaque système. Qui plus est, les contributions des 0,5 atome de chlore et des 0,7 atome de calcium sont significatives dans l'ajustement des spectres EXAFS de leur système respectif. L'importance de la contribution des atomes de calcium dans la qualité de l'ajustement du spectre EXAFS du système HAP_{plq}-U peut être jugée sur la figure 67.

Tableau 24 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour les spectres EXAFS des systèmes HAP_{plq}-U et PEI-MP-U. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
HAP _{plq} -U	2 O _{ax} à 1,79 (1) Å $\sigma^2 = 0,0028 \text{ \AA}^2$	2,8 (4) P à 3,14 (3) Å $\sigma^2 = 0,00131 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = 4,19 \text{ eV}$
	5,5 (2) O _{eq} à 2,35 (1) Å $\sigma^2 = 0,00116 \text{ \AA}^2$	0,7 (4) Ca à 3,90 (5) Å $\sigma^2 = 0,0071 \text{ \AA}^2$	$R_{\text{facteur}} = 0,55 \%$ $\text{CHI}^2_{\text{r}} = 57 \times 10^{-4}$
PEI-MP-U Rappel du tableau 20	2 O _{ax} à 1,78 (1) Å $\sigma^2 = 0,0018 \text{ \AA}^2$	3,3 (5) P à 3,77 (3) Å $\sigma^2 = 0,00275 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = 3,14 \text{ eV}$
	4,7 (2) O _{eq} à 2,35 (1) Å $\sigma^2 = 0,00115 \text{ \AA}^2$	0,5 (3) Cl à 2,86 (2) Å $\sigma^2 = 0,0080 \text{ \AA}^2$	$R_{\text{facteur}} = 0,43\%$ $\text{CHI}^2_{\text{r}} = 71 \times 10^{-4}$

IV Spéciation de l'uranyle : EXAFS du système ternaire HAp_{plq} -PEI-MP-U

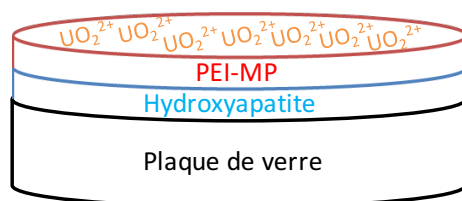


Figure 68 : Schéma du système ternaire HAp_{plq} -PEI-MP-U.

Comme pour le système HAp_{plq} -U mimant l'interaction entre la matrice osseuse et l'uranyle, l'environnement atomique de ce dernier dans le système HAp_{plq} -PEI-MP-U a été sondé par EXAFS. Etant donné la complexité de ce système ternaire, attribuable aux similitudes des fonctions complexantes du PEI-MP (phosphonates) et de l'hydroxyapatite (phosphates), aucun ajustement direct des spectres EXAFS n'a été entrepris. En revanche, un ajustement par combinaison linéaire, prenant en compte les formes limites PEI-MP-U en solution et HAp_{plq} -U a été effectué. Dans ce cas, l'ajustement par combinaison linéaire a été fait *via* le logiciel Athéna qui somme les contributions (ici les spectres des formes limites PEI-MP-U en solution et HAp_{plq} -U) qui servent à calculer un spectre pondéré par ajustement des facteurs de pondération de chaque spectre limite. A cause des similitudes que présentent ces trois systèmes (PEI-MP-U, HAp_{plq} -U et HAp_{plq} -PEI-MP-U), les résultats obtenus par combinaison linéaire sont essentiellement qualitatifs. L'ajustement par combinaison linéaire des données EXAFS du système HAp_{plq} -PEI-MP-U a été fait dans l'espace des nombres d'onde et dans l'espace réel (partie imaginaire de la transformée de Fourier). Ils sont basés sur les mêmes données mais dans deux représentations ce qui permet de confronter les résultats des ajustements dans deux espaces.

Le spectre EXAFS issu de la combinaison linéaire et les spectres EXAFS expérimentaux de PEI-MP-U, HAp_{plq} -U et HAp_{plq} -PEI-MP-U sont comparés sur la figure 69a. De la même façon, les parties imaginaires des transformées de Fourier sont présentées sur la figure 69b. Les paramètres d'ajustement des combinaisons linéaires dans les deux espaces sont reportés dans le tableau 25.

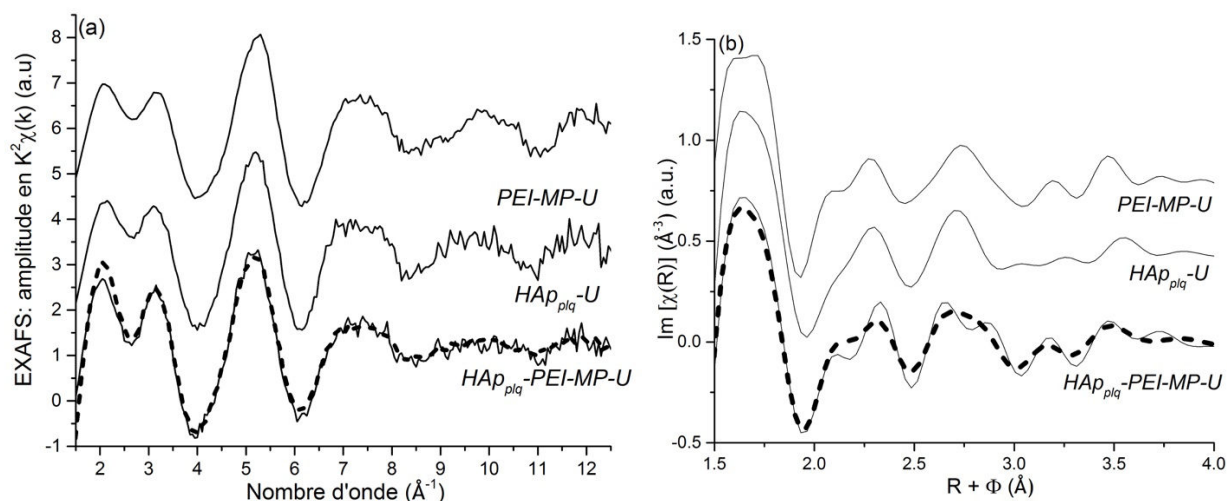


Figure 69 : (a) Spectres EXAFS expérimentaux du PEI-MP-U (solution), $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ (solide) et $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ (solide) fait au seuil L_{III} de l'uranium, et spectre EXAFS ajusté par combinaison linéaire du $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$; (b) partie imaginaire de la transformée de Fourier.

D'un point de vue qualitatif, il est intéressant de noter que, dans l'espace réel (partie imaginaire du module de la transformée de Fourier), le spectre correspondant à la combinaison linéaire reproduit bien le spectre expérimental du système $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ notamment dans la zone $R + \Phi = 2,0\text{-}3,0 \text{\AA}$ où les spectres PEI-MP-U et $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ présentent les différences les plus marquées. Le tableau 25 indique que le meilleur ajustement est obtenu pour 36% de PEI-MP-U et 64% de $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ dans l'espace des k et pour 51% de PEI-MP-U et 49% de $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ dans l'espace réel. En considérant l'incertitude, ces résultats sont comparables et indiquent que l'uranyle est complexé environ à 50% par le PEI-MP et environ à 50% par l'hydroxyapatite.

Tableau 25 : Ajustement par combinaison linéaire du spectre EXAFS du $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ dans l'espace des k (k^2) et dans l'espace réel R . les composantes de cet ajustement sont les spectres du PEI-MP-U et $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$.

Composante de l'ajustement par combinaison linéaire	Contribution (en %) des composantes de l'ajustement par combinaison linéaire	
	Espace des k	Espace réel
PEI-MP-U	36±8%	51±7%
$\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$	64±8%	49±7%
Paramètres d'ajustement	$R_{\text{facteur}} : 7\%$ $\text{CHI}^2_{\text{r}} : 0,02$	$R_{\text{facteur}} : 7\%$ $\text{CHI}^2_{\text{r}} : 0,02$

Malgré la prudence qu'inspire cette méthode d'ajustement pour des spectres modèles très similaires, le PEI-MP semble avoir une implication non négligeable dans le phénomène de complexation de l'uranyle à la surface de l'hydroxyapatite. La figure 70 représente la sphère de coordination de l'uranyle dans le système $\text{HAP}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ calculée par combinaison linéaire des spectres EXAFS des systèmes PEI-MP-U et $\text{HAP}_{\text{plq}}\text{-U}$. Ainsi, d'après les coefficients calculés par la combinaison linéaire (Tableau 25) l'uranyle est complexé par environ une fonction phosphonate du PEI-MP ($0,36 \times 3,3$) et par deux fonctions phosphates de l' HAP_{plq} ($0,64 \times 2,8$).

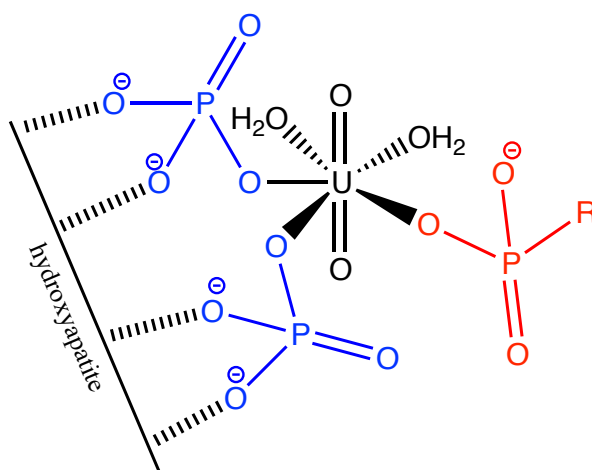


Figure 70 : Schéma de la sphère de coordination de l'uranyle dans le système $\text{HAP}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$. (formalisme : en bleu les groupements phosphonate de l'HAP ; en rouge les fonctions phosphonate du PEI-MP).

RESUME

En début de ce chapitre nous avons pu montrer que le PEI-MP est un complexant de l'uranyle en milieu pseudo-physiologique.

Au cours de cette partie, la sorption de l'uranyle sur la matrice osseuse d'hydroxyapatite en cas de contamination a été caractérisée par spectroscopie EXAFS. Pour cela nous avons choisi d'utiliser des matrices d'hydroxyapatite de synthèse supportées sur des plaques de verre (HAp_{plq}), fournies par D. Bourgeois de l'ICSM, pour mimer la surface osseuse. La sphère de coordination de l'uranyle dans le système HAp_{plq} -U est composée de trois fonctions phosphonate et de calcium. Ceci est tout à fait en accord avec la littérature où l'incorporation de l'uranyle dans l'hydroxyapatite avait déjà été rapportée¹⁵⁹. Il a pu aussi être noté que la sphère de coordination de l'uranyle sorbé sur l'hydroxyapatite est similaire à celle de l'uranyle dans le complexe PEI-MP-U.

Ensuite des HAp_{plq} -PEI-MP (HAp_{plq} native recouverte de PEI-MP) ont été préparées, caractérisées puis immergées dans une solution d'uranyle (conditions pseudo-physiologiques (TBS pH 7,0)). Les équivalences uranyle : monomère de PEI-MP se sont révélées très variables à cause de la non-reproductibilités des HAp_{plq} mais toutes inférieures à 1 (de 0,5 à 0,05).

La similitude des données EXAFS des systèmes PEI-MP-U, HAp_{plq} -U et HAp_{plq} -PEI-MP-U qui simule l'action du PEI-MP sur de l'uranyle sorbé sur la surface osseuse nous a conduit à considérer un ajustement par combinaison linéaire des spectres EXAFS des systèmes PEI-MP-U et HAp_{plq} -U.

Cela a permis de montrer que le PEI-MP est impliqué dans la coordination de l'uranyle quand celui-ci se sorbe à l'hydroxyapatite. Ainsi, il semblerait que le PEI-MP soit capable de perturber l'interaction entre l'hydroxyapatite et l'uranyle. Il est cependant difficile de tirer des conclusions générales sur une efficacité supposée du PEI-MP quant à la décorporation osseuse de l'uranyle car la matrice minérale supportant la complexation est dénuée de toute activité biologique.

D Caractérisation physico-chimique du complexe PEI-MP-Th

La capacité du PEI-MP à complexer le Th(IV) en milieu physiologique, a été étudiée de la même façon que pour le PEI-MC.

Ainsi, l'étude physico-chimique a consisté en :

- La mesure de la courbe de charge du polymère en Th(IV) après des cycles complexation/ultracentrifugation/lavage puis dosage après minéralisation du Th(IV) dans les différentes fractions par spectroscopie UV-vis.
- L'étude de la spéciation du Th(IV) dans le complexe PEI-MP-Th par EXAFS.

De la même façon que précédemment, le milieu biologique a été simplifié en une solution aqueuse de tampon salin trishydroxyméthylaminométhane (TBS) à pH 7,0 avec des concentrations en thorium comprises entre 10^{-2} et 10^{-4} M. Comme il l'a été dit dans le chapitre précédent (cf. Chapitre III B) le thorium (IV) est facilement sujet à l'hydrolyse et forme rapidement une phase colloïdale. Au cours des expériences réalisées à pH physiologique, pour garder 100% du thorium (IV) sous forme soluble, ce dernier a été protégé avec de l'acide nitriloacétique (NTA), il forme ainsi un complexe de type $\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}$. La courbe de charge du PEI-MP avec le thorium et les spectres EXAFS du complexe PEI-MP-Th ont été réalisés à pH 7,0.

I Courbe de charge du complexe PEI-MP-Th

a Courbe de charge

Le taux de charge maximal en Th(IV) du PEI-MP a été déterminé par dosage du Th(IV) complexé au PEI-MP au moyen de la spectrophotométrie UV-Vis (cf. Annexe III). Les solutions utilisées pour l'élaboration de ce dosage ont été préparées dans un tampon TBS pH 7,0 avec des ratio Th(IV) : monomère de PEI-MP ($[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_3\text{Na}_6\text{Cl}]_n$) variant entre 0 et 1,7 et à volume constant de 400 μL . Toutes les solutions de complexe PEI-MP-Th ont ensuite été purifiées par ultracentrifugation avant d'être minéralisées. Finalement, le Th(IV) a été dosé par colorimétrie UV-vis avec du xylénol orange (cf. Chapitre III B). Les résultats sont représentés sous forme d'un graphique exprimant le thorium complexé par monomère de polymère, en fonction de la quantité de thorium initial par monomère.

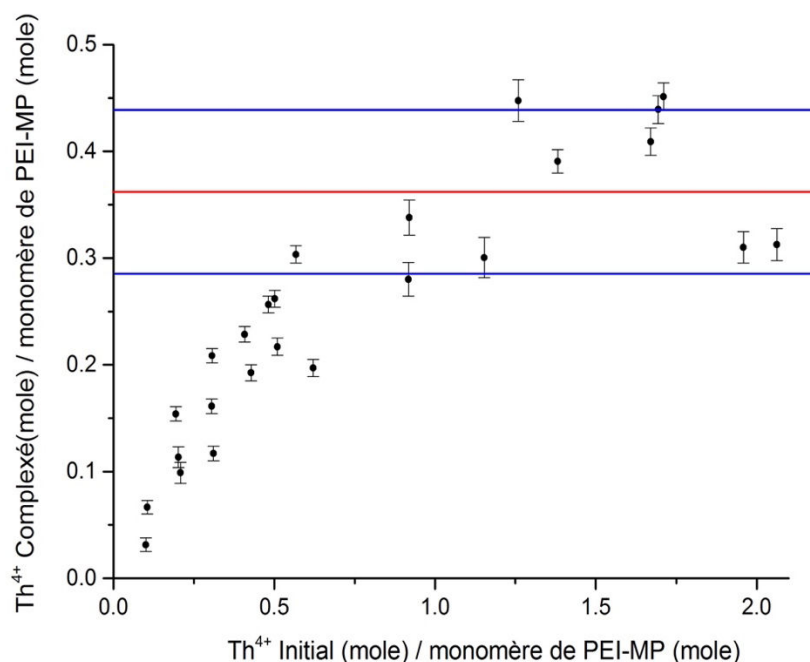


Figure 71 : Courbe de charge du PEI-MP en thorium à pH 7,0. En rouge, la charge maximale moyenne en Th et en bleu, son intervalle de confiance à 95%.

La figure 71 représente la courbe de charge du PEI-MP avec le Th(IV) ; en rouge la droite symbolisant la charge moyenne et en bleu les écarts types. La courbe est dans un premier temps linéaire jusqu'à atteindre un plateau, aux environs de 0,75-1,25 équivalents (Th(IV) initial : monomère de PEI-MP). A ce stade, le polymère est saturé en Th(IV) et le plateau symbolisant ce régime de saturation se situe autour de 1,3 à 2,3 équivalents (Th(IV) initial : monomère de PEI-MP). La charge maximale moyenne en thorium (ligne rouge) est de $0,36 \pm 0,08$ mole de Th(IV) complexé par mole de monomère de PEI-MP, soit $0,15 \pm 0,03$ mg de Th(IV) par mg de PEI-MP.

b Détermination et comparaison des CE_{50} et des facteurs de Hill associés à la formation des complexes PEI-MP-Th et DTPMP-Th

Les données expérimentales ont été représentées sous la forme d'une courbe dose-réponse en exprimant le pourcentage Th(IV) complexé en fonction de la concentration d'unité monomérique de PEI-MP, comme dans le cas du PEI-MC

Le DTPMP, l'acide diéthylènetriamine pentaméthylène phosphonique est l'analogue non polymérique du PEI-MP ou encore l'analogue phosphonique du DTPA (Figure 72). Sa complexation avec le Th(IV) été étudiée lors d'une autre étude au sein du laboratoire. La courbe de charge associée à la formation du complexe DTPMP-Th a été élaborée pour des équivalences Th(IV) : DTPMP variant entre 0 et 4.

Chaque point de cette courbe découle de solutions de complexes préparées à concentration constante de Th(IV) ($4,09 \times 10^{-4} \text{ M}$), à volume constant ($300 \mu\text{L}$) et dans un milieu TBS à pH 7,0.

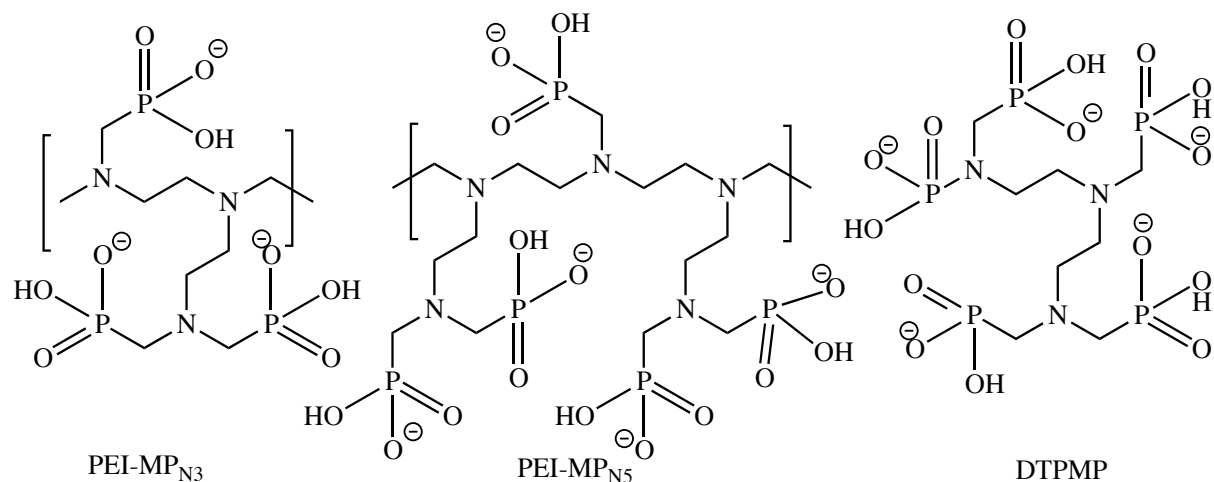


Figure 72 : Monomères de PEI-MC N3 et N5 utilisés pour établir la courbe dose-réponse et le DTAP.

Les données ont, comme précédemment, été ajustées à l'aide de l'équation 2 générale avec le paramètre « a » pris comme nul (100 % du Th(IV) est théoriquement soluble à pH 7,0, présence de deux équivalents de NTA) et sont représentées sur la figure 73 pour les complexes PEI-MP-Th et DTPMP-Th.

$$y = a + \frac{(a-b)}{1 + \left(\frac{c}{x}\right)^n} \quad (\text{Equation 2})$$

Comme précédemment pour les complexes de PEI-MC-Th, les deux courbes, prenant en compte les deux monomères de tailles différentes : PEI-MP_{N3} de formule brute $[(\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_3\text{Na}_6\text{Cl})_n]$ respectant le squelette diéthylènetriamine des analogues moléculaires (DTPMP et DTPA) et PEI-MC_{N5} $[(\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_5\text{Na}_{10}\text{Cl}_2)_n]$ respectant le nombre de fonctions complexantes des contrôles ont été tracées.

Les paramètres d'ajustement, permettant de déduire les CE_{50} et les facteurs de Hill sont répertoriés dans le tableau 26.

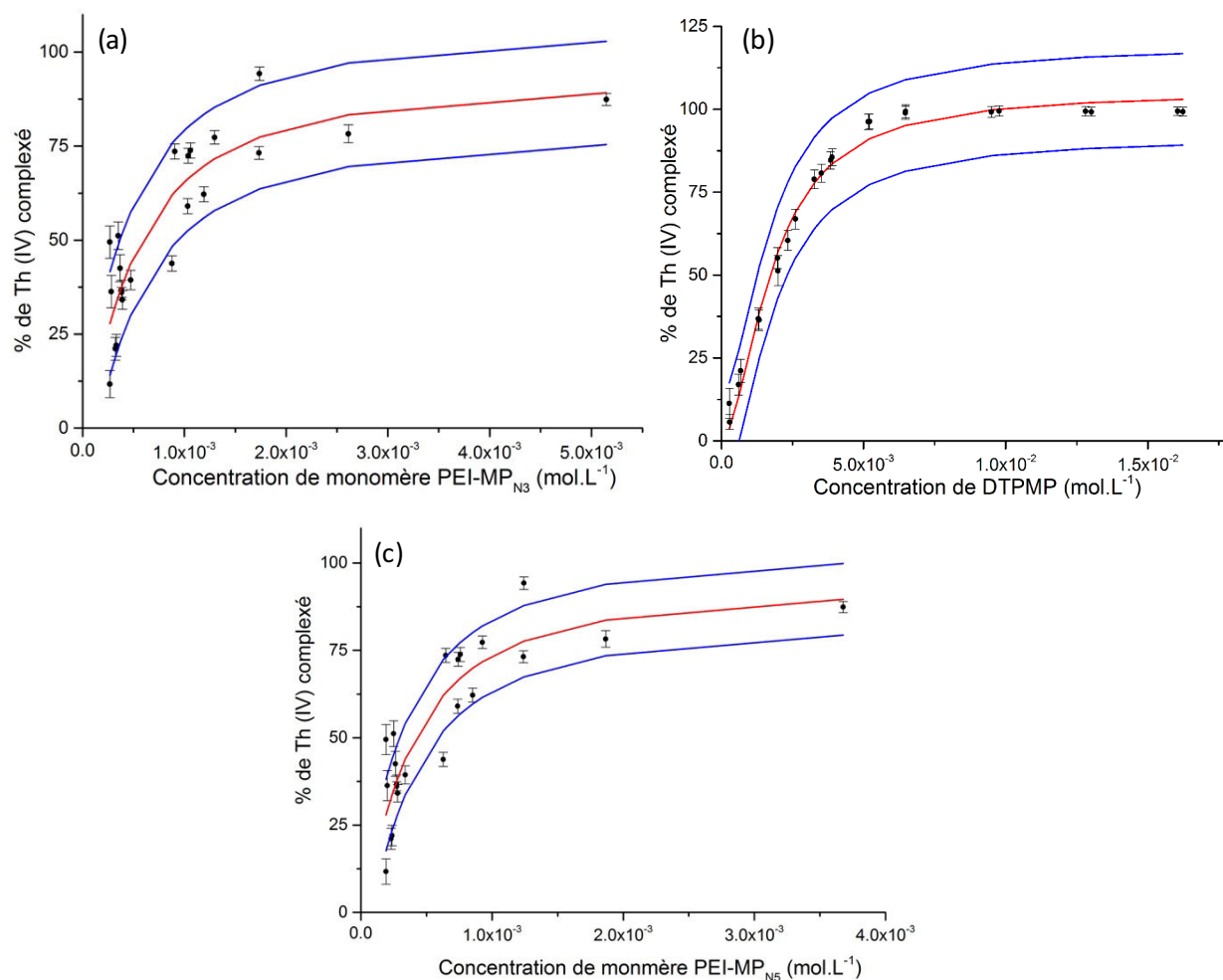


Figure 73 : Courbes dose-réponse représentant la fraction molaire de Th(IV) complexé en fonction des concentrations de PEI-MP_{N3} (a), de DTPMP (b) et de PEI-MP_{N5} (c) . (Formalisme : en rouge ajustement des points expérimentaux, en bleu intervalle de confiance à 95%).

Les courbes obtenues permettent de définir une CE_{50} du PEI-MP à $5,24 \pm 1,60 \times 10^{-4}$ M ou à $3,77 \pm 1,17 \times 10^{-4}$ M selon le monomère considéré PEI-MP_{N3} ou PEI-MP_{N5} respectivement. La CE_{50} associée à la formation du complexe DTPMP-Th par la molécule contrôle est de $1,81 \pm 0,07 \times 10^{-3}$ M.

Le facteur de Hill est, quant à lui, égal à $1,28 \pm 0,40$ dans le cas des complexes PEI-MP-Th contre $1,77 \pm 0,12$ dans le cas du DTPMP.

On note que les incertitudes des paramètres extrapolés de l'ajustement des données liées au complexe PEI-MP-Th sont élevées. Cela est la conséquence directe de la faible qualité de l'ajustement ($R^2=0,79$) qui est due à un manque de points pour la réponse maximale.

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Tableau 26 : Paramètres obtenus pour les complexes PEI-MP_{N3}-Th PEI-MP_{N3}-Th et DTPMP-Th à partir de l'ajustement des valeurs expérimentales par le modèle logistique à quatre paramètres de l'équation 2. Le R² traduit la qualité de l'ajustement.

Paramètres	a	b	n	c	R ²
PEI-MP _{N3} -Th	0	94 ± 15	1,28 ± 0,40	5,24 ± 1,60x10 ⁻⁴	0,79
PEI-MP _{N5} -Th	0	94 ± 15	1,28 ± 0,40	3,77 ± 1,17x10 ⁻⁴	0,79
DTPMP	0	105 ± 2	1,77 ± 0,12	1,81 ± 0,07x10 ⁻³	0,99

A l'issue de cette étude, il apparaît que le DTPMP moléculaire et le PEI-MP polymérique permettent, tous les deux, d'obtenir une efficacité de complexation du Th(IV) d'environ 100%. Malgré l'incertitude de la CE₅₀ associée à la formation du complexe PEI-MP-Th, on peut également penser, de façon raisonnable, qu'elle est comparable à celle issue du contrôle DTPMP moléculaire même si elle semble environ 5 fois plus faible.

Le DTPMP présente, comme le DTPA, un facteur de Hill supérieur à 1. Malgré l'absence de description du site de complexation du Th(IV) formé par le DTPMP dans la littérature, nous pouvons raisonnablement en tirer les mêmes conclusions. Des condensations de type intermoléculaires pourraient être à l'origine de la coopérativité qui semble être mise en évidence. Ici aussi, le dérivé macromoléculaire présente un facteur de Hill supérieur à 1 (1,28), ce qui semble indiquer que la fixation du Th(IV) n'est pas inhibée lors de l'avancement de la complexation.

La CE₅₀ associée à la formation du complexe DTPA-Th calculée précédemment était de 1,27 ± 0,08 x10⁻⁴ M. Il semble donc que la substitution des fonctions carboxylate par les phosphonates s'accompagne d'une réactivité de complexation vis-à-vis du Th(IV) plus faible (environ 1 log). A la vue des incertitudes et des larges intervalles de confiance, nous ne nous hasarderons cependant pas à une comparaison plus détaillée des deux systèmes qui permettent, malgré tout, d'obtenir des efficacités de complexation qui semblent du même ordre de grandeur.

II EXAFS du complexe PEI-MP-Th

Afin de sonder l'interaction Th(IV)-PEI-MP en milieu biologique, la sphère de coordination du Th(IV) dans le complexe PEI-MP-Th a été étudié en spectroscopie EXAFS au seuil L_{III} du thorium (16300 eV).

Le complexe PEI-MP-Th a été préparé à partir d'une solution de $(Th(NTA)_2)^{2-}$ (0,1 M, pH 1,0) et d'une solution de PEI-MP pour obtenir un rapport Th(IV) : monomère de PEI-MP de 0,008. Le complexe PEI-MP-Th a été purifié par ultracentrifugation. Le spectre EXAFS a été enregistré en solution tamponnée TBS à pH 7,0 au seuil L_{III} du thorium (16300 eV) (cf. Annexe V). La figure 74 représente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le tableau 27.

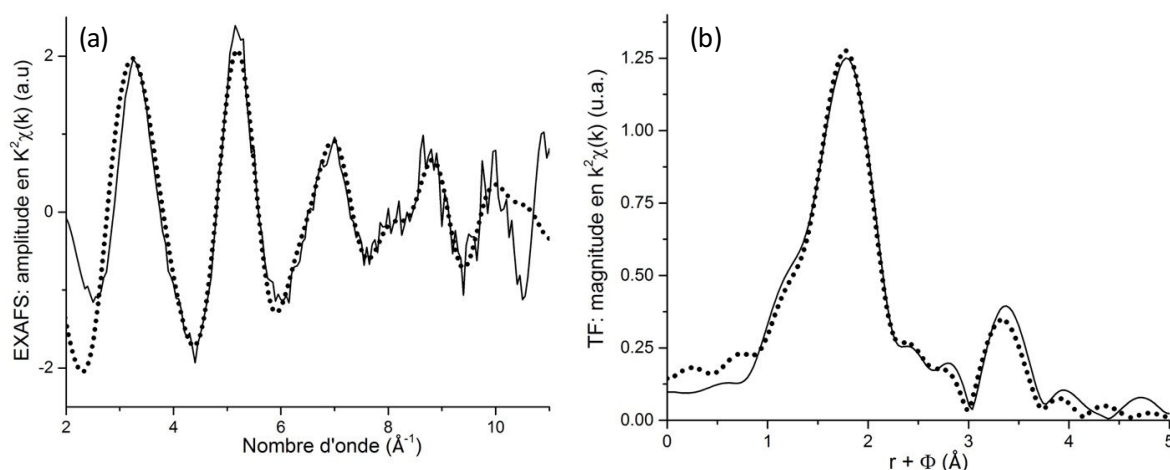


Figure 74 : (a) Spectre EXAFS du PEI-MP-Th au seuil L_{III} du thorium ; (b) la transformée de Fourier correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

La première sphère de coordination est composée exclusivement d'atomes d'oxygène. La coordinance du Th(IV) pouvant varier de 9 à 12 selon l'encombrement stérique des ligands et l'incertitude liée à l'amplitude du signal EXAFS étant en moyenne de 10 à 20%, le nombre d'oxygènes composant la première sphère de coordination a été fixé à la moyenne de la coordinance c'est à dire 9. Ces atomes d'oxygène se situent à 2,35 \AA du centre métallique. La deuxième sphère de coordination est composée de 2,8 atomes de phosphore à une distance de 3,90 \AA . Le nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du thorium serait donc de 9 - 2,8 soit environ 6 si tous les phosphonates sont monodentes.

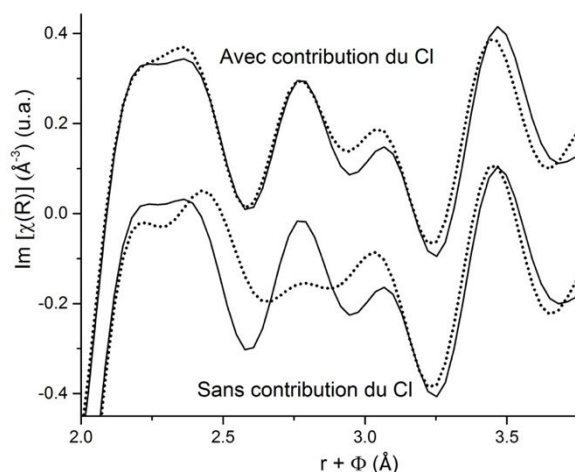


Figure 75 : Ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MP-Th au seuil L_{III} de thorium ; (en haut) avec la contribution de 1,8 atomes de chlore, (en bas) sans atome de chlore. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Enfin, compte tenu de la présence de chlore en tant que contre-ion des ammoniums du polymère et en tant qu'électrolyte (NaCl) fixant la force ionique du mélange, la contribution du chlore doit être envisagée. Comme le montre la figure 75 sur laquelle est représentée l'ajustement de la partie imaginaire de la transformée de Fourier du spectre EXAFS du PEI-MP-Th avec et sans la contribution du chlore, l'ajout de 1,8 atomes de chlore à 3,12 Å augmente la qualité de l'ajustement graphiquement dans la zone comprise entre $r+\Phi=2,1$ et 3,3 Å et fait diminuer le R_{facteur} de 2,2% à 0,5% et le facteur Q de 0,09 à 0,02 ce qui confirme une augmentation réelle de la qualité de l'ajustement.

Tableau 27 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour le spectre EXAFS du complexe PEI-MP-Th. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R_{facteur} est le le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est notée entre parenthèse.

Echantillon	1 ^{ère} sphère de coordination	2 nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MP-Th	9 O à 2,35 (1) Å $\sigma^2 = 0,0096 \text{ \AA}^2$	2,8 (6) P à 3,90 (1) Å $\sigma^2 = 0,00314 \text{ \AA}^2$ 1,8 (3) Cl à 3,12 (2) Å $\sigma^2 = 0,0092 \text{ \AA}^2$	$S_0^2 = 1,0$ $e_0 = -3,29 \text{ eV}$ $R_{\text{facteur}} = 0,5 \%$ $\text{CHI}_r^2 = 0,02$

Les distances Th-O et Th...P obtenues par l'ajustement des données EXAFS sont en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature pour la coordination monodente d'un atome de thorium (IV) avec les fonctions phosphonate d'un phospho-peptide¹⁶⁰ (les distances Th-O sont de 2,34 Å et les distances Th...P sont de 3,85 Å).

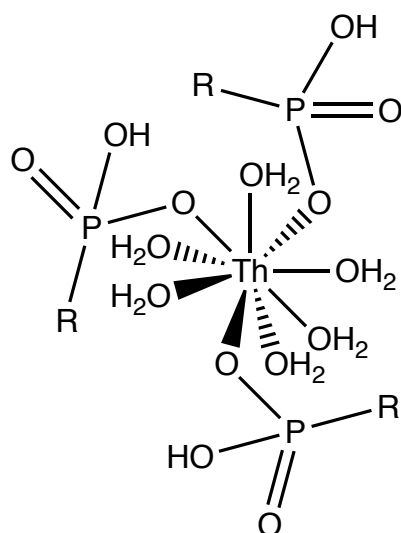


Figure 76 : Représentation schématique de la première et de la deuxième sphère de coordination du thorium obtenue de la spectroscopie EXAFS dans le complexe PEI-MP-Th. (Formalisme R représente la chaîne polymérique).

A l'issue de cette étude de spectroscopie EXAFS du complexe PEI-MP-Th à pH 7,0, la sphère de coordination du Th(IV) a pu être déterminée. Ainsi quand il est complexé par le PEI-MP, le Th(IV) a une sphère de coordination composée de 9 atomes d'oxygènes à 2,35 Å et de 2,8 atomes de phosphore à 3,90 Å. Ainsi comme il est présenté sur la figure 76 le Th(IV) est complexé par environ 3 fonctions phosphonate monodentes et 6 molécules d'eau ($9 - 3 = 6$). Dans le cas d'une coordinance de 9, le polyèdre le plus commun serait un prisme trigonal tricappé, ce qui est difficile à représenter sur la figure 76.

RESUME

Le PEI-MP a été évalué vis-à-vis du Th(IV). En milieu pseudo-physiologique, la courbe de charge associée à la formation du complexe PEI-MP-Th a pu être tracée et le maximum de charge a été calculé à $0,36 \pm 0,08 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de monomère, soit environ $0,15 \pm 0,03 \text{ mg}$ de Th(IV).

Les CE_{50} et facteurs de Hill associés à la formation des complexes PEI-MP-Th et DTPMP-Th (analogue phosphonique du DTPA) ont pu être extrapolés des courbes dose-réponse de ces complexes. Cette étude révèle que le PEI-MP montre une efficacité de complexation comparable à celle de son homologue moléculaire DTPMP.

Enfin une étude en spectroscopie EXAFS du complexe PEI-MP-Th a permis de décrire le site de complexation du thorium à travers la résolution de sa sphère de coordination. Ainsi dans le PEI-MP le Th(IV) est complexé par 3 fonctions phosphonate.

E Discussion

Cette étude a permis d'établir que le PEI-MP était un agent complexant de l'uranyle (VI) et du Th(IV). D'après les résultats EXAFS, présentés dans le tableau 28, il semblerait que le site de complexation du PEI-MP ne soit que peu influencé par la nature du cation complexé. Le Th(IV) et l'uranyle (VI) sont tous les deux coordonnés par trois fonctions phosphonate monodentes.

Malgré un site de complexation similaire, les courbes de charge nous montrent que le PEI-MP est capable de complexer environ quatre fois plus d'uranyle (VI) que de Th(IV) ($1,39 \pm 0,14 \text{ mol.mol}^{-1}$ dans le cas du PEI-MP-U et $0,36 \pm 0,08 \text{ mol.mol}^{-1}$ dans le cas du PEI-MP-Th). Cette différence de capacité de charge pourrait être liée à la différence d'affinité des fonctions phosphonate pour l'uranyle et pour le Th(IV).

Tableau 28 : Résultats obtenus pour les taux de charge maximum du PEI-MP avec l'uranyle (VI) et le Th(IV). Résultats de spéciation du Th(IV) et de l'uranyle (VI) complexés au PEI-MP.

	PEI-MP-U	PEI-MP-Th
Charge max :		
mol.mol ⁻¹ de monomère	$1,39 \pm 0,14$	$0,36 \pm 0,08$
mg.mg ⁻¹ de monomère	$0,65 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,03$
CE ₅₀ (M)		$3,77 \pm 1,17 \times 10^{-4}$
Facteur de Hill		$1,28 \pm 0,40$
EXAFS :		
Paramètres d'ajustement	4,7 O _{eq} à 2,35 Å	9 O à 2,35 Å
	3,3 P à 3,77 Å	2,8 P à 3,90 Å
Sphère de coordination du cation	3 PO ₃ ²⁻	3 PO ₃ ²⁻
	monodentes	monodentes

Une large partie de ce chapitre a été consacrée à l'étude de l'effet du PEI-MP sur l'interaction uranyle-hydroxyapatite. En effet en cas de contamination, l'os est une cible privilégiée de l'uranyle. Ce dernier est fortement séquestré par la matrice minérale osseuse qui est composée principalement de phosphate de calcium formant, dans le volume osseux, de l'hydroxyapatite. Dans le cadre de la stratégie développée dans ce projet visant à distribuer les agents chélatants aux organes touchés par la rétention des actinides, le PEI-MP qui est capable de se distribuer au compartiment osseux doit être capable de complexer l'uranyle retenu dans l'os.

Pour cette étude la surface osseuse a été mimée par une matrice d'hydroxyapatite de synthèse supportée sur plaques de verre (HAp_{plq}), fournie par D. Bourgeois de l'ICSM. Malheureusement l'hétérogénéité des plaques rend les résultats obtenus essentiellement qualitatifs et propespectifs.

Deux lots de HAp_{plq} ont été analysés par spectroscopie EXAFS : sur le premier de l'uranyle a été sorbé à la surface ($\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$) et sur le second le complexe PEI-MP-U a été formé à la surface ($\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$).

Il a été possible à partir des spectres EXAFS du complexe PEI-MP-U en solution, du système $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-U}$ et du système $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ de procéder à la combinaison linéaire dans deux espaces différents, l'espace des k et l'espace réel. Dans les deux cas il apparaît que la contribution du spectre EXAFS du PEI-MP-U est de 36% et 51%, respectivement, pour obtenir un ajustement. Bien que cette étude reste très préliminaire, elle semble indiquer que le PEI-MP est capable de compléter la sphère de coordination de l'uranyle lorsqu'il est à la surface de la matrice osseuse.

La non homogénéité des HAp_{plq} conduit à des quantités de PEI-MP déposées très variables selon l'échantillon (de 0,02 à 0,19 mg). Ce qui engendre des équivalences uranyle : PEI-MP variant d'un facteur 10. Ceci pose un problème pour la préparation des échantillons EXAFS des $\text{HAp}_{\text{plq}}\text{-PEI-MP-U}$ et donc sur les résultats obtenus. Il est possible que sur les plaques présentant les équivalences les plus fortes, l'uranyle se complexe avec l'hydroxyapatite car il n'y a pas assez de PEI-MP. Cela indiquerait que l'effet du PEI-MP sur l'interaction entre l'uranyle et l'hydroxyapatite est sous estimé. En effet, les résultats obtenus en spectroscopie EXAFS étant moyennés, il est possible qu'une fraction d'uranyle soit complexée exclusivement au PEI-MP et une fraction exclusivement à l'hydroxyapatite. Dans tous les cas le PEI-MP est capable de perturber l'interaction uranyle : hydroxyapatite ce qui en fait un agent chélatant macromoléculaire prometteur pour la stratégie de décorporation que nous développons.

Au cours de cette étude, la CE_{50} et le facteur de Hill du complexe PEI-MP-Th ont été déterminés à partir de courbes dose-réponse basées sur deux monomères de PEI-MP et comparés à ceux associés à la formation du complexe avec le contrôle DTPMP-Th. Même si le PEI-MP semble présenter une CE_{50} environ 5 fois plus basse que le contrôle, les résultats sont à lisser à cause des incertitudes expérimentales. Pour ces mêmes raisons, il est difficile de comparer l'effet des phosphonates par rapport aux carboxylates et au DTPA notamment. Cependant et à la vue des résultats, si un avantage peut être donné aux carboxylates, il s'avère mesuré (1 log tout au plus).

Comme dans le cas du PEI-MC il est possible d'imaginer une contamination fictive avec de l'uranyle (IV) ou du Pu(IV) sous forme soluble. Il est alors possible d'utiliser les capacités de charge maximale en uranyle et en Th(IV) du PEI-MP définies précédemment pour estimer la quantité de PEI-MP nécessaire pour décorporer l'uranyle ou le Pu(IV) en cas de contamination humaine. Bien sûr cette mise en situation est hypothétique car elle ne tient pas compte de la compétition des cations biologiques ni de la bio-cinétique de distribution du polymère ou de l'actinide. L'uranyle est retenu principalement dans les reins et les os (25% et 15%) alors que le plutonium est retenu principalement dans l'os et le foie (50% et 30%).

Imaginons donc qu'une personne se contamine avec 198 µg d'uranyle, ce qui correspond à cinq fois la quantité admise par jour pour une personne de 70 kg (la dose journalière admise par l'OMS est de 0,5 µg.kg⁻¹ d'uranium élémentaire), alors environ 59,5 µg d'uranyle seraient retenus dans ses os et ses reins. Pour décorporer cette quantité d'uranyle il faudrait, en supposant que 18% du PEI-MP se distribue à l'os et 18% aux reins, 260 µg de PEI-MP.

Maintenant si cette même personne est contaminée par 35 µg de Pu(IV) soit 80 kBq de Pu-239 (activité incorporée correspondant à la valeur de la dose équivalente réglementaire annuelle (0,02 Sv)), alors environ 30 µg sont retenus dans ses os et son foie. Pour décorporer cette quantité de Pu(IV) il faudrait, en supposant que 18% du PEI-MP se distribue à l'os et 20% au foie et que le PEI-MP est le même taux de charge en Th(IV) et en Pu(IV), 563 µg de PEI-MP. Encore une fois, si la toxicité *in vivo* n'est pas limitante, ces quantités semblent acceptables et pourraient être compatibles avec une utilisation thérapeutique.

Comparons maintenant PEI-MP et PEI-MC vis-à-vis de l'uranyle. Dans le chapitre précédant la courbe charge du complexe PEI-MC-U a été définie pour l'unité monomérique $[(C_{12}H_{19}N_3O_6Na_3)^+Cl^-]_n$. Il en a été déduit que le PEI-MC avait une charge maximale en uranyle de $0,69 \pm 0,010 \text{ mol.mol}^{-1}$ de monomère de PEI-MC. Le PEI-MP dont la charge maximale en uranyle est de $1,39 \pm 0,1 \text{ mol.mol}^{-1}$ de monomère, a donc une capacité de charge maximale deux fois supérieure à celle du PEI-MC. La différence de coordination de l'uranyle dans le complexe PEI-MP-U où il est coordonné par trois fonctions phosphonate monodentes et dans le complexe PEI-MC-U où il est coordonné par quatre fonctions carboxylate (trois monodentes et une bidente) pourrait en partie refléter cette différence de capacité de charge. Ajoutons que la fonctionnalisation du PEI-MC (évaluée à environ 90%) est moins importante que celle du PEI-MP (évaluée à environ 100%).

Chapitre IV : Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

Il est difficile, avec les informations préliminaires dont nous disposons, de déterminer quel polymère serait le plus adapté à la décorporation de l'uranyle. Le PEI-MP comme le PEI-MC sont de bons complexants. Le PEI-MP pourrait être capable de se distribuer au niveau du compartiment osseux et de perturber l'interaction uranyle : hydroxyapatite. Le PEI-MC quant à lui forme des complexes d'uranyle dans lesquels ce dernier a la même spéciation que dans des complexes de carbonate. Pour rappel seul le carbonate de calcium est actuellement utilisé pour favoriser l'excrétion rénale de l'uranyle. Cependant son analogie avec le DTPA qui présente une toxicité rénale ne plaide pas en la faveur du PEI-MC. Bien entendu des études complémentaires devront être menées pour déterminer, leur biodistribution et/ou leur toxicité.

Tableau 29 : Résultats obtenus pour les complexes de PEI-MP-U et PEI-MC-U.

	PEI-MP-U	PEI-MC-U
Charge max :		
mol.mol ⁻¹ de monomère	1,39 ± 0,14	0,69 ± 0,10
mg.mg ⁻¹ de monomère	0,65 ± 0,06	0,49 ± 0,07
EXAFS :		
Paramètres d'ajustement	4,7 O _{eq} à 2,35 Å 3,3 P à 3,77 Å	2,9 O _{mon} à 2,31 Å 2,1 O _{bid} à 2,45 Å 2,9 C _{mon} à 3,41 Å
Sphère de coordination du cation	3 PO ₃ ²⁻ monodentes	3 COO ⁻ monodentes 1 COO ⁻ bidente

Le Th(IV) lui est coordonné de façon très différente selon qu'il se trouve dans les complexes PEI-MP-Th ou PEI-MC-Th. Dans le complexe PEI-MP-Th la sphère de coordination du Th(IV) comporte 3 fonctions phosphonate alors que dans le complexe PEI-MC-Th, le Th(IV) est entouré de 5 fonctions carboxylate et de 3 atomes d'azote. Le PEI-MC présente le même site de complexation des actinides (IV) que le DTPA. En considérant l'incertitude, les CE_{50} et les facteurs de Hill des complexes PEI-MP-Th et PEI-MC-Th sont très comparables, entre $0,4$ et $0,7 \times 10^{-3}$ M pour les CE_{50} et entre $1,28$ et $1,46$ pour les facteurs de Hill. Ces données renforcent l'idée que leurs propriétés sont voisines bien que les modes de coordination soient très différents.

Dans les deux cas (PEI-MC et PEI-MP), des études de toxicologie et de biocinétique sont nécessaires. Elles permettraient de mieux juger de leur tropisme et donc de leur efficacité vis-à-vis des organes cibles.

Tableau 30 : Résultats obtenus pour les complexes de PEI-MP-Th et PEI-MC-Th.

	PEI-MC-Th	PEI-MP-Th
Charge max :		
mol.mol ⁻¹ de monomère	$0,38 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,08$
mg.mg ⁻¹ de monomère	$0,24 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,03$
CE_{50} (M)	$0,71 \pm 0,13 \times 10^{-3}$ ^{\$}	$0,38 \pm 0,12 \times 10^{-3}$ ^{\$\$}
Facteur de Hill	$1,46 \pm 0,23$ ^{\$}	$1,28 \pm 0,40$ ^{\$\$}
EXAFS :		
Paramètres d'ajustement	5 O à 2,40 Å	9 O à 2,35 Å
	3 N à 2,80 Å	2,8 P à 3,90 Å
	5 C(α) à 3,42 Å	
Sphère de coordination du cation	5 COO ⁻ 3 N	3 PO ₃ ²⁻ monodentes

\$ monomère PEI-MC_{N5} \$\$ monomère PEI-MP_{N5}

F Références

- (143) Vidaud, C.; Bourgeois, D.; Meyer, D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1161–1175.
- (144) Fuller, C. C.; Bargar, J. R.; Davis, J. A.; Piana, M. J. Molecular-Scale Characterization of Uranium Sorption by Bone Apatite Materials for a Permeable Reactive Barrier Demonstration. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 4642–4649.
- (145) Ubios, A. M.; Braun, E. M.; Cabrini, R. L. Lethality Due to Uranium Poisoning Is Prevented by Ethane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP). *Health Phys.* **1994**, *66*, 540.
- (146) Dormehl, I. C.; Louw, W. K. A.; Milner, R. J.; Kilian, E.; Schneeweiss, F. H. A. Biodistribution and Pharmacokinetics of Variously Sized Molecular Radiolabelled Polyethyleneiminomethyl Phosphonic Acid as a Selective Bone Seeker for Therapy in the Normal Primate Model. *Arzneimittelforschung* **2011**, *51*, 258–263.
- (147) Zeevaart, J. R.; Louw, W. K. A.; Kolar, Z. I.; Kilian, E.; van Rensburg, F. E. J.; Dormehl, I. C. Biodistribution and Pharmacokinetics of Variously Molecular Sized ^{117m}Sn(II)-Polyethyleneiminomethyl Phosphonate Complexes in the Normal Primate Model as Potential Selective Therapeutic Bone Agents. *Arzneimittelforschung* **2011**, *54*, 340–347.
- (148) Sawicki, M.; Lecerclé, D.; Grillon, G.; Le Gall, B.; Sérandour, A.-L.; Poncy, J.-L.; Bailly, T.; Burgada, R.; Lecouvey, M.; Challeix, V.; Leydier, A.; Pellet-Rostaing, S.; Ansoborlo, E.; Taran, F. Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for *in vitro* and *in vivo* uranium(VI) chelation. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2768–2777.
- (148) Moedritzer, K.; Irani, R. R. The direct synthesis of α -aminomethylphosphonic acids. Mannich-type reactions with orthophosphorous acid. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1603–1607.
- (149) Von Harpe, A.; Petersen, H.; Li, Y.; Kissel, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2000**, *69*, 309–322.
- (151) Li, B.; Raff, J.; Barkleit, A.; Bernhard, G.; Foerstendorf, H. Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosphovitinA vibrational spectroscopic approach, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 718–725.
- (152) Barkleit, A.; Foerstendorf, H.; Li, B.; Rossberg, A.; Moll, H.; Bernhard, G. Coordination of uranium(VI) with functional groups of bacterial lipopolysaccharide studied by EXAFS and FT-IR spectroscopy, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 9868–9876
- (153) P. Persson, N. Nilsson and S. Sjöberg, Structure and bonding of orthophosphate ions at the iron oxide–aqueous interface, *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, *177*, 263–275.
- (154) Lucks, C.; Rossberg, A.; Tsushima, S.; Foerstendorf, H.; Scheinost, A. C.; Bernhard, G. Aqueous Uranium(VI) Complexes with Acetic and Succinic Acid: Speciation and Structure Revisited. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12288–12300.
- (155) Knope, K. E.; Soderholm, L. Solution and Solid-State Structural Chemistry of Actinide Hydrates and Their Hydrolysis and Condensation Products. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 944–994.
- (156) Kubicki, J. D.; Halada, G. P.; Jha, P.; Phillips, B. L. Quantum mechanical calculation of aqueous uranium complexes: carbonate, phosphate, organic and biomolecular species. *Chem. Cent. J.* **2009**, *3*, 10.
- (157) Safi, S.; Creff, G.; Jeanson, A.; Qi, L.; Basset, C.; Roques, J.; Solari, P. L.; Simoni, E.; Vidaud, C.; Auwer, Den, C. Osteopontin: a uranium phosphorylated binding-site characterization. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 11261–11269.
- (158) Chatelain, G.; Bourgeois, D.; Ravaux, J.; Averseng, O.; Vidaud, C.; Meyer, D. Alternate dipping preparation of biomimetic apatite layers in the presence of carbonate ions. *Biomed. Mater.* **2014**, *9*, 015003.
- (159) Fuller, C. C.; Bargar, J. R.; Davis, J. A.; Piana, M. J. Mechanisms of Uranium

- Interactions with Hydroxyapatite: Implications for Groundwater Remediation. *Environ. Sci. Technol.* **2001**.
- (160) Creff, G.; Safi, S.; Roques, J.; Michel, H.; Jeanson, A.; Solari, P. L.; Basset, C.; Simoni, E.; Vidaud, C.; Auwer, Den, C. Actinide(IV) Deposits on Bone: Potential Role of the Osteopontin–Thorium Complex. *Inorg. Chem.* **2015**, *55*, 29–36.

Conclusion & Perspectives

A Conclusion générale

Ce travail de thèse constitue une étude préliminaire de la décorporation d'actinides (U(VI) et Pu & Th(IV)) basée sur une approche macromoléculaire d'agents chélatants pour vectoriser ces agents vers les compartiments de rétention des actinides (poumons, foie, reins et os principalement). Au cours de ce projet, nous avons synthétisé, à partir d'un polyéthylèneimine branché de 25 kDa, deux polymères fonctionnalisés pour chélater des actinides. Le premier, le polyéthylèneimine méthylène carboxylate (PEI-MC) est un polyaminocarboxylate et constitue l'analogue polymérique du DTPA. Le second, le polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP) est son homologue polyaminophosphonate. Ce dernier a déjà fait l'objet d'une étude *in vivo* et a montré une certaine spécificité de sa biodistribution au niveau du compartiment osseux. Ces polymères sont synthétisés très facilement, respectivement en deux et une étape, et ont montré des taux de fonctionnalisation d'environ 90 % pour le PEI-MC et 100 % pour le PEI-MP.

Etude concernant l'uranyle :

Le manque de moyen de décorporation adapté à la chélation de l'uranyle nous a poussé à étudier les complexes que forment ces deux polymères en milieu pseudo-physiologique avec les formes solubles de cet actinide. A travers des études menées en spectroscopie EXAFS et IR, couplées à une expérience de dynamique moléculaire (pour le complexe PEI-MC-U), nous avons pu confirmer que **le PEI-MP et le PEI-MC complexent l'uranyle avec des taux de charge respectifs de 1,39 et 0,69 mol.mol⁻¹ de monomère**. Le site de complexation de l'uranyle dans le PEI-MC se compose de trois fonctions carboxylate monodentes et d'une bidente, alors que dans le PEI-MP, ce site de complexation est composé de trois fonctions phosphonate qui semblent être monodentes. L'analyse des courbes de charge associées à la formation des complexes PEI-MC-U et PEI-MP-U a révélée que le PEI-MP a un taux de charge en uranyle supérieur à celui du PEI-MC. Cependant, ces données ne permettent pas, à elles seules, d'affirmer que le PEI-MP serait le plus adapté à la chélation de l'uranyle. Des caractérisations supplémentaires doivent être entreprises notamment pour obtenir les constantes de formation de ces deux complexes. Nous y reviendrons dans la partie perspectives.

Le PEI-MP ayant révélé une distribution osseuse après injection chez le primate, a fait l'objet d'une étude complémentaire qui nous a permis de déterminer que ce polymère est capable de perturber l'interaction entre la matrice inorganique de l'os et l'uranyle. Pour ce faire, des plaques d'hydroxyapatite biomimétique de la matrice osseuse (HAp_{plq}), fournies par D. Bourgeois de l'ICSM ont servi de support pour la formation du complexe PEI-MP-U en milieu pseudo-physiologique.

La spéciation de l'uranyle dans ce système ternaire a été caractérisée par spectroscopie EXAFS.

Le spectre EXAFS obtenu a été ajusté par une combinaison linéaire prenant en compte les contributions des complexes PEI-MP-U et hydroxyapatite-U ce qui semble attester que **le PEI-MP est capable de perturber l'interaction entre l'hydroxyapatite et l'uranyle en entrant dans la sphère de coordination de ce dernier**. Il faut tout de même garder à l'esprit que cette étude est très préliminaire et ne repose que sur des mesures EXAFS. Cependant, si ces résultats venaient à être confirmés (cf. perspectives), le PEI-MP pourrait ainsi éviter l'incorporation de l'uranyle dans le volume osseux.

Etude concernant le plutonium :

Dans ce cadre, et en raison de l'activité massique trop importante liée au plutonium, certaines études ont été réalisées avec le Th(IV) utilisé comme analogue.

Les complexes PEI-MC-Pu, PEI-MC-Th et PEI-MP-Th ont été préparés et caractérisés en milieu pseudo-physiologique par spectroscopie EXAFS. Le Pu(IV) et le Th(IV) ont le même site de complexation au sein du complexe qu'ils forment avec le PEI-MC. Celui-ci se compose de cinq fonctions acide carboxylique et de trois amines. Ce site de complexation a déjà été décrit par J. Aupiais *et al.*¹⁶¹ pour la complexation des actinides (IV) par le DTPA. Le site de complexation du Th(IV) dans le PEI-MP est, quant à lui, composé de trois fonctions phosphonate qui semblent monodentes.

L'analyse des courbes de charge associées à la formation des complexes PEI-MP-Th et PEI-MC-Th révèle que ces deux polymères ont des capacités de charge relativement similaires d'environ $0,38 \pm 0,10$ mol.mol⁻¹ de monomère. Pour chaque complexe polymérique de Th(IV), ainsi que pour leur analogue moléculaire à savoir le DTPA-Th et le DTPMP-Th, la CE₅₀ ainsi que le facteur de Hill ont pu être évalués. Les résultats ont montré que la complexation du Th(IV) par le PEI-MP et le PEI-MC était basée sur un phénomène coopératif. Les CE₅₀ associées à la formation des complexes polymériques sont du même ordre de grandeur que celles associées à la formation de leurs analogues moléculaires. Ce résultat est très encourageant car **le PEI-MP et le PEI-MC ne montreraient ainsi pas de diminution d'efficacité de complexation du Th(IV) par rapport au DTPA et au DTPMP**.

En conclusion, nous avons synthétisé le PEI-MC qui est un agent chélatant macromoléculaire des actinides (IV) équivalent au DTPA qui devrait, en théorie, se distribuer au niveau des organes touchés par la rétention des actinides. Nous avons également synthétisé le PEI-MP, un agent chélatant macromoléculaire de l'uranyle (VI) et des actinides (IV), qui est capable de se distribuer sur l'os. Ce dernier pourrait se révéler particulièrement intéressant pour empêcher la migration de l'uranyle (VI) de la surface au volume osseux où il peut être retenu pendant de longues périodes.

B Perspectives

Ce travail ne constitue qu'une première étape dans le développement d'agents chélatants macromoléculaires pour la décorporation d'actinides. Il est donc évident qu'il reste de nombreux points à développer et/ou à caractériser.

I Autres études liées à ces PEI-MP et PEI-MC

a Masse moléculaire, taille et indice de polydispersité

Une caractérisation plus poussée de chacun des polymères s'avère nécessaire en cas de tests biologiques. La détermination de la masse moléculaire au moyen d'une chromatographie d'exclusion, de la taille (rayon hydrodynamique au moyen de la DLS et/ou rayon de gyration au moyen de SLS) qui permettront par ailleurs de donner un indice de polydispersité semble nécessaire.

b Constantes d'affinités

Au cours de ce projet, nous n'avons pas pu déterminer les constantes d'affinité du PEI-MP et du PEI-MC pour les actinides (IV) et (VI) en milieu physiologique.

La formation des complexes PEI-MC-U et PEI-MP-U pourrait être suivie par spectroscopie de fluorescence induite par laser (LIF). Ainsi nous pourrions déterminer les constantes d'affinité de ces deux polymères pour l'uranyle. Ce dosage a été entrepris au cours de mon travail. Mais il s'est avéré que les ions chlorures présents dans les polymères provoquaient l'extinction de la fluorescence de l'uranyle. A l'avenir il faudra procéder à un changement de contre-ions des polymères avant la mesure de fluorescence. Les nitrates pourraient être envisagés.

Pour les complexes d'actinides (IV), cette mesure de constante pourrait être effectuée, dans un premier temps, avec le Th(IV). Un dosage calorimétrique (ITC) pourrait être adapté à la caractérisation des complexes de Th(IV) car ceux-ci ne sont pas détectables en spectroscopie de fluorescence.

c Complexes polymériques de Fe(III) et Ca(II)

Même si la sélectivité n'est pas une priorité dans la stratégie de décorporation que nous mettons en place, déterminer les constantes d'affinité du PEI-MP et du PEI-MC pour des cations biologiques serait intéressant car la complexation de ces cations est souvent associée à la toxicité induite par les agents chélatants.

d Etude de complexation de l'uranyle avec le PEI-MP sur la matrice osseuse

Au cours de ce projet nous avons utilisé des plaques d'hydroxyapatite biomimétiques de la matrice osseuse (HAp_{plq}) comme support pour la formation du complexe PEI-MP-U en milieu pseudo-physiologique. Bien que cette expérience nous ait permis de montrer que le PEI-MP perturbait l'interaction entre l'hydroxyapatite et l'uranyle, la non standardisation des HAp_{plq} a rendu leur caractérisation après le dépôt de PEI-MP très incertaine.

Pour contourner ce problème, nous avons envisagé d'utiliser de la poudre d'hydroxyapatite afin de reproduire cette expérience. Dans ce cas la quantité d'hydroxyapatite peut être obtenue par pesée. La quantité de PEI-MP déposée sur cette poudre pourrait être déterminée par thermogravimétrie (ATG). Contrairement aux HAp_{plq}, qui contiennent du collagène, la poudre d'hydroxyapatite n'est pas composée d'espèces organiques qui viendraient perturber la mesure (dégradation dans une même zone de température). En outre l'ATG permet une mesure directe de la quantité de PEI-MP retenue sur la poudre d'hydroxyapatite tandis que le dosage du phosphore, par ICP-OES, est compliqué par la présence des phosphates au sein de l'hydroxyapatite et donc contraint à un mode de dosage indirect entaché d'une précision moindre.

La poudre d'hydroxyapatite pourrait également servir à évaluer l'impact du PEI-MP sur la quantité d'uranyle qui désorbe de l'hydroxyapatite au cours du temps.

e Tests biologiques

L'aspect biologique n'a pas pu être abordé pendant ce travail de thèse mais suite aux résultats obtenus il semble essentiel d'évaluer, *in vitro*, certains aspects biologiques de ces polymères.

Pour le PEI-MP, qui se distribue au compartiment osseux, les cellules osseuses semblent être un bon point de départ pour des tests biologiques. Ainsi la cytotoxicité du PEI-MP pourrait être évaluée sur des ostéoblastes ou des ostéocytes. G. Carle *et al.* ont montré que les ostéoblastes voyaient leur capacité de minéralisation de la matrice osseuse diminuer en présence d'uranyle. Ils ont aussi observé une pénétration cellulaire de l'uranyle sous forme d'aiguilles de minéralisation de meta-autunite¹⁶². Il pourrait être intéressant de tester l'effet du PEI-MP sur l'activité de ces cellules quand celles-ci sont soumises à une contamination à l'uranyle.

Les cellules épithéliales du rein sont aussi très affectées par une contamination à l'uranyle¹⁶³ en effet elles subissent des modifications structurelles (perte de leurs microfibrilles). Des tests de cytotoxicité du PEI-MP sur ces cellules pourraient dans un premier temps être envisagés. Dans un second temps,

Conclusion & Perspectives

l'action de ce polymère sur la rétention de l'uranyle par les microfibrilles des cellules épithéliales du rein pourrait être un sujet d'étude.

En cas de contamination avec du Pu(IV) les hépatocytes sont touchés par des phénomènes de rétention et de pénétration. Le PEI-MC, qui semble adapté à la chélation des actinides (IV) pourrait être évalué pour sa cytotoxicité sur les hépatocytes. Des études sur la pénétration cellulaire du PEI-MC ainsi que sur sa capacité à complexer le Pu(IV) dans les hépatocytes pourraient être envisagées.

Si les études *in vitro* sont concluantes il serait ensuite intéressant de tester ces polymères sur le petit animal pour vérifier la biodistribution de ces dérivés du PEI. Dans un deuxième temps, une étude sur des animaux contaminés pourrait être envisagée.

II Développement d'autres agents macromoléculaires

Au cours de ce travail nous avons synthétisé deux polymères complexants des actinides en fonctionnalisant un PEI branché de 25 kDa. Cependant il paraît évident que des études sur d'autres types de PEI et/ou d'autres macromolécules peuvent être envisagées pour améliorer la complexation et/ou moduler la biodistribution.

a D'autres PEI

Le PEI a plusieurs avantages (facilité de fonctionnalisation, faible coût) si tant est que ses chélates dérivés ne présentent pas une toxicité rédhibitoire.

Des études avec l'utilisation de formes présentant des poids moléculaires plus faibles (8-10 kDa) ont montré une distribution aux organes différente et des temps de rétention dans le corps globalement plus court¹⁶⁴.

La toxicité des polymères chélatants dérivés pourrait aussi être modifiée par une modulation de taille. L'étude de PEI fonctionnalisés de plus faible poids moléculaires doit donc également être envisagée.

Une fonctionnalisation avec d'autres fonctions chélatantes que des carboxylates et des phosphonates peut aussi être effectuée. Les groupements HOPO ou CAM sont une option possible pour fonctionnaliser le PEI.

Enfin, il est également possible d'imaginer une double fonctionnalisation qui permette d'améliorer les propriétés de ces PEI. La première comprendrait les fonctions chélatantes des actinides et la seconde aurait un rôle de ciblage cellulaire et/ou pourrait permettre une pénétration cellulaire accrue.

b Vers d'autres supports que le PEI

Le projet global est basé sur l'utilisation de la distribution naturelle des objets macro- voire supramoléculaires dans le corps pour moduler la biodistribution des agents chélatants. L'objectif étant de cibler les organes touchés par la rétention des actinides pour augmenter l'efficacité de décorporation. Nous avons choisi ici le PEI comme macromolécule support mais il est tout à fait possible d'envisager d'autres types de matrices de type :

- Polysaccharides, par exemple, qui sont des molécules biocompatibles qu'il est possible de fonctionnaliser. On peut notamment penser, par exemple, au chitosan.
- Peptides modifiés.

Conclusion & Perspectives

- Amphiphiles.

- Nanoparticules (in)organiques qui sont des objets modulables à souhait (nature, taille, forme et porosité) qui semblent très prometteurs pour ce genre d'applications.

Il est bien entendu que ces derniers points font actuellement partie entière de la compétition entre les différents groupes de recherche travaillant sur ce sujet et qu'ils constituent le challenge à relever en terme d'efficacité de chélation, de ciblage, de toxicité et élimination.

C Références

- (161) Aupiais, J.; Bonin, L.; Auwer, Den, C.; Moisy, P.; Siberchicot, B.; Topin, S. On the use of speciation techniques and ab initio modelling to understand tetravalent actinide behavior in a biological medium: An IV DTPA case. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3759–3770.
- (162) Pierrefite-Carle, V.; Santucci-Darmanin, S.; Breuil, V.; Gritsaenko, T.; Vidaud, C.; Creff, G.; Solari, P. L.; Pagnotta, S.; Al-Sahlane, R.; Auwer, Den, C.; Carle, G. F. Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch. Toxicol.* **2016**, *91*, 1903–1914.
- (163) Leggett, R. W. The Behavior and Chemical Toxicity of U in the Kidney: A Reassessment. *Health Phys.* **1989**, *57*, 365.
- (164) Dormehl, I. C.; Louw, W. K. A.; Milner, R. J.; Kilian, E.; Schneeweiss, F. H. A. Biodistribution and Pharmacokinetics of Variously Sized Molecular Radiolabelled Polyethyleneiminomethyl Phosphonic Acid as a Selective Bone Seeker for Therapy in the Normal Primate Model. *Arzneimittelforschung* **2011**, *51*, 258–263.

ANNEXE I : Matériels

Tous les solvants, acides et bases, ainsi que les réactifs proviennent de Sigma-Aldrich. $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ provient de pro-labo et le $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$.

Les purifications des polymères fonctionnalisés ont été réalisées par Ultrafiltration à l'aide d'une cellule agitatrice (Millipore) équipée de membranes d'ultrafiltration (Pall corporation, 1 kDa MWCO, ref : OM001076). Les séparations des complexes PEI-MC-Actinides ou PEI-MC-Actinides ont été effectuées par Ultracentrifugation (Amicon® Ultra-15 centrifugal filter devices, Millipore, 10 kDa MWCO) à une vitesse de 10 000 g pendant 60 min.

Les analyses ^1H RMN ont été faites avec des spectromètres BRUKER AC 200, BRUKER AVANCE 400, BRUKER AVANCE 500.

Les analyses infrarouge ont été effectuées en mode ATR « attenuated total reflexion » en utilisant un diamant 1 réflexion couplé à un spectromètre Bruker tensor 27 équipé d'un détecteur MCT refroidit à l'azote liquide. Les analyses ont été effectuées en mode balayage de 4000 à 600 cm^{-1} (vitesse de scan de 10 kHz).

Les analyses par spectrophotométrie UV-visible ont été réalisées sur un appareil UV-vis Agilent technologies Cary 60 équipé d'une lampe à deutérium et d'une lampe à tungstène. Les analyses ont été effectuées en mode balayage de 200 à 800 nm (vitesse de scan de 3,3 nm/s).

Les analyses d'absorption atomique ont été faites sur un ICP-OES (Perkins Elmer Optima 8000). (débit d'argon pour le plasma : 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, débit d'argon pour nébuliseur : 0,70 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, débit de l'échantillon 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, longueurs d'onde observées : 385 et 409 nm pour l'uranium et 213 et 215 nm pour le phosphore)

Les images de microscopie électronique ont été faites avec un microscope électronique à balayage à canon à effet de champs (MEB) JEOL 6700F et avec un microscope électronique à transmission (MET) JEOL JEM 1400.

Les expériences de thermogravimétrie ont été faites sur un appareil Mettler-Toledo 851^e avec des creusets en alumine de 70 μL . Rampe de température 25-700°C. 5°C.min⁻¹ sous débit d'air 0,5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Le pH des solutions a été mesuré avec un pH-mètre standard (Mettler-Toledo) équipé d'une microélectrode (Model MIXC710).

ANNEXE II : Synthèses

Les chromatographies ont été réalisées sur résine d'exclusion Sephadex LH-60 (Amersham Pharmacia). L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice 60 F₂₅₄ (Merck). La visualisation des spots a été réalisée sous lumière UV (254 nm), ou à l'aide de révélateurs spécifiques : solution de ninhydrine (Sigma-Aldrich), de vanilline (Sigma-Aldrich), d'acide sulfurique à 10%. Les solvants et réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification ultérieure.

Les spectres RMN ¹H, ont été obtenus à 200, 400 et 500 MHz sur un appareil AC-200, Advance 400 ou Advance 500 (Bruker), respectivement. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au chloroforme deutéré (CDCl₃), à l'oxyde de deutérium (D₂O). La multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s (singulet), br s (large singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet dédoublé dédoublé), t (triplet), td (triplet dédoublé), q (quadruplet), quint (quintuplet), sext (sextuplet) et m (multiplet). Les signaux sont décrits comme suit : déplacement chimique (intégration, multiplicité et assignation).

Les réactifs listés ci-après ont pour origine la société Sigma-Aldrich : acide acétique, acide chlorhydrique, bPEI (25 kDa), bromoacétate de tertibutyle, acide phosphoreux, formaldéhyde (37%), acide nitrique, triisopropylsilane (TIS), acide trifluoroacétique (TFA). La *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA), a été achetée à la société IRIS Biotech (Marktredwitz, Germany). UO₂(NO₃)₂.6H₂O provient de pro-labo et le Th(NO₃)₄.H₂O de sigma-aldrich.

A Polyéthylèneimine méthyl carboxylate (PEI-MC)

Le Polyéthylèneimine branché (bPEI, 25 kDa MW) provient de chez Sigma-Aldrich et la *N,N*-diisopropylethylamine (DiPEA) provient de chez Iris Biotech GmbH.

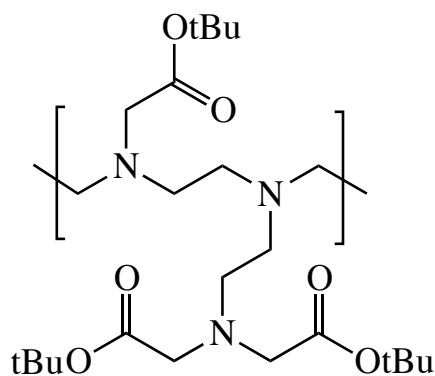


Figure 77 : Monomère de PEI-
CH₂COO-tBu

Le PEI branché 25 kDa (250 mg, 1,45 mmol de forme monomérique) est dissous dans du dichlorométhane (DCM) en présence de DiPEA (1,75 mL, 10 mmol), puis le bromoacétate de tert-butyle (1,7 g, 8,7 mmol), dilué dans du DCM, est ajouté goutte à goutte au mélange. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12h puis la solution est concentrée sous vide. Le résidu est repris avec 10 mL de DCM et lavé avec de l'eau distillée puis avec une

solution de NaCl saturée. La phase organique est finalement séchée avec du sulfate de magnésium anhydre. Après une purification par chromatographie d'exclusion stérique (sephadex LH60), 380 mg de PEI-CH₂COOtBu pour un rendement de 64% sont récupérés.

¹H RMN (200 MHz; CDCl₃): 1,42 ppm (27H, s, C-(CH₃)₃), 2,25–5,00 ppm (16H, m, -CH₂-CH₂-N-CH₂-COOtBu). L'intégration du pic à 1,42 (CH₃ portés par l'ester tert-butylique) fixée à 27 permet de déterminer le taux de fonctionnalisation à 89%, ce qui correspond à 2,7 fonctions tert-butyliques par monomère (le maximum serait 3 pour 100% de fonctionnalisation)

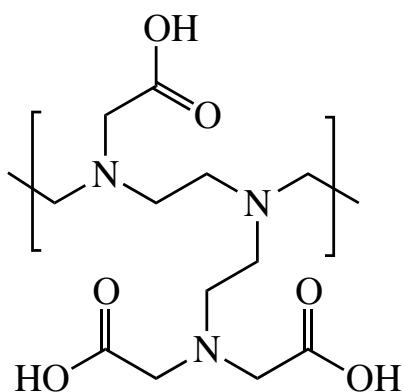


Figure 78 : Monomère de PEI-MC.

Les fonctions ester tert-butyliques du PEI-CH₂COOtBu sont clivées avec 4 mL d'une solution TFA/DCM (1:1) contenant 1% of triisopropylsilane. Après 1h d'agitation le mélange réactionnel est concentré et soumis à plusieurs cycles d'évaporation avec HCl (0,1 M) pour éliminer complètement le TFA et effectuer un changement des contre-ions des ammoniums à la faveur des chlorures. Le produit est repris dans de l'eau ultrapure, le pH est amené à 7-8 par l'intermédiaire de NaOH, et du NaCl (150 mM) est ajouté. Le sel est ensuite purifié par ultrafiltration (membrane cellulose régénérée, 1 kDa MWCO) avec plusieurs cycles de lavage à l'eau ultrapure. Le résidu obtenu est lyophilisé puis séché sur P₂O₅ pour donner le polyaminocarboxylate correspondant. La teneur en eau a été estimée à 1% par ATG et la quantité de contre-ions chlorures a été mesurée par dosage aux sel de Mohr après minéralisation (four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65%). (Dosage sel de Mohr : dosage d'une solution de PEI-MC minéralisé par une solution de nitrate d'argent en présence de chromate de fer) [Cl⁻] = 1,08 mol.mol⁻¹ de monomère.

Le sel est ensuite purifié par ultrafiltration (membrane cellulose régénérée, 1 kDa MWCO) avec plusieurs cycles de lavage à l'eau ultrapure. Le résidu obtenu est lyophilisé puis séché sur P₂O₅ pour donner le polyaminocarboxylate correspondant. La teneur en eau a été estimée à 1% par ATG et la quantité de contre-ions chlorures a été mesurée par dosage aux sel de Mohr après minéralisation (four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65%). (Dosage sel de Mohr : dosage d'une solution de PEI-MC minéralisé par une solution de nitrate d'argent en présence de chromate de fer) [Cl⁻] = 1,08 mol.mol⁻¹ de monomère.

¹H RMN (200 MHz ; D₂O) : 2,63–4,35 ppm (25H, m, -CH₂-CH₂-N-CH₂-COO⁻). Analyses IR : 1681 cm⁻¹ (C-O stretching vibrations), 1129 cm⁻¹ (C-O stretching vibrations).

B Polyéthylèneimine méthylène phosphonate (PEI-MP)

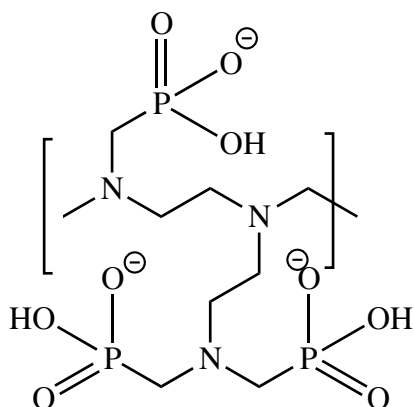


Figure 79 : Monomère de PEI-MC.

La synthèse du PEI-MP a été réalisée suivant le protocole décrit par Moedritzer *et al.*. De l'acide phosphoreux H_3PO_4 (19,1 g, 0,23 mol) est dissous dans une solution de HCl concentrée (50 mL) et le mélange est chauffé à 80°C , puis du formaldéhyde 37% (37,8 mL ; 0,50 mol) est ajouté goutte à goutte à cette solution. Le PEI branché 25 kDa (10,0 g) est dissous dans de l'eau (48 mL) et cette solution est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Le mélange réactionnel est ensuite maintenu sous agitation pendant deux heures à 90°C puis refroidit jusqu'à température ambiante.

Le produit obtenu par décantation, se présente sous forme d'une huile visqueuse orange. Après deux cycles de lavage à l'eau/décantation, le pH est ramené jusqu'à pH 5,0 avec Na_2CO_3 , concentré sous vide puis purifié par ultrafiltration (membrane cellulose régénérée, 1 kDa MWCO) et enfin lyophilisé. 7,8 g de polyéthylèneimine méthylène phosphonate sous forme de sel de sodium ont pu être isolés.

Analyse IR : 1218 cm^{-1} et 850 cm^{-1} (P-O stretching vibrations).

L'analyse élémentaire du PEI-MP (37.25 % C, 14.39 % N, 5.09 % H) permet de calculer le ratio C/N = 2,59. Pour le monomère de PEI commercial $(\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_3)_n$ présentant une distribution en amines I:II:III de 33:33:33, ce ratio C/N est de 2. En se basant sur la formule du monomère de PEI-MP suivante : $(\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_3\text{P}_3\text{O}_9\text{Na}_3)_n$, le ratio C/N expérimental conduit à un taux de fonctionnalisation de 100%.

ANNEXE III : Courbes de charge

A Courbe de charge du complexe PEI-MC-U

5 μL de nitrate d'uranyle ($(\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} [\text{U}] = 0,1 \text{ M}$, pH 1) sont ajoutés à 100, 50, 25, 20, 17, 14 et 9 μL d'une solution de PEI-MC (10 mg.mL^{-1}) puis le volume est ajusté à 400 μL par ajout de tampon TBS ([tris] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM). Le pH de la solution finale est fixé à pH 5,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (1 M). Si le monomère $[(\text{C}_{11,2}\text{H}_{17,4}\text{N}_3\text{O}_{5,4}\text{Na}_{2,7})\text{Cl}]_n$ est considéré, respectant le pourcentage d'amine primaire, secondaire et tertiaire 33:33:33, le ratio molaire uranium : monomère correspond à 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 0,9 ; 1,1 ; 1,5 et 2,0. Les fractions d'uranium complexées, PEI-MC-U, et d'uranium libre (UO_2^{2+}) sont séparées par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g pendant 60 min et la fraction PEI-MC-U est lavée avec 200 μL de TBS à pH 5,0. Les membranes d'Amicon® (contenant le complexe PEI-MC-U) sont minéralisées au four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65% puis chaque solution minéralisée est évaporée à sec et reprise dans une solution d'acide nitrique pH 1,5 avant d'être mesurée par ICP OES. Chaque expérience a été réalisée en triplica.

B Courbe de charge du complexe PEI-MC-Th

Pour éviter l'hydrolyse du Th(IV) qui se produit quand le pH est au dessus 1-2, l'acide nitrilotriacétique a été utilisé comme ligand protecteur (Th:NTA=1:2). 25 μL d'une solution de nitrilotriacétate de thorium ($\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-} [\text{Th}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 1) ont été ajoutés à 70, 35, 25 et 17 μL d'une solution de PEI-MC (10 mg.mL^{-1}) et 50 μL d'une solution de nitrilotriacétate de thorium ($\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-} [\text{Th}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 1,0) ont été ajoutés à 25, 17, 10, 8,0, 6,0 et 3 μL d'une solution de PEI-MC (10 mg.mL^{-1}). Pour chaque échantillon, le volume a été fixé à 400 μL par ajout de tampon TBS (concentration et pH final fixé : [tris] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM, pH = 7,0). Si le monomère $[(\text{C}_{11,2}\text{H}_{17,4}\text{N}_3\text{O}_{5,4}\text{Na}_{2,7})\text{Cl}]_n$ est considéré, respectant le pourcentage d'amine primaire, secondaire et tertiaire 33:33:33, le ratio thorium : monomère de PEI-MC correspond à 0,05 ; 0,11 ; 0,15 ; 0,22 ; 0,50 ; 0,74 ; 1,25 ; 2,1 et 4. Les neuf solutions de complexe PEI-MC-Th ont été purifiées par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g pendant 60 min et lavées avec 300 μL de TBS à pH 7,0. Les membranes d'Amicon® (contenant le complexe PEI-MP-Th) sont minéralisées au four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65% puis

chaque solution minéralisée est évaporée à sec et reprise dans une solution d'acide nitrique pH 1,5. Pour quantifier le thorium, 1800 μL de xylénol orange pH 4,0 (10^{-4} M dans du tampon acétate pH 4,0) sont ajoutés à 200 μL de cette solution. La mesure UV (Agilent technologies Cary 60 UV-vis spectrometer, Tungsten lamp, $\epsilon_{\text{Th(IV)}-\text{xylénol orange}} = 75000$ dans ces conditions à 564 nm) a été répétée trois fois pour chaque fraction. Des blancs ont été faits dans les mêmes conditions ($[\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}] = 5 \times 10^{-4}$ M, pH = 6,5) mais sans polymère. Dans ces conditions 92 ± 2 % du thorium introduit est récupéré dans le filtrat.

La détermination du coefficient d'extinction molaire ($\epsilon_{\text{Th(IV)}-\text{xylénol orange}}$) du complexe Th (IV)-xylénol orange a été déterminé par une courbe d'étalonnage issue de la mesure d'absorbance de solutions de Th(IV)-xylénol orange de concentrations connues (Figure 80).

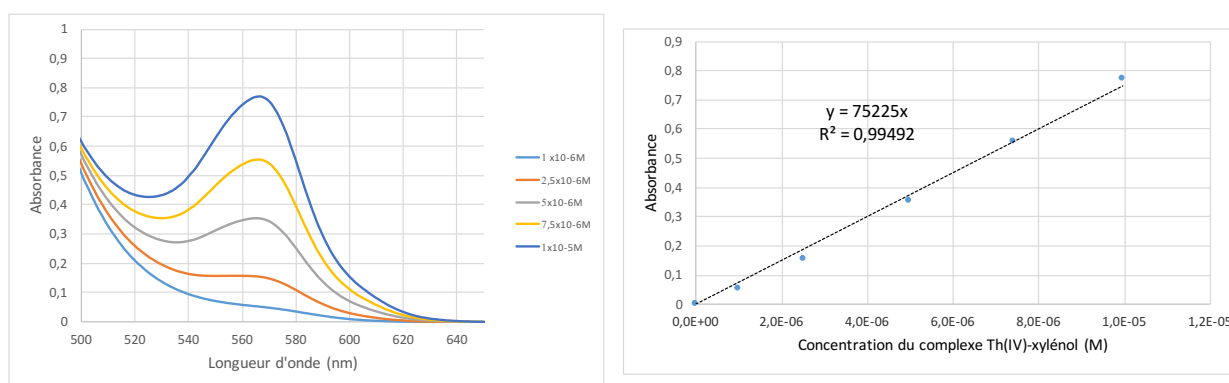


Figure 80 : (Gauche) Spectres UV des complexes de Th(IV)-xylénol orange utilisés pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage. (Droite) Courbe d'étalonnage servant à définir le coefficient d'extinction molaire du complexe Th(IV)-xylénol orange.

C Courbe de charge du complexe PEI-MP-U

5 μL de nitrate d'uranyle ($(\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} [\text{U}] = 0,1\text{M}$, pH 1) sont ajoutés à 100, 50, 25, 20, 12 et 9 μL d'une solution de PEI-MP ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) puis le volume est ajusté à 400 μL par ajout de tampon TBS ($[\text{tris}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$). Le pH de la solution final est fixé à 5 par ajout d'hydroxyde de sodium (1 M). Le ratio uranium : monomère de PEI-MP ($[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_3\text{Na}_6\text{Cl}]_n$) correspond à 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 ; 1,7 et 1,1. Les fractions d'uranyle complexé au PEI-MP et d'uranyle libre sont séparées par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g. La fraction d'uranyle complexé au PEI-MP est lavée avec 200 μL de TBS à pH 5,0. Les membranes d'Amicon® (contenant le complexe PEI-MC-U) sont minéralisées au four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65% puis chaque solution minéralisée est évaporée à sec et reprise dans une solution d'acide nitrique pH 1,5 avant d'être mesurée en ICP OES. Chaque expérience a été réalisée en triplica.

D Courbe de charge du complexe PEI-MP-Th

20 μL d'une solution de nitrilotriacétate de thorium ($\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}$ $[\text{Th}] = 0.01 \text{ M}$, pH 1) ont été ajoutés à 110, 55, 38, 28, 22, 15, 11, 9, et 7 μL d'une solution de PEI-MP (10 mg.mL^{-1}) puis le volume a été fixé à 400 μL par ajout de tampon TBS ($[\text{tris}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$). Le pH de la solution finale est fixé à pH 6,5 par ajout d'hydroxyde de sodium (1 M). Le ratio thorium : monomère de PEI-MP correspond à 0,075 ; 0,150 ; 0,220 ; 0,300 ; 0,380 ; 0,55 ; 0,760 ; 0,925 et 1,200. Les neuf solutions de complexe PEI-MP-Th ont été purifiées par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g et lavées avec 200 μL de TBS à pH 7,0. Les membranes d'Amicon® (contenant le complexe PEI-MP-Th) sont minéralisées au four micro-onde pendant 2h (200°C) dans de l'acide nitrique 65% puis chaque solution minéralisée est évaporée à sec et reprise dans une solution d'acide nitrique pH 1,5. Pour quantifier le Th (IV), 1800 μL de xylénol orange à pH 4 ($[\text{xylénol orange}] = 10^{-4} \text{ M}$ dans du tampon acétate pH 4) sont ajoutés à 200 μL de cette solution. La mesure UV (Agilent technologies Cary 60 UV-vis spectrometer, Tungsten lamp, $\epsilon_{\text{Th(IV)}-\text{xylénol orange}} = 75000$ dans ces conditions à 564 nm) a été répétée trois fois pour chaque fraction. Des blancs ont été faits dans les mêmes conditions ($[\text{Th}(\text{NTA})_2^{2-}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, pH = 6,5) mais sans polymère. Dans ces conditions $92 \pm 2 \%$ du thorium introduit est récupéré dans le filtrat. (cf. vi : Courbe de charge PEI-MC-Th » pour la détermination de $\epsilon_{\text{Th(IV)}-\text{xylénol orange}}$).

ANNEXE IV : Spectroscopie IR

A Mesures IR du complexe PEI-MC

Les spectres infrarouge des solutions de PEI-MC (10 mg.mL^{-1}), dont le pH a été fixé à 5,0 ou à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (0,1 M) ont été enregistrés sur un diamant ATR 1 réflexion entre 4000 et 600 cm^{-1} alors qu'un film humide se formait (résolution 2 cm^{-1} , 64 balayages par spectre, vitesse de balayage 10 kHz).

B Mesures IR du complexe PEI-MC-U

Les spectres infrarouge du complexe PEI-MC-U ont été enregistrés à partir de solutions de complexes PEI-MC-U préparées par ajout de $5 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de nitrate d'uranyle (0,1 M) ou par ajout de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de chlorure d'uranyle (0,025 M) à $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de PEI-MC (10 mg.mL^{-1}), ce qui correspond à 0,2 équivalent U : PEI-MC. Le pH de ces solutions de PEI-MC-U est fixé à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (1,0 M). Les mesures ont été faites par déposition de gouttes de solution de PEI-MC-U sur un diamant ATR 1 réflexion entre 4000 et 600 cm^{-1} (résolution 2 cm^{-1} , 64 balayages par spectre, vitesse de balayage 10 kHz).

C Mesures IR du complexe PEI-MP-U

Les spectres infrarouge du polymère libre (PEI-MP) ont été enregistrés par déposition de gouttes de solutions de PEI-MP (10 mg.mL^{-1}), dont le pH a été fixé à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (0,1 M), sur un diamant ATR 1 réflexion entre 4000 et 600 cm^{-1} (résolution 2 cm^{-1} , 64 balayages par spectre, vitesse de balayage 10 kHz).

D Mesures IR du complexe PEI-MP-U

Les spectres infrarouge du complexe PEI-MP-U ont été enregistrés à partir de solutions de complexe PEI-MP-U préparées par ajout de $10 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de nitrate d'uranyle (0,1 M) à $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de PEI-MP (10 mg.mL^{-1}), ce qui correspond à 0,4 équivalent U : PEI-MP. Le pH a été fixé à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (1 M). Les mesures ont été faites par déposition de gouttes de solutions PEI-MP-U sur un diamant ATR 1 réflexion entre 4000 et 600 cm^{-1} (résolution 2 cm^{-1} , 64 balayages par spectre, vitesse de balayage 10 kHz).

ANNEXE V : Spectroscopie EXAFS

Les mesures EXAFS présentées dans ce travail ont été réalisées au synchrotron de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble sur la ligne ROBL (BM 20). Les échantillons étant dilués (autour du mM), le signal EXAFS provient d'une mesure de fluorescence. La ligne ROBL est équipée d'un détecteur au germanium haute-pureté 13-élément, d'un monochromateur Si (111) refroidit à l'eau et de deux miroirs avec un revêtement au Pt pour filtrer les harmoniques.

Les mesures EXAFS ont été faites au seuil L_{III} de l'uranium, du thorium et du plutonium. Le traitement des données a été fait en utilisant le logiciel ATHENA, et les transformés de Fourier ont été appliqués *via* la fenêtres de Hanning en utilisant le logiciel ARTEMIS .

A Complexe PEI-MC-U.

I Préparation d'échantillon

La solution de complexe PEI-MC-U analysée en EXAF a été préparée en ajoutant 5 μ L d'une solution de nitrate d'uranyle (0,1 M, pH 1,0) à 150 μ L d'une solution de TBS ([tris] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM) où était dissous 5,0 mg de PEI-MC pour avoir une concentration finale en uranyle de 2,5 mM. L'équivalence uranyle : monomère vaut 0,04. Le pH de la solution finale est fixé à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (0,1M), l'uranium non complexé est éliminé par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g et le complexe PEI-MC-U et lavé deux fois avec une solution de TBS pH 7,0.

II Ajustement

Tableau 31 : Chemins de diffusion utilisés pour l'ajustement.

Chemins de diffusion utilisés	Nombre
Oxygènes axiaux	2
Oxygènes équatoriaux	Egal au nombre de C monodentes
Carbones monodentes	variable
Carbones bidentes	5 - C monodentes
Diffusion U-O-C	Egal au nombre de C monodentes (triple)
Diffusion U-O	2 (quadruple)
Chlores	variable

III Simulation de dynamique moléculaire du complexe PEI-MC-U

La simulation de dynamique moléculaire du cation uranyle en présence de quatre monomères de PEI-MC en milieu aqueux (3022 molécules d'eau) a été effectuée par M.DUVAIL à l'institut de chimie séparative de Marcoule (ICSM) avec SANDER14 (un module de AMBER14).

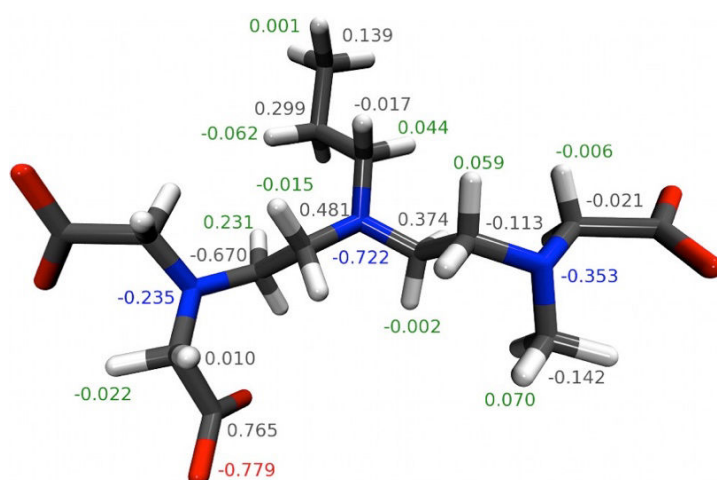


Figure 80 : Monomère du PEI-MC utilisé pour la simulation de DM avec sa distribution de charges partielles. Le formalisme de représentation est : les atomes d'oxygènes en rouge, les atomes de carbone en gris, les atomes d'azote en bleu et ceux d'hydrogène en blanc. Les charges partielles sont écrites dans le même formalisme sauf pour l'hydrogène ou elles sont écrites en blanc.

B Complexe PEI-MC-Th

I Préparation d'échantillon

La solution de complexe PEI-MC-Th analysée en EXAFS a été préparée en ajoutant 26 μL d'une solution de nitrate de thorium ($8,9 \times 10^{-3}$ M, pH 1,0) à 50 μL d'une solution de TBS ([tris] = 500 mM, [NaCl] = 1500 mM, pH 1,0) où sont dissous 5,90 mg de PEI-MC. Ensuite 150 μL d'eau distillée sont ajoutée puis le pH est ajusté à 7,0 par une solution de soude (1 M). Le volume est complété à 500 μL avec de l'eau distillée. (Concentration finale : [Th(IV)] = $4,6 \times 10^{-4}$ M, [tris] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM). L'équivalence Th(IV) : monomère de PEI-MC vaut 0,02.

II Ajustement

Tableau 32 : Chemins de diffusion utilisés pour l'ajustement.

Chemins de diffusion utilisés	Nombre
Oxygènes	5
Amines	3
Carbones alpha	5
Carbones beta	9
Diffusion C-O-Th	10 (triple)
Diffusion O-C-Th	10 (triple)
Chlores	variable

C Complexe PEI-MC-Pu

I Préparation d'échantillon

La solution de complexe PEI-MC-Th analysée en EXAF a été préparée en ajoutant 100 μL d'une solution de chlorure de plutonium (5×10^{-4} M, pH 0) à 100 μL d'une solution de PEI-MC (10 mg.L^{-1}) contenant du TBS ([tris] = 500 mM, [NaCl] = 1500 mM, pH 1,0). Ensuite 250 μL d'une solution de soude 1 M sont ajoutée jusqu'à atteindre un pH 7,0. Le volume est complété à 500 μL avec de l'eau distillée. (Concentration finale : [Pu (IV)] = 5×10^{-5} M, [tris] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM). L'équivalence Pu (IV) : monomère de PEI-MC vaut 0,02.

II Ajustement

Tableau 33 : Chemins de diffusion utilisés pour l'ajustement.

Chemins de diffusion utilisés	Nombre
Oxygènes	5
Amines	3
Carbones alpha	5
Carbones beta	9
Diffusion C-O-Th	10 (triple)
Diffusion O-C-Th	10 (triple)
Chlores	variable

D Complexe PEI-MP-U

I Préparation d'échantillon

La solution du complexe PEI-MP-U analysée en EXAF a été préparée en ajoutant 50 μL d'une solution de nitrate d'uranyle (0,1 M, pH 1,0) à 150 μL d'une solution de TBS où sont dissous 5 mg de PEI-MP pour avoir une concentration finale en uranium de 2,5 mM. L'équivalence U : monomère est égale à 0,04. Le pH de la solution finale est fixé à 7,0 par ajout d'hydroxyde de sodium (0,1 M), l'uranyle non complexé est éliminé par ultracentrifugation sur des filtres Amicon® (Millipore, 10 kDa MWCO) à 10 000 g et le complexe PEI-MP-U est lavé deux fois avec une solution de TBS pH 7,0.

II Ajustement

Tableau 34 : Chemins de diffusion utilisés pour l'ajustement.

Chemins de diffusion utilisés	Nombre
Oxygènes axiaux	2
Oxygènes équatoriaux	variable
Phosphores	variable
Amines	variable (loin du cation + de 3,4 Å)
Diffusion U-O-P	Egal au nombre de phosphore (triple)
Diffusion U-O	2 (quadruple)
Chlores	variable

ANNEXE VI : Expériences de sorptions sur les plaques biomimétiques d'hydroxyapatite synthétique

A Préparation des plaques d'hydroxyapatite synthétique (HAp_{plq})

Les plaques d'hydroxyapatite synthétique ont été fournies par D. Bourgeois de l'Institut de Chimie Séparative de Marcoule. Les HAp_{plq} sont des plaques de verre utilisées en microscopie (13 mm de diamètre) couverte avec du collagène et de l'hydroxyapatite sur les deux faces. La cristallisation lente et la croissance de la couche minérale sur les microfibrilles de collagène manifestent des propriétés physico-chimiques similaires à la partie minérale de l'os et une compatibilité avec les cellules osseuses. La préparation et la caractérisation des HAp_{plq} ont été précédemment publiées.

B Dépôt de PEI-MP sur HAp_{plq}

Les HAp_{plq} ont été plongées dans 1 mL d'une solution de PEI-MP (1 mg.mL⁻¹, pH 7,0) pendant 48h à 298 K sous agitation orbitale (200 rpm). Elles ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pendant 15 min sous agitation orbitale (200 rpm). Les solutions de trempage et de lavage ont ensuite été minéralisées (micro-onde 2 h, 200 Hz dans HNO₃ 65%). La quantité de phosphore a été déterminée par analyse élémentaire (ICP-EOS).

Tableau 35 : Quantité de PEI-MP sorbée à la surface des HAp_{plq} (donnée avec l'incertitude expérimentale).

HAp _{plq}	Quantité de PEI-MP sorbée (mg)	% de PEI-MP de la solution de trempage retenu
1	0,13 ± 0,01	26
2	0,03 ± 0,01	18
3	0,02 ± 0,01	8
4	0,19 ± 0,01	14
moyenne	0,09 ± 0,08	16.4

C Complexation de l'uranyle sur les PEI-MP-HAP_{plq} et HAp_{plq}

Les HAP_{plaque} sur lesquelles ont été déposées le PEI-MP (PEI-MP-HAP_{plq}) et les HAP_{plq} natives ont été plongées pendant 4h dans une solution tamponnée de nitrate d'uranyle (TBS, [U] = 2×10^{-5} M, pH 7) à 298 K sous agitation orbitale (200 rpm). Ensuite les plaques ont été lavées pendant 15 min avec une solution de TBS (pH 7). Cette procédure a été reproduite pour chaque plaque. A la fin le ratio U : PEI-MP à la surface des PEI-MP-HAP_{plq} a été déterminé indépendamment pour chaque PEI-MP-HAP_{plq} par ICP-OES. La quantité moyenne, établie sur quatre plaques, d'uranium retenu par plaque est égale à $2,50 \pm 0,39 \times 10^{-8}$ mol pour PEI-MP-HAP_{plq} et $2,33 \pm 0,54 \times 10^{-8}$ mol pour les HAP_{plq}. Cela représente environ 53% de la quantité d'uranium initiale dans la solution de trempage pour le PEI-MP-HAP_{plq} et 50% pour HAP_{plq}. Le ratio molaire U : monomère de PEI-MP est estimé à environ 0,1 pour PEI-MP-HAP_{plq}.

I Mesures EXAFS : U-HAP_{plq} U-PEI-MP-HAP_{plq}

Les quatre plaques U-PEI-MP-HAP_{plq} et les quatre plaques U-HAP_{plq} ont été grattées pour récupérer les poudres correspondantes. Ces poudres ont été séchées sous vide en présence de P₂O₅ puis conditionnées en pastille de polyéthylène pour être analysées en EXAFS.

a Ajustement EXAFS : U-PEI-MP-HAP_{plq} et U-HAP_{plq}

Les phases et amplitudes ont été calculées en utilisant le code de simulation FEFF9. Le modèle utilisé pour les calculs de phases et d'amplitudes provient d'un modèle de chimie quantique décrit précédemment. Le nombre total de coordination a été fixé à 5+2, qui est un mode de coordination habituel de l'uranyle. Des chemins de diffusion simple ont été considérés pour les oxygènes oxo (O_{ax}), les oxygènes des phosphonates (O_{phos}) et les oxygènes de l'eau (O_{eau}), ainsi que pour le phosphore (P) des fonctions phosphonate. L'addition d'un chemin de diffusion simple impliquant du chlore (PEI-MP-U) ou du calcium (U-HAP_{plq}) augmente de manière significative la qualité des ajustements et ils ont été ajoutés quand cela s'est avéré nécessaire.

b Ajustement par combinaison linéaire de U-PEI-MP-HAP_{plq}

L'ajustement par combinaison linéaire a été fait avec les spectres initiaux U-PEI-MP et U-HAP_{plq}. Cette procédure a été faite indépendamment dans l'espace k^2 entre 2,6 et 12,2 Å⁻¹ et dans l'espace réel avec la transformé de Fourier entre 1,4 et 5 Å.

Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides

Résumé

Depuis le développement de l'industrie nucléaire, les risques de contamination humaine avec des actinides subsistent et doivent être pris en considération. Le développement des arsenaux nucléaires, les accidents industriels liés à la filière nucléaire civile (Tchernobyl, Fukushima) ou l'utilisation d'armement à l'uranium appauvri dans les conflits armés (Guerre du Golfe, Kosovo) font des contre-mesures visant à décorporer les actinides chez l'homme un enjeu stratégique majeur. Les actinides sont des éléments radiotoxiques et chimiotoxiques (dont la dangerosité dépend de l'isotopie) qui, en cas d'absorption, peuvent provoquer des dommages (cancers, nécroses, etc.) aux tissus et aux organes qu'ils ciblent (foie, reins, squelette). Actuellement l'efficacité de décorporation du chélatant moléculaire de référence, le DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique), est limitée par sa faible distribution aux organes touchés par la rétention des actinides. Ce projet de thèse constitue une première étape dans l'exploration d'une stratégie de fonctionnalisation macromoléculaire pour vectoriser les agents chélatants vers ces organes cibles de la rétention des actinides dans le but d'augmenter leur excrétion. Pour initier cette problématique, nous avons choisi de nous intéresser aux capacités de complexation de l'uranylle (U(VI)), du plutonium et du thorium (Pu(IV) et Th(IV)) par deux polyéthylèneimines (PEI) fonctionnalisés avec des groupements carboxylate et phosphonate. L'élaboration des courbes de charge associées à la formation des complexes polymériques d'actinides combinées à des études de spectroscopie EXAFS et IR en milieu pseudo-biologique ont permis de définir les capacités de charge maximale de chaque polymère et de caractériser les sites de complexation. Ces données permettent de mieux comprendre les mécanismes d'affinité des polyéthylèneimines fonctionnalisés pour les actinides considérés et donc de progresser dans le design de décorporants.

Mots clefs : agents chélatants, décorporation, actinides, spectroscopie EXAFS, plutonium, uranylle, polyéthylèneimine.

Toward a macromolecular approach for the actinides decorporation

Summary

Since the development of the nuclear industry, the risks of human contamination with actinides are not to be neglected and should be taken into account. Development of the nuclear weapon programs, nuclear plant accidents from civil use (Chernobyl, Fukushima) or use of depleted uranium ammunitions in war zones (Gulf War, Kosovo) have made countermeasures to decorporate actinides in humans an important strategic issue. Actinides are radiotoxic and chemotoxic elements (the relative dangerousness of which depends on their isotopy) which, if absorbed, can cause damages to the tissues and organs they target (bone, liver cancers or necrosis, etc.). To date the efficiency of the molecular decorporation agent of reference, DTPA (diethyleneiminetriamine pentaacetic acid), is limited by its weak distribution rate to the target organs (bone, liver, kidneys). This project explores the possibility to enhance the actinide body excretion using a targeting strategy of the decorporation agent towards the target organs. To initiate this question, we have chosen to focus on the complexing capacities of uranyl (U(VI)), plutonium and thorium (Pu(IV) and Th(IV)) by two polyethyleneimines (PEI) functionalized with carboxylate and phosphonate groups. The measurement of the uptake curves associated with the formation of the actinide polymer complexes combined with EXAFS and IR spectroscopic studies in a pseudo-biological medium made it possible to define the maximum loading capacities of each polymer and to characterize the complexation sites. These data allow to better understand the mechanisms of affinity of the functionalized polyethyleneimines for the above actinides and thus to progress in the design of new decorporation agents.

Key words: chelating agents, decorporation, actinides, EXAFS spectroscopy, plutonium, uranyl, polyethyleneimine.