



HAL
open science

Mécanismes d'interaction du plutonium et du thorium avec deux protéines impliquées dans le cycle du fer : transferrine et ferritine

Cyril Zurita

► **To cite this version:**

Cyril Zurita. Mécanismes d'interaction du plutonium et du thorium avec deux protéines impliquées dans le cycle du fer : transferrine et ferritine. Radiochimie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ4015 . tel-03669045

HAL Id: tel-03669045

<https://theses.hal.science/tel-03669045v1>

Submitted on 16 May 2022

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Mécanismes d'interaction du plutonium et du thorium avec deux protéines impliquées dans le cycle du fer : transferrine et ferritine

Cyril ZURITA

Institut de Chimie de Nice

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Chimie
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Christophe DEN AUWER
Co-encadrée par : Gaëlle CREFF
Soutenue le : 29/03/2022

 Institut de
Chimie de Nice

Devant le jury, composé de :

Pr. Virginie CHAPON, *Rapportrice*, Aix-Marseille
Université et CEA, CEA Cadarache

Pr. Anne BLEUZEN, *Rapportrice*, ICMMO, Université
Paris-Saclay, Orsay

Dr. Liliana QUINTANAR, *Examinatrice*, Cinvestav,
Departamento de Química, Mexique

Pr. Alain BURGER, *Examineur*, ICN, Université Cote
d'Azur, Nice

Pr. Satoru TSUSHIMA, *Invité*, Tokyo Institute of
Technology, Tokyo

Pr. Christophe DEN AUWER, *Directeur de thèse*, ICN,
Université Cote d'Azur, Nice

Dr. Gaëlle CREFF, *Encadrante de thèse*, ICN,
Université Cote d'Azur, Nice

Mécanismes d'interaction du plutonium et du thorium avec deux protéines impliquées dans le cycle du fer : transferrine et ferritine

Jury :

Rapportrices

Pr. Virginie CHAPON, Aix-Marseille Université et CEA, CEA Cadarache
Pr. Anne BLEUZEN, ICMMO, Université Paris-Saclay, Orsay

Examineurs

Dr. Liliana QUINTANAR, Cinvestav, Departamento de Química, Mexique
Pr. Alain BURGER, ICN, Université Cote d'Azur, Nice

Invité

Pr. Satoru TSUSHIMA, Tokyo Institute of Technology, Tokyo

Encadrement de la thèse

Pr. Christophe DEN AUWER, ICN, Université Cote d'Azur, Nice
Dr. Gaëlle CREFF, ICN, Université Cote d'Azur, Nice

Résumé :

L'acquisition d'informations structurales sur les complexes d'actinides avec les protéines permet d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques de contamination. Notre étude porte sur le plutonium ainsi que sur son analogue thorium (au degré d'oxydation +IV), dont le comportement présente des similitudes avec l'homéostasie du fer. Une première partie de mon travail a eu pour objectif de décrire les modes d'interaction entre Pu/Th et la ferritine qui régule le stockage du fer dans les cellules. La ferritine est composée d'un cœur ferrique d'oxo-hydroxo de Fe(III) entouré d'un anneau protéique. Les mesures XAS (EXAFS) couplées à de la modélisation ont permis d'identifier les interactions entre Pu/Th et la ferritine mais aussi de déterminer la structure des sites de complexation. Le deuxième axe de recherche a porté sur la complexation de Pu/Th par la transferrine dont le rôle est le transport du fer sérique vers les cellules. Les mesures XAS (EXAFS) couplées à de la modélisation ont permis de montrer que Pu/Th(IV) interagissent avec les deux sites de complexation du fer dans la protéine. Dans ces conditions, la modification de la structure tertiaire de la protéine a été analysée par SAXS. Cette dernière paraît être en conformation ouverte lorsque deux cations Pu/Th lui sont liés alors que dans le cas du Fe(III) elle adopte une conformation fermée. La conformation de la transferrine (fermée) est essentielle à sa reconnaissance par la protéine réceptrice à la surface cellulaire afin d'y être internalisée.

Mots clés :

Plutonium, transferrine, ferritine, métalloprotéine, XAS

Abstract:

The acquisition of structural information on actinide complexes with proteins allows to improve the understanding of biological mechanisms of contamination. Our study focuses on plutonium and its analogue thorium (at oxidation state +IV), whose behaviour shares some similarities with the homeostasis of iron. The first part of my work aimed at describing the interaction modes between Pu/Th and ferritin which regulates the storage of iron in cells. Ferritin is composed of a ferric core of Fe(III) oxo-hydroxo surrounded by a protein ring. XAS measurements (EXAFS) coupled with modelling allowed to identify the interactions between Pu/Th and ferritin but also to determine the structure of the complexation sites. The second axis of research focused on the complexation of Pu/Th by transferrin whose role is the transport of serum iron into the cells. XAS measurements (EXAFS) coupled with modelling have shown that Pu/Th(IV) interact with the two iron complexation sites in the protein. Under these conditions, the modification of the tertiary structure of the protein was analysed by SAXS. The protein appears to be in an open conformation when two Pu/Th cations are bound to it, whereas in the case of Fe(III) it adopts a closed conformation. The closed conformation of transferrin is essential for its recognition by the receptor protein on the cell surface to be internalized.

Key words:

Plutonium, transferrin, ferritin, metalloprotein, XAS

Remerciements

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

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Christophe Den Auwer ainsi que mon encadrante, le Docteur Gaëlle Creff, pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant cette thèse, mais également leurs conseils avisés dans les différents projets menés. Merci pour votre disponibilité et votre patience, surtout lors des discussions en anglais.

Je souhaite remercier le Professeur Virginie Chapon et le Professeur Anne Bleuzen qui ont accepté d'être rapportrices de mon travail de thèse. Je remercie également le Professeur Alain Burger, le Docteur Liliana Quintanar et le Professeur Satoru Tsushima pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Jean Aupiais d'avoir participé à mes différents comités de thèse.

Je remercie particulièrement le Professeur Satoru Tsushima du Tokyo Institute of Technology de Tokyo, avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de ma thèse pour la réalisation des modèles, calculés par dynamique moléculaire (MD) et par DFT, dans les différents projets de recherches. Je le remercie également pour sa disponibilité, ses conseils et son implication dans mon travail de recherche.

Je remercie également le Docteur Carole Bresson et le Docteur Marta Garcia Cortes du CEA de Saclay, avec qui j'ai pu collaborer, et qui ont amené toute leur expertise lors du dosage de la courbe de charge de la ferritine par ICP-MS/MS.

Je remercie grandement toute l'équipe de la ligne de lumière MARS, du synchrotron SOLEIL, et plus particulièrement le Docteur Pier Lorenzo Solari, responsable de la ligne de lumière, pour m'avoir conseillé et aidé pour l'optimisation et les réglages de la ligne de lumière ainsi que les acquisitions de mes échantillons. Je tiens également à remercier le Docteur Denis Menut, de l'équipe de la ligne de lumière MARS, avec qui j'ai collaboré dans l'acquisition des premiers spectres de diffusion de protéine sur cette ligne et leurs analyses. Je le remercie pour son investissement, sa disponibilité et ses conseils tout au long de ce projet.

Je souhaite remercier le Docteur Sandrine Dourdain de l'ICSM, qui m'a initié à la technique de la Diffusion des Rayons X, mais également pour ses conseils, sa disponibilité et son expertise dans l'analyse des spectres de diffusion.

Je remercie également le Professeur Philippe Moisy, du CEA de Marcoule, pour ses conseils avisés lors du retraitement d'une solution usée de plutonium et sur la manipulation du plutonium de manière générale.

D'autre part, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe RHE, le Docteur Hervé Michel, le Docteur Maria Rosa Beccia, le Docteur Aurélie Jeanson et le Docteur Gaëlle Creff pour leur bienveillance et leur disponibilité au quotidien.

Je remercie aussi tous les doctorants qui ont partagé le bureau et mon quotidien pendant ces trois années, à savoir Simon, Jeanne, Romain et Micol. Grâce à vous, ces trois années sont remplies de bons souvenirs et d'anecdotes bien croustillantes. Nos diverses discussions éclairées me manqueront grandement. Une pensée particulière pour mon ami de toujours, Simon, dont notre première rencontre remonte à l'époque de l'internat au lycée Jean Mermoz de Montpellier qui nous a lié d'amitié (et avec de nombreuses anecdotes qui nous font bien rire encore aujourd'hui), puis aux bancs de la faculté lors du Master à l'Université Montpellier II. A nos longues nuits sur la ligne de lumière à parler de science jusqu'au petit matin (et surtout à regarder des films). Une autre pensée pour Romain, arrivé pendant ma thèse, avec qui j'ai passé de très bons moments de partage dans de nombreux sujets d'actualité et parfois même de science ! Nul doute que les laboratoires et le bureau sont entre de bonnes mains ! Ne change pas ! Par contre, améliores-toi aux échecs...

Enfin, je remercie infiniment mes parents qui m'ont donné la chance de pouvoir réaliser les études que je souhaitais et de m'avoir toujours soutenu. Je remercie également toute ma famille qui m'ont encouragé tout au long de ma thèse et de mes études. Une pensée particulière pour ma compagne qui m'a épaulé, conseillé et soutenu durant ces années et que je remercie énormément ! Je la remercie également pour la patience qu'elle a fait preuve lors de l'écoute de nombreuses répétitions d'oraux en français comme en anglais mais aussi pour sa lecture minutieuse de ce manuscrit.

Table des matières

Table des matières	7
Liste des Abréviations	11
Liste des Figures	12
Liste des Tableaux	17
Introduction	19
Chapitre I :.....	23
I. Les actinides, des métaux lourds d'intérêts militaire et économique, source de préoccupations sociétale et environnementale.....	25
1. De la découverte de la radioactivité à la caractérisation d'une nouvelle famille d'éléments chimiques instables : les actinides.....	25
a) Découverte de la radioactivité.....	25
b) Histoire des éléments actinides.....	26
c) Des concepts fondamentaux aux applications stratégiques.....	27
2. De la structure électronique aux propriétés physico-chimiques des actinides en solution.....	29
a) Structure électronique : des propriétés au comportement chimique.....	30
b) Réactivité des actinides en solution aqueuse.....	31
3. Actinides dans l'environnement : sources et comportements du Pu et du Th.....	34
a) Origine naturelle du Th et du Pu.....	34
b) Origine anthropique du Th et du Pu.....	35
4. Pu et Th en milieux biologiques.....	38
a) Nature de la toxicité.....	38
b) Études en milieu biologique.....	39
II. Interactions protéines-actinides, que sait-on ?.....	42
1. Quelques rappels sur la structure d'une protéine.....	42
2. Interaction des An(IV) avec les protéines et métalloprotéines.....	46
3. Le cycle du fer dans l'organisme humain.....	49
a) Cycle et rôle du fer chez les vertébrés.....	49

b) Absorption intestinale du fer	50
c) Quelle similitude biologique entre le Fe(III) et le Pu(IV) ?	53
Chapitre II :	56
I. Le plutonium : origine, découverte et propriétés physico-chimiques.....	58
1. Découverte du plutonium	58
2. Propriétés physico-chimiques du plutonium en solution aqueuse.....	60
a) États d'oxydation du plutonium en solution.....	60
b) Complexation du plutonium en solution	62
c) Le cas particulier de l'hydrolyse	63
II. Préparation d'une solution aqueuse de Pu(IV).....	64
1. Destruction de la matière organique et stabilisation du Pu	65
a) Oxydation en Pu(VI) et destruction de la matière organique	65
b) Réduction du Pu(VI) en Pu(III) par un mélange hydrazine/hydroxylammonium nitrate..	67
c) Réoxydation du Pu(III) en Pu(IV)	72
2. Purification de la solution de plutonium par résine échangeuse d'anions.....	74
3. Précipitation du Pu(IV) sous forme colloïdale et reprise dans un acide dilué.....	76
III. Préparation et caractérisation d'une solution de carbonate de plutonium	78
1. Données bibliographiques	78
2. Réalisation de la solution de carbonate de plutonium et caractérisation par méthodes spectroscopiques.....	80
Chapitre III :	86
I. La ferritine, protéine omniprésente dans le Vivant	88
1. Généralités de la ferritine	88
2. Structure et rôle des sous-unités.....	89
3. Assemblage des sous-unités pour former la ferritine	91
4. Internalisation du Fe(II) et structure du centre de ferroxidase	92
a) Interaction du Fe(II) dans le canal quadruple C4 et le canal triple C3	92
b) Interaction du Fe(II) dans les sites de ferroxidase et de nucléation et formation du cœur ferrique de ferrihydrite	94

II. Mise en évidence et caractérisation de l'interaction entre les An(IV) et la ferritine de la rate de cheval	98
1. Caractérisation de la ferritine utilisée.....	98
2. Interaction et localisation du Th(IV), approche macroscopique	101
3. Première approche de l'interaction des An(IV) avec la ferritine par IRTF	105
4. Étude de l'interaction du Pu(IV) avec la ferritine par UV-Visible.....	107
5. Détermination de l'environnement local du Th(IV) et du Pu(IV) liés à la ferritine	109
a) Quels sont les ligands qui interagissent avec le Th(IV) et le Pu(IV) ? Approche par modélisation	109
b) Étude de l'environnement proche du Pu(IV) complexé à la ferritine dans la simulation B - Approche par spectroscopie EXAFS.....	116
6. Ajustement des données EXAFS des complexes F-Pu et F-Th.....	119
III. Conclusion sur l'interaction des An(IV) avec la ferritine	123
Chapitre IV :	127
I. La transferrine, une protéine très étudiée	129
1. Description de la transferrine et de ses fonctions biologiques	129
2. Cycle de l'internalisation cellulaire de la transferrine sérique	131
3. Environnement local du Fe(III) lié à la transferrine	132
4. Interactions du Th(IV) et du Pu(IV) avec la transferrine, que sait-on ?.....	134
5. Les sidérophores, des ligands d'intérêt, impliqués dans les mécanismes de détoxification du fer	137
II. Interaction locale du Th(IV) et du Pu(IV) avec la transferrine	141
1. Première approche de l'interaction du Pu(IV) et du Th(IV) avec la transferrine.....	141
a) Analyse des complexes An ₂ Tf par spectrophotométrie UV-Visible et comparaison avec la holotransferrine	141
b) Analyse des complexes An ₂ Tf par spectroscopie IRTF et comparaison avec la holotransferrine	143
2. Réalisation de plusieurs modèles Pu ₂ Tf par calcul de dynamique moléculaire	146
3. Étude de l'environnement proche du Pu(IV) et du Th(IV) dans les complexes de transferrine par spectroscopie EXAFS.....	151

a) Détermination de l'environnement proche du Pu(IV) dans la transferrine par dynamique moléculaire	151
b) Ajustement des données EXAFS du complexe Pu ₂ Tf.....	154
c) Ajustement des données EXAFS du complexe Th ₂ Tf.....	163
4. Hypothèses sur la structure de la sphère de coordination de Pu et Th dans le complexe M ₂ Tf.	164
III. Analyse de la conformation des complexes de la transferrine et influence de l'ajout d'un sidérophore dans le milieu.....	168
1. Description de la SAXS et analyse des spectres de diffusion de nos complexes	168
2. Analyse du rayon de giration des complexes de la transferrine par l'approximation de Guinier	171
3. Tentative d'ajustement des spectres SAXS des complexes de la transferrine avec un facteur de forme simple	176
IV. Conclusion sur l'interaction des An(IV) avec la transferrine.....	182
Conclusion et réflexion générale	185
Références	189
Annexes	199
Annexe A : Protocoles de préparation des solutions	200
Annexe B : Méthode d'analyses des complexes An(IV)-protéine sur Grands Instruments	203
Annexe C : Autres méthodes d'analyses des complexes An(IV)-protéine.....	210
Annexe D : Données complémentaires de l'étude des complexes An(IV)-ferritine	212
Annexe E : Données complémentaires de l'étude des complexes An(IV) ₂ Tf.....	220

Liste des Abréviations

Dans le manuscrit, le nom des techniques utilisées sont référencées en anglais pour plus de clarté.

An : actinides

apoTf : apotransferrine

cIEF : Capillary IsoElectric Focusing (*Focalisation isoélectrique capillaire*)

DFT : Density Functional Theory (*Théorie de la fonctionnelle de la densité*)

EXAFS : Extended X-ray Fine Structure (*Structure fine étendue de l'absorption des rayons X*)

F : Ferritine

Fe : Fer

ICP-MS/MS : Tandem Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (*Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en tandem*)

IR : Infrarouge

MD : Molecular Dynamics (*Dynamique Moléculaire*)

Pu : Plutonium

UNSCEAR : United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (*Comité scientifique des Nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants*)

SAXS : Small Angle X-Ray Scattering (*Diffusion des Rayons X aux Petits Angles*)

Tf : Transferrine

Th : Thorium

XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure (*Spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X*)

XAS : X-ray Absorption Spectroscopy (*Spectrométrie d'absorption des Rayons X*)

Liste des Figures

Figure 1 : Pierre Curie (à droite) et Maria Sklodowska-Curie (à gauche) (<i>source : larousse.fr</i>).....	26
Figure 2 : L'horloge de l'Apocalypse (« Bulletin of the Atomic Scientists », 2022)	28
Figure 3 : Tableau périodique de Mendeleïev (éléments f : série des lanthanides en rose, série des actinides en orange).	29
Figure 4 : Nombre d'essais nucléaires souterrains et atmosphériques dans le monde de 1945 à 1998 (<i>source : https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Environnement/retombees-tirs-armes-nucleaires/</i>).....	35
Figure 5 : Représentation graphique de la bio-distribution, post injection, dans les différents organes majeurs du Th(IV) et du Pu(IV) chez le chien (<i>Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. 1, 1990; Stover et al., 1960</i>)	40
Figure 6 : Modèle bio-cinétique des actinides après contamination (<i>Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. 1, 1990; Smith, 1995</i>)	41
Figure 7 : Mise en évidence de la liaison peptidique	42
Figure 8 : Interaction locale d'un Ca(II) dans la calmoduline (<i>PDB : 1CKK ; à gauche</i>) (Osawa et al., 1999) et interaction d'une porphyrine contenant du fer en son centre avec la myoglobine (<i>PDB : 1A56 ; à droite</i>) (Timkovich, Bergmann, Arciero et Hooper, 1998)	45
Figure 9 : Schéma de l'absorption intestinale du fer dans le duodénum (<i>source : http://clashdot.wdfiles.com/local--files/info%3Airon-metabolism/FeAbs.jpg</i>)	50
Figure 10 : Analogie entre le Pu(IV) et le Fe(III) entre les valeurs log K_1 de différents agents chélateurs ($I = 0 ; T = 25 ^\circ C$) symbolisées par des losanges. La courbe représente l'analogie parfaite (1 : 1) (Ansoborlo et al., 2006).....	54
Figure 11 : Comparaison des conformation d'un complexe Fe_2 -transferrine et Pu_2Fe_N -transferrine (M. P. Jensen et al., 2011)	54
Figure 12 : Potentiel d'oxydo-réduction des différentes formes du plutonium (1 M $HClO_4$, $25^\circ C$), en Volt par rapport à l'électrode normale à hydrogène (R. J. Lemire et NEA Data Bank, 2001).....	60
Figure 13 : (a) Ions aquo du plutonium dans une solution à 1 M en perchlorate (<i>Le Pu(V) est dans $NaClO_4$ à $pH = 7$, le Pu(VII) est dans 2,5 M $NaOH$</i>) ; (b) Spectres d'absorption électronique des principaux ions du plutonium aquo enregistrés à $25 ^\circ C$ (Clark, 2000)	61
Figure 14 : Spéciation du plutonium (IV) dans l'eau ($[Pu] = 2,5 \text{ mM}$) à $25^\circ C$. Ce calcul a été réalisé à l'aide du logiciel JChess© en prenant en compte les différentes constantes thermodynamiques de l'hydrolyse du Pu(IV) citées ci-dessous. La précipitation du Pu n'a pas été prise en compte.....	63
Figure 15 : Photo du montage utilisé.....	65
Figure 16 : Spectre UV-Visible de la solution de Pu(VI) après oxydation aux fumées blanches.....	66
Figure 17 : a. Structure du nitrate d'hydroxylammonium ; b. Structure de l'hydrazine	67
Figure 18 : A gauche : diagramme de répartition des espèces de l'hydrazine suivant le pH. A droite : Diagramme potentiel-pH du couple N_2 /hydrazine (Kotrly et Sucha, 1985; Schmidt, 1984).....	68
Figure 19 : Couples rédox de l'hydroxylammonium (Bard, Parsons et Jordan, 1985).....	70
Figure 20 : Spectre UV-Visible de la réduction du plutonium en solution et mise en évidence d'un mélange d'états d'oxydation.	71
Figure 21 : Spectre UV-Visible à $t=+24h$ du plutonium après la réduction par un mélange d'hydrazine et d'hydroxylamine	72
Figure 22 : Spectre UV-Visible du Pu(IV) après la destruction du NH/NHA	73
Figure 23 : Schéma de la purification de la solution de Pu(IV) sur une résine DOWEX 1/8 chlorure.	74
Figure 24 : Spectre UV-Visible du complexe hexanitrate de Pu(IV) après purification par une résine échangeuse d'ions DOWEX.....	75

Figure 25 : Spectres d'absorption des complexes de plutonium dans l'acide nitrique ((Marsh et al., 2000)	76
Figure 26 : Structure d'un dimère de plutonium(IV) colloïdal (Morss et al., 2006)	77
Figure 27 : Spectre UV-Visible du Pu(IV) après la reprise des colloïdes de plutonium(IV) dans une solution HNO ₃ 0,5 M..	77
Figure 28 : Spéciation du Pu(IV) en présence de carbonate en solution ([Pu] = 2,5 mM ; [CO ₃ ²⁻] = 3 M) à 25°C. Ce calcul est réalisé à l'aide du logiciel JChess en prenant les différentes constantes thermodynamiques des complexes de carbonate de Pu(IV) citées ci-dessus.	79
Figure 29 : Comparaison du spectre UV-Visible du Pu(IV) (<i>en rouge</i>) à celui du complexe [Pu(CO ₃) ₅] ⁶⁻ (<i>en bleu</i>).....	81
Figure 30 : à gauche : Spectre EXAFS des complexes de carbonate de Th(IV) (en noir) et de carbonate de plutonium(IV) (en rouge) ; à droite : les transformées de Fourier des spectres EXAFS correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).	82
Figure 31 : Structure du complexe [An ^{IV} (CO ₃) ₅] ⁶⁻ (An = Th, Pu) utilisé pour l'ajustement des spectres expérimentaux. (<i>bille bleu : An^{IV}, bille rouge : oxygène et bille grise : carbone</i>).....	82
Figure 32 : Représentation d'un oxygène distal, entouré en orange, d'un carbonate avec une interaction bidente	83
Figure 33 : Schéma des structures des complexes [Pu(CO ₃) ₅] ⁶⁻ et [Th(CO ₃) ₅] ⁶⁻ avec les distances moyennes An(IV)...atomes (An(IV) = Th, Pu) obtenues par l'ajustement des spectres EXAFS (<i>sphère bleu : An, bille rouge : oxygène et bille grise : carbone</i>)	84
Figure 34 : Structure de la ferritine constituée de 24 sous-unités dont l'une est représentée en violet (PDB : 1LB3) (Granier et al., 2003)	88
Figure 35 : Structure tertiaire d'une sous-unité de la ferritine faisant apparaître les quatre hélices α formant un faisceau et une courte hélice α C-terminale (Honarmand Ebrahimi et al., 2015).....	90
Figure 36 : Surface d'interaction de deux monomères qui forment un dimère, deux dimères, trois dimères et quatre dimères (Honarmand Ebrahimi et al., 2015).	91
Figure 37 : Représentation du canal quadruple (<i>à gauche</i>) et le triple (<i>à droite</i>) contenus dans une même structure protéique (Laghaei et al., 2013).....	92
Figure 38 : Mécanisme d'internalisation des Fe(II) (sphères orange) par liaison avec les résidus acides situés au niveau du canal triple et leur entrée dans le site catalytique de la ferroxidase. Les résidus His sont représentés en bleu, Glu en vert et Asp en rouge ; PDB : 2FHA (Hempstead, 1997; Maity, Hishikawa, Lu et Ueno, 2019).....	93
Figure 39 : Structure cristalline aux rayons X de la sous unité H de la ferritine humaine (HuHF) montrant la position possible des métaux dans les sites A et B du centre de la ferroxidase et le site C ; PDB : 2FHA (Hempstead, 1997; Honarmand Ebrahimi et al., 2015).....	95
Figure 40 : Intermédiaires de réaction du centre de la ferroxidase dans la sous-unité H de la ferritine. (A) apoprotéine : sites de ferroxidase non occupés par le Fe(II), (B) oxydation des Fe(II) et formation d'un intermédiaire μ -peroxodiférrique, (B') formation d'un intermédiaire μ -hydroperoxodiférrique, et (C) formation d'un complexe μ -1,2-oxodiférrique.	96
Figure 41ab : Comparaison des spectres XANES (a) et leurs dérivées (b) au seuil K du Fe (énergie du seuil K du Fe : 7112 eV). Les spectres XANES d'une référence Fe(II) (aquo Fe(II) stabilisé dans l'acide ascorbique ; ligne bleue) et d'une référence Fe(III) (aquo Fe(III) en conditions acides ; ligne rouge) sont comparés avec un spectre XANES de la ferritine, notée stock-F, en milieu tamponné et à pH physiologique (ligne verte).	99
Figure 42 : Combinaison linéaire des dérivées des spectres de référence du Fe(II) et Fe(III) et comparaison avec la dérivée du spectre de la ferritine, nommé stock F.....	100
Figure 43 : Schéma simplifié de stock-F après quantification et localisation du fer.....	101
Figure 44 : Courbe de charge de la ferritine en présence d'une solution de carbonate de Th(IV) dans un milieu tampon à pH = 7,4. Les échantillons ont été préparés en triplicata. Valeurs moyennes du rapport Th/Fe obtenues par ICP-MS/MS (points bleus) et par UV-Vis (point rouge). Le dernier point (point rouge) permet de confirmer le plateau de la courbe. Les barres d'erreur en abscisse et en ordonnée correspondent à l'écart-type des valeurs des triplicatas.....	102

Figure 45 : Comparaison de la quantité théorique compartiments de la ferritine (en haut à gauche) avec la quantité de métal obtenue par dosage ICP-MS/MS dans notre ferritine commerciale avant accumulation (en haut à droite) et après accumulation du Th(IV) (en bas) (<i>les points orange représentent le Th(IV)</i>).....	103
Figure 46ab : Comparaison des spectres XANES (a) et leurs dérivées (b) au seuil K du Fe (énergie du seuil K du Fe : 7112 eV) d'un spectre du complexe F-Th en milieu tamponné et à pH physiologique avec un rapport Th/Fe = 3,3 (ligne noire) et de notre ferritine stock (ligne verte).....	104
Figure 47 : Schéma simplifié de notre ferritine complexée par le Th(IV) après la quantification et hypothèse sur la localisation du Th(IV) (<i>les boules orange représentent le Th(IV)</i>).....	105
Figure 48 : Spectres infrarouges : spectre de référence de $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (ligne bleue) ; spectre de la ferritine stock (stock-F, ligne noire) et complexe F-Th avec rapport Th/Fe = 5,9/1 (ligne rouge). Les spectres de la ferritine stock-F et du complexe F-Th ont été normalisés en transmittance par rapport à la bande caractéristique de l'amide I (1650 cm^{-1}). Le spectre de différence = {stock-F - F-Th} est également représenté (ligne verte). Les pointillés correspondent à une différence nulle.....	106
Figure 49 : Spectrophotométrie du complexe F-Pu et addition successive de carbonate. Spectre rouge : complexe F-Pu avec rapport Pu/Fe = 5,4 ; Spectre noir : $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$; Spectre bleu : après ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 30 minutes ; Spectre rose : après un autre ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 30 minutes ; Spectre vert : après un autre ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 72 heures.	108
Figure 50 : Évolution dans le temps de l'écart quadratique moyen des positions atomiques RMSD (à l'exclusion des molécules d'eau, du carbonate et des ions sodium) des simulations A et B par calcul en dynamique moléculaire.....	110
Figure 51 : Simulations par calcul en dynamique moléculaire du complexe F-Pu. Le ruban foncé et les boules foncées représentent les atomes de protéine et de Pu(IV), respectivement. Les résidus protéiques, les carbonates et les molécules d'eau associés aux atomes de plutonium sont représentés sous forme de boules et de bâtons. Les atomes d'hydrogène de l'eau ont été omis pour plus de clarté. Chaque site contenant un atome de Pu(IV) est numéroté dans chaque simulation.	111
Figure 52 : Somme des distributions radiales pour chaque type de voisin pour les six atomes de plutonium de la simulation B. Chaque barre verticale correspond au nombre de voisins situés à la même distance avec un incrément de 0,05 Å.	113
Figure 53 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des 6 sites Pu(1 à 6) contenus dans la simulation B ainsi que du spectre moyen de la simulation B, noté F-Pu $simB$, ainsi qu'une combinaison linéaire des 6 sites Pu(IV). Comparaison des spectres EXAFS calculés avec et le spectre expérimental du complexe F-Pu.	117
Figure 54 : Résidus des spectres EXAFS de différence en $k^2\chi(k)$ des sites du Pu(IV) de la simulation B selon la formule : $\text{dif}(\text{moyenne}) = \{\text{F-Pu-sim}(\text{B}) - \text{F-Pu-exp}\}$, $\text{dif}(\text{Pu}) = \{\text{Pu-i}(\text{B}) - \text{F-Pu-exp}\}$	118
Figure 55 : Environnement local du site Pu3 de la simulation B. Les billes bleues, rouges, grises et violettes correspondent à l'An(IV), à l'oxygène, au carbone et l'azote respectivement.	119
Figure 56 : Spectres EXAFS expérimentaux au seuil L_{III} Th/Pu de F-Th (violet), $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (vert), F-Pu (bleu) et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (noir). Les ajustements sont indiqués en pointillés. La ligne orange (Pu3) correspond à la simulation du site de Pu(IV) représentant le complexe ternaire (protéine, carbonate, eau).....	120
Figure 57 : Dérivée des spectres dans la gamme de k comprise entre 2,0 à 4,0 Å ⁻¹ du signal EXAFS en $k^2\chi(k)$ de F-Th (violet), $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (vert), F-Pu (bleu) et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (noir).	121
Figure 58 : Schéma simplifié global de l'interaction probable des An(IV) (An = Th, Pu) avec la ferritine 125	125
Figure 59 : Structure de la transferrine liée à deux atomes de Fe(III) (billes rouges)..... 130	130
Figure 60 : Structure du complexe formé par le récepteur transmembranaire (en bleu) et deux transferrines (les lobes N sont en rouge et les lobes C en vert) ; PDB : 1SUV (Cheng et al., 2004) 131	131
Figure 61 : Internalisation de la transferrine dans la cellule (N. C. Andrews, 1999)..... 132	132
Figure 62 : Coordination du Fe(III) dans les lobes de la transferrine sérique humaine (Shongwe et al., 2004) 133	133
Figure 63 : Corrélations entre les constantes de liaison K_1 (ou K_C) et K_2 (ou K_N) pour divers métaux et la transferrine humaine (Sun et al., 1999). 134	134
Figure 64 : Modèles structuraux des transferrines de sérum issues des analyses par SAXS (M. P. Jensen et al., 2011). 136	136

Figure 65 : Structure chimique de la déféroxamine B (DFOB) (A) et de la féroxamine B (FOB) (B). Les groupements hydroxamiques responsables de la chélation des métaux, sont mis en évidence en rouge (Bellotti et Remelli, 2021).	138
Figure 66 : Corrélation entre les valeurs de $\log K_{ML}$ pour les complexes DFOB en fonction de la première constante d'hydrolyse correspondante ($\log K_{MOH}$) (Bellotti et Remelli, 2021).	139
Figure 67 : Comparaison par spectroscopie UV-Visible des complexes Th ₂ Tf (ligne rouge), Pu ₂ Tf (ligne orange), Fe ₂ Tf (ligne bleue) et apotransferrine (ligne noire).	142
Figure 68 : Comparaison des spectres infrarouges des complexes Fe ₂ Tf (ligne bleue), Th ₂ Tf (ligne rouge), Pu ₂ Tf (ligne orange) avec le spectre de l'apotransferrine (ligne noire). Les différents complexes sont normalisés en transmittance par rapport à la bande caractéristique de l'amide I (1650 cm ⁻¹).	143
Figure 69 : Le spectre de différence du complexe {Fe ₂ Tf - apoTf} est représenté en bleu et le spectre de différence du complexe {Th ₂ Tf - apoTf} est représenté en rouge.	144
Figure 70 : Évolution dans le temps de l'écart quadratique moyen des positions atomiques RMSD (à l'exclusion des molécules d'eau, des groupements carbonates et des ions sodium) des simulations du complexe Pu ₂ Tf avec une stoechiométrie variable du carbonate par calcul en dynamique moléculaire.	146
Figure 71 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu ₂ Tf (1 carb) calculé par dynamique moléculaire. Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).	149
Figure 72 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu ₂ Tf (2 carb) calculé par dynamique moléculaire. Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).	150
Figure 73 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu ₂ Tf (3 carb) calculé par dynamique moléculaire. Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).	150
Figure 74 : Schéma simplifié du calcul du spectre EXAFS sur la base des modèles de dynamique moléculaire	152
Figure 75 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des trois modèles Pu ₂ Tf obtenus par moyenne des spectres EXAFS des deux lobes N et C correspondant. Comparaison des spectres EXAFS calculés avec le spectre expérimental du complexe Pu ₂ Tf (ligne noire).	152
Figure 76 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des deux lobes N et C (ligne orange et bleue respectivement) du modèle du complexe Pu ₂ Tf (1 carb). Comparaison des spectres EXAFS calculés avec le spectre expérimental du complexe Pu ₂ Tf (ligne noire).	153
Figure 77 : Modèle Pu _N Tf (1 carb). Les billes bleues, rouges, grises et violettes correspondent au Pu(IV), à l'oxygène, au carbone et l'azote respectivement.	154
Figure 78 : Comparaison des spectres EXAFS expérimentaux au seuil L _{III} Th/Pu de Th ₂ Tf (ligne verte), [Th(CO ₃) ₅] ⁶⁻ (ligne rouge), Pu ₂ Tf (ligne noire) et [Pu(CO ₃) ₅] ⁶⁻ (ligne bleue).	155
Figure 79 : Spectre EXAFS expérimental du complexe Pu ₂ Tf (exp) (trait plein) et son ajustement avec le modèle Pu _N Tf (1 carb) (pointillés) (à droite) et transformées de Fourier correspondantes (à gauche)	155
Figure 80 : Modèle Pu _N Tf (1 carb) avec l'ajout d'un atome de Pu (entouré en bleu), à environ 3,85 Å, dans l'environnement proche. Les atomes de plutonium, carbone, oxygène et azote sont représentés en bleu, gris, rouge et violet respectivement.	157
Figure 81 : Spectre EXAFS expérimental du complexe Pu ₂ Tf (exp) (trait plein) et son ajustement avec le modèle Pu _N Tf (1 carb) avec l'ajout d'un atome de Pu (pointillés) (à droite) et transformées de Fourier correspondantes (à gauche)	157
Figure 82ab : Spectre EXAFS expérimental filtré entre $R+\Phi = 3,32$ Å et 3,91 Å de l'échantillon du complexe Pu ₂ Tf (exp) (trait plein en noir) et son ajustement (en pointillés rouge). a) Ajustement avec la contribution de l'oxygène distal. b) Ajustement avec la contribution Pu-Pu	159

Figure 83 : Comparaison des transformées de Fourier des spectres EXAFS en $k^2\chi(k)$ du complexe Pu_2Tf (exp) (ligne noire) et d'un colloïde de Pu(IV) en présence d'aspartate (ligne verte).....	159
Figure 84 : Schéma de la première hypothèse de la présence d'une distance $\text{An(IV)}\dots\text{An(IV)}$ par un colloïde dans le milieu ($\text{An} = \text{Th, Pu}$)	165
Figure 85 : Schéma de la deuxième hypothèse de la présence d'une distance $\text{An(IV)}\dots\text{An(IV)}$ par la formation d'un dimère dans les lobes de la transferrine ($\text{An} = \text{Th, Pu}$).....	165
Figure 86 : a) Schéma du complexe $(\text{Th}_2)_2\text{Tf}$ et environnement local du Th après l'analyse par EXAFS ; b) Schéma du complexe $(\text{Pu}_2)_2\text{Tf}$ et environnement local du Pu après l'analyse par EXAFS ; c) Schéma de la holotransferrine et environnement local du Fe(III) issu de la structure cristalline de la holotransferrine issue de la PDB : 1N04 (Thakurta et al., 2003).....	167
Figure 87 : Spectres de diffusion de l'apotransferrine, des complexes M_2Tf et $\text{M}_2\text{Tf-DFOB}$ à pH physiologique.	170
Figure 88 : Spectres de diffusion de l'apotransferrine, des complexes M_2Tf et $\text{M}_2\text{Tf-DFOB}$, à pH physiologique, centrés sur la région du Guinier. Chaque spectre à sa courbe de Guinier ajustée en pointillés.	172
Figure 89 : Différence de conformation entre l'apoTf (à gauche) et le Fe_2Tf (à droite). La flèche vers le haut indique une conformation ouverte et celle vers le bas une conformation fermée.....	173
Figure 90 : Schéma de la conformation du complexe Th_2Tf (à gauche) et Pu_2Tf (à droite). Les flèches vers le haut indiquent une conformation ouverte.....	174
Figure 91 : Comparaison des structures $\text{Th}_2\text{Tf-DFOB}$ (à gauche), $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ (au centre) et $\text{Fe}_2\text{Tf-DFOB}$ (à droite). Les flèches vers le haut indiquent une conformation ouverte.	176
Figure 92 : Modèle à basse résolution de la transferrine sérique de bovin diférique issu de la reconstruction de forme à partir des données SAXS (M. P. Jensen et al., 2011).	177
Figure 93 : Formes géométriques utilisées comme facteur de forme : a) ellipsoïde de révolution allongée (prolate), b) bâtonnet, c) haltère.....	177
Figure 94 : Représentation des différents rayons qui composent une structure ellipsoïdale de révolution aplatie (oblate)	178
Figure 95 : Spectres SAXS des complexes Fe_2Tf , Pu_2Tf , $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ et apoTf (ligne pleine) et leur ajustement par une structure ellipsoïdale (pointillés)	178
Figure 96 : Photographie du synchrotron SOLEIL.....	203
Figure 97 : Photographie du montage utilisé sur la ligne MARS en configuration XAS	205
Figure 98 : Photographie du montage utilisé sur la ligne MARS en configuration SAXS	206
Figure 99 : Comparaison des dix spectres du complexe Th_2Tf n°1, ainsi que le spectre moyen, est comparé au complexe Th_2Tf n°1 après avoir retiré le spectre différent.....	209
Figure 100 : Module ATR multi-réflexion diamant utilisé lors de l'acquisition d'un échantillon contenant du Pu	210
Figure 101 : Photographie d'acquisition d'un spectre UV-Visible d'un échantillon contenant du Pu.....	211
Figure 102 : Spectrophotométrie des complexes Pu_2Tf (ligne rouge), Pu-DFOB (ligne rose), DFOB libre (ligne orange), apotransferrine (ligne noire) et $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ (ligne bleue), à pH physiologique. Les spectres contenant la protéine sont normalisés sur la bande caractéristique à 280 nm. Les spectres de la DFOB libre et Pu-DFOB sont normalisés par la concentration de DFOB par rapport au complexe $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$	222

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison des structures électroniques des lanthanides et des actinides (Clark, 2000).....	30
Tableau 2 : Etats d'oxydation des actinides en milieu aqueux (les états les plus stables sont en rouge).	32
Tableau 3 : Quantités des différents isotopes du plutonium produites lors des essais atmosphériques d'armes nucléaires (United Nations, 1982).....	36
Tableau 4 : Estimation des activités des différents isotopes du plutonium rejetées lors de l'accident de Tchernobyl (United Nations, 2000).....	37
Tableau 5 : Propriétés nucléaires des radionucléides Th-232 et Pu-239 utilisés dans cette étude comparée à l'uranium naturel.	39
Tableau 6 : Différents niveaux de structure des protéines	43
Tableau 7 : Principaux isotopes du plutonium ayant une période de demi-vie supérieure à un an (Delacroix, Guerre et Leblanc, 2006)	58
Tableau 8 : Constantes d'hydrolyse du Pu(IV) (I = 0 ; T = 298,15 K) (Guillaumont, 2003; Knopp, Neck et Kim, 1999; Neck et Kim, 2001)	64
Tableau 9 : Attribution des bandes caractéristiques des différents états d'oxydation du Pu lors de l'acquisition du spectre UV-Visible	71
Tableau 10 : Constantes de formation globales des complexes de carbonates de plutonium(IV) (Guillaumont, 2003; Neck et Kim, 2000; Rai et al., 1999; Yamaguchi, Sakamoto et Ohnuki, 1994).....	79
Tableau 11 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour les spectres EXAFS des complexes $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ et $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ comparés aux distances des structures cristallines. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, ΔE_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R-factor est le facteur d'accord et Q-factor est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est entre parenthèses.	83
Tableau 12 : Environnement local (nombre, type de ligand ou acide aminé de la protéine) de chaque site de complexation du Pu(IV) de la simulation B calculée par MD. Les numéros font référence à la Figure 51.	112
Tableau 13 : Distances Pu-O et Pu-C obtenues par dynamique moléculaire pour le complexe F-Pu pour la simulation B. Les données EXAFS des distances du complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ sont comparées aux données des sites d'interaction.	114
Tableau 14 : Distances obtenues par les calculs DFT sur les complexes de Th(IV) avec les acides aminés Asp et Glu (les modèles incluent également des molécules d'eau afin de compléter les sphères de coordination du métal).	115
Tableau 15 : Paramètres structurels obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS. Pour F-Pu et F-Th, les chiffres en italique ont été fixés. σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre. Les chiffres indiqués en italiques sont des paramètres fixés.	122
Tableau 16 : Comparaison des constantes globales logK des complexes M_2Tf (M = Fe, Th, Pu).....	135
Tableau 17 : Constantes de protonation du DFOB à 25°C ; I = 0,1 mol.L ⁻¹ NaNO ₃ (Boukhalfa, Reilly et Neu, 2007)	139
Tableau 18 : Constantes thermodynamiques de l'interaction du Pu(IV) avec la DFOB	140
Tableau 19 : Comparaison des constantes de la Tf et de la DFOB avec le Pu(IV) et le Fe(III) (Boukhalfa et al., 2007; Brulfert et Aupiais, 2018; Evers et al., 1989; Sun et al., 1999).....	140
Tableau 20 : Superposition de la structure de la PDB : 1FCK (en gris) avec les trois modèles Pu ₂ Tf (en bleu) calculés par dynamique moléculaire.	147

Tableau 21 : Environnement local (nombre, type de ligand et acide aminé de la protéine) du Pu(IV) dans les lobes N et C des simulations calculées par dynamique moléculaire représentées dans le Tableau 20. (bi = interaction bidente ; mono = interaction monodente ; a.a = acide aminé).....	148
Tableau 22 : Ajustement du spectre Pu ₂ Tf (exp) avec le modèle illustré en Figure 77. σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.	156
Tableau 23 : Comparaison des paramètres d'ajustement du spectre Pu ₂ Tf publiée par Jeanson avec le modèle (illustré en Figure 80) et les données publiées par Jeanson (Jeanson et al., 2010). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.	160
Tableau 24 : Paramètres structurels les mieux ajustés obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS Pu ₂ Tf (exp). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.	162
Tableau 25 : Paramètres structurels les mieux ajustés obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS Th ₂ Tf (exp). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.	164
Tableau 26 : Ajustement de la première courbure, par l'approximation de Guinier, des spectres SAXS de l'apotransferrine, des complexes M ₂ Tf et M ₂ Tf-DFOB (pH ~ 7,4 ; I = 0,05 M) en utilisant le logiciel SASView© (« SASView », 2021). χ^2 représente l'erreur de l'ajustement. Les données de la littérature sont également répertoriées (M. P. Jensen et al., 2011) ^a , (Yajima et al., 1998) ^b	172
Tableau 27 : Paramètres des facteurs de forme des spectres SAXS ajustés par une structure ellipsoïdale.....	179
Tableau 28 : Point isoélectrique (pI) des complexes Fe-, Th-, et Pu-transferrine (Brulfert et Aupiais, 2018).....	181
Tableau 29 : Liste des échantillons préparés selon letype d'analyse réalisée (concentrations finales théoriques engagées, pH, milieu tampon).....	202
Tableau 30 : Coefficient de variation moyen, en pourcentage, des dix spectres enregistrés pour chaque échantillon.....	208
Tableau 31 : Quantification du fer dans la ferritine stockée (stock-F) par ICP-MS/MS.....	213
Tableau 32 : Préparation de la courbe de charge de Th(IV)-F : rapports molaires correspondant à chaque point abscisse de la courbe. Un triplicata a été réalisé pour chaque point. Le rapport moyen F:Th a été utilisé pour l'abscisse de la courbe de charge.....	215
Tableau 33 : Mesures de Th et Fe par ICP-MS/MS et UV-Vis pour le dernier point de la courbe.....	216
Tableau 34 : Structure et interaction locale de chaque plutonium dans les deux simulations calculées par simulation MD. Dans toutes les images, le plutonium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.	218
Tableau 35 : Structure et interaction locale du Th avec des acides aminés. Le thorium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.	219
Tableau 36 : Structure et interaction locale de chaque plutonium dans les modèles Pu ₂ Tf (1carb), Pu ₂ Tf (2carb) et Pu ₂ Tf (3carb). Dans toutes les images, le plutonium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.	221

Introduction

Entre 1930 et 1950, les découvertes sur la fission nucléaire vont accélérer l'intérêt du monde scientifique pour l'utilisation de l'énergie nucléaire (utilisation dans un premier temps purement militaire). Avec la découverte du plutonium en 1940 l'existence de la famille des actinides (An) est conceptualisée.

L'utilisation d'armes nucléaires pendant la Deuxième Guerre Mondiale (Hiroshima et Nagasaki) et la Guerre Froide (essais atmosphériques et sous-marins) a engendré des retombées toujours détectables de nos jours. En parallèle, la demande croissante mondiale en énergie entraîne de nouveaux développements dans le domaine de l'industrie nucléaire civile. Cependant, les accidents industriels majeurs de centrales civiles (Tchernobyl en 1986, Fukushima en 2011) ont également conduit à la dissémination de quantité non négligeables de radionucléides dans l'environnement et à la contamination de populations. Ces nouvelles avancées engendrent donc de nouveaux défis géostratégiques, géopolitiques et environnementaux et soulèvent une multitude de questions concernant l'impact sur la sécurité, l'environnement, et la population humaine. Dans le contexte actuel de développement industriel, le risque de dispersion d'actinides est toujours présent. La recherche de connaissances sur ces risques environnementaux et sanitaires associés a permis aux scientifiques de contribuer à mieux comprendre la toxicité de ces éléments. Dans notre travail, nous nous intéresserons plus particulièrement, au plutonium (Pu) et à son analogue chimique, le thorium (Th).

De nos jours, la majeure partie des études réalisées sur l'interaction du plutonium avec divers organismes vivant, relève d'une approche physiologique ou bio-cinétique. Néanmoins, très peu de données à l'échelle moléculaire sont disponibles due aux difficultés combinées de la manipulation de cet élément et de sa chimie. Pourtant, les études de la complexation du plutonium avec des molécules d'intérêt biologique peuvent apporter une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques qui sous-tendent leur toxicité chimique. De plus, ces investigations conduisent au développement d'agents décorporants avec une affinité spécifique pour les actinides dont l'objectif est de les excréter tout en limitant leurs interactions biochimiques.

En milieu physiologique, le plutonium, comme le thorium, sont stabilisés majoritairement à l'état d'oxydation +IV. Les études révèlent que, suite à une contamination par ingestion ou blessure, ces actinides se retrouvent, dans un premier temps, dans le compartiment sanguin puis sont transportés vers leurs organes cibles. Le compartiment sanguin est composé de nombreux constituants inorganiques (carbonates, phosphates) et organiques (citrate, protéines), susceptibles de les complexer. Les métalloprotéines, et plus précisément la transferrine, la calmoduline et l'albumine, ont rapidement montré une forte affinité pour ces cations. Ces métalloprotéines assurent le transport du sang vers les

organes cibles. Le plutonium et le thorium sont alors majoritairement retenus par les tissus du squelette, du foie et des reins qui peuvent subir des dommages liés à leur radiotoxicité ou à leur toxicité chimique.

Nos travaux portent sur les interactions locales et la structure des édifices cation-protéine formés, à pH physiologique, entre le Th(IV) et Pu(IV) et deux protéines clés du cycle du fer (Fe) : la transferrine et la ferritine.

Ce manuscrit est structuré en quatre parties.

La première partie de ce manuscrit a été consacrée à l'état de l'art comprenant les caractéristiques physico-chimiques des actinides, mais également la toxicité des éléments étudiés, à savoir le Pu(IV) et le Th(IV), dans l'organisme ainsi que leurs interactions avec diverses protéines dont les protéines impliquées dans le cycle du fer. Enfin, une comparaison des caractéristiques biochimiques entre le Fe(III) et le Pu(IV) a été exposé.

La deuxième partie de ce manuscrit a eu comme objectif la préparation et la caractérisation une solution de carbonate de Pu(IV). Dans ce chapitre, nous décrivons la purification de la solution contenant le plutonium. Nous exposons la chimie mise en jeu lors des différentes étapes de ce retraitement jusqu'à l'obtention du Pu(IV) purifié en solution. Pour mener les études d'interactions entre le Pu(IV) et les protéines, à pH physiologique, il a été protégé de l'hydrolyse, par les carbonates. Le carbonate est un anion inorganique majoritaire dans le compartiment sanguin, mais également présent dans les interactions entre le Fe(III) et la transferrine. La caractérisation de la solution de carbonate de Pu(IV) a été réalisée, et comparée à la littérature. Une solution de carbonate de Th(IV) a également été caractérisée afin de mener des études comparatives avec le Pu(IV).

La troisième partie de ce manuscrit porte sur les interactions entre le thorium et le plutonium et la ferritine, protéine dont le rôle est le stockage du fer au sein des cellules. Cette protéine, constituée d'un noyau de fer ferrique entouré d'un anneau protéique, a très peu été étudiée pour ses possibles interactions avec les An(IV). Notre approche a consisté dans un premier temps à définir la capacité de stockage de cette protéine pour le Th(IV) puis à localiser les interactions. Ensuite, à l'aide de la spectroscopie XAS (X-ray Absorption Spectroscopy) couplée à des modèles calculés par dynamique moléculaire, nous avons tenté de préciser l'environnement local du Th(IV) et du Pu(IV).

La quatrième partie de ce manuscrit traite des interactions avec une protéine très étudiée, la transferrine. Cette protéine joue le rôle de transport du Fe(III) naturel du compartiment sanguin jusqu'à son internalisation cellulaire. Cette internalisation est rendue possible par un changement de conformation à la suite de la complexation du Fe(III), dans des sites bien définis suivie par la reconnaissance de son récepteur, localisé sur la membrane cellulaire. Dans cette partie, nous avons, d'abord étudié l'interaction locale du Pu(IV) et du Th(IV) à l'aide de la spectroscopie XAS couplée à des modèles calculés par dynamique moléculaire. Puis nous avons tenté d'amener de nouveaux éléments sur la structure tertiaire

de la protéine par analyse SAXS (Small Angle X-Ray Scattering) afin d'étudier d'éventuels changements de conformation. Ces changements sont comparés à la conformation naturelle de la transferrine diférique. En parallèle de ces études, nous avons regardé l'effet d'une modification structurale d'un complexe Pu(IV) – transferrine avec un sidérophore, la déféroxamine B.

Ce travail permet de proposer de nouvelles pistes d'interprétation des mécanismes d'interaction entre les actinides au degré d'oxydation +IV et deux protéines impliquées dans l'homéostasie du fer.

Chapitre I :

*Toxicité des actinides, transport et
comportement en milieu physiologique*

-

État de l'art

I. Les actinides, des métaux lourds d'intérêts militaire et économique, source de préoccupations sociétale et environnementale

1. De la découverte de la radioactivité à la caractérisation d'une nouvelle famille d'éléments chimiques instables : les actinides

a) Découverte de la radioactivité

La fin du XIXe siècle fut le théâtre de nombreuses découvertes scientifiques qui ont influencé les décennies suivantes et qui influencent encore aujourd'hui notre quotidien. A cette époque, la structure de l'atome est débattue parmi les physiciens et les chimistes. Un physicien allemand du nom de Wilhelm Conrad Röntgen étudie les rayons cathodiques avec un tube inventé par William Crookes vers 1875. En novembre 1895, lors d'une expérience, il observe par hasard la présence de rayons inconnus, invisibles et distincts des rayons cathodiques. Il les nommera les rayons X. Ces travaux sont présentés à l'Académie des sciences de Paris et attirent l'attention d'Henri Becquerel, un physicien français qui s'intéresse aux phénomènes de phosphorescence. Il entreprend des travaux de recherche en 1896 afin de vérifier cette hypothèse. Pour ce faire, Henri Becquerel, avec l'appui d'Henri Poincaré, utilise des sels d'uranium qui présentent une phosphorescence de très courte durée (Cavézian, Pasquet, Bel et Baller, 2006). Suite à ces nouvelles expériences, Becquerel démontre que l'émission de rayons par les composés uraniques n'est ni liée à la phosphorescence ni aux rayons X mais plutôt un rayonnement propre à l'uranium. Le physicien nomme ce type de rayonnement : rayons uraniques (Balian, 2018).

En 1898, Marie Curie avec son mari Pierre Curie (Figure 1) poursuit les travaux sur les rayonnements uranifères. Ils retraitent de grosses quantités de pechblende, un minerai d'uranium, et parviennent à isoler deux éléments encore inconnus : le polonium et le radium (Mould, 1998). Les deux scientifiques montrent que des corps autres que l'uranium émettent spontanément des rayons uraniques. Ils nommeront ce phénomène la radioactivité, c'est-à-dire l'émission de radiations par une substance inerte sans apport d'énergie extérieure. Les travaux du couple seront récompensés d'un Prix Nobel de Physique en 1903, pour leurs travaux sur les radiations, et Marie Curie recevra également un Prix Nobel de Chimie en 1911, récompensant ses travaux sur le polonium et le radium, faisant d'elle la seule femme à obtenir cette distinction dans deux domaines scientifiques. La radioactivité deviendra un sujet d'étude majeur du XXe siècle.

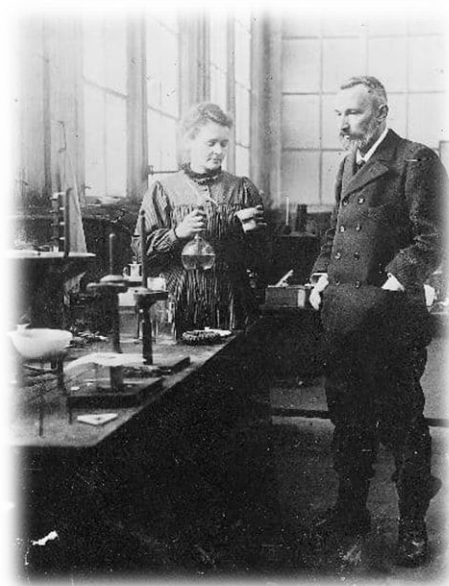


Figure 1 : Pierre Curie (à droite) et Maria Skłodowska-Curie (à gauche) (source : *larousse.fr*).

b) Histoire des éléments actinides

Bien que la famille chimique des éléments actinides soit aujourd'hui bien caractérisée, sa définition est relativement récente. Dans les années 1930, les quatre premiers éléments (Ac, Th, Pa et U) ont été identifiés et classés dans la famille des lanthanides par la communauté scientifique. A cette période, ces nouveaux éléments étaient trop peu nombreux pour être considérés comme une famille.

Cependant la nucléosynthèse des éléments transuraniens (éléments après l'uranium) bouscule progressivement cette idée. Le reste des éléments de cette famille étant artificiels, les physiciens devront attendre le développement d'une nouvelle technologie : l'accélérateur de particules ou cyclotron, inventé par Ernest Orlando Lawrence et Milton Stanley Livingston de l'Université de Californie à Berkeley au début des années 1930 (Guillaumont, 2020). La comparaison des propriétés chimiques entre les transuraniens et les lanthanides associés, supposés similaires, pousse les scientifiques à envisager la définition d'une nouvelle famille qui sera confirmée au fur et à mesure de la découverte des nouveaux éléments transuraniens. Ainsi le neptunium, premier élément artificiel transuranien, fut découvert en 1940, et nommé en référence à la planète Neptune suivant la planète Uranus. Les découvertes du plutonium et du curium suivirent celle du neptunium en 1940 et 1944 respectivement.

c) Des concepts fondamentaux aux applications stratégiques

Les actinides ont été au cœur des innovations civiles et militaires qui ont dessiné la géopolitique mondiale au cours du XXe siècle. Peu de temps après la mise en évidence du phénomène de radioactivité, les scientifiques mirent en évidence la fission nucléaire de l'uranium en 1938 et la possibilité d'avoir une réaction en chaîne. En 1939, un projet basé aux États-Unis avait pour cadre de recherche l'élaboration de la première bombe atomique dont le but était de stopper la guerre mais également de montrer la puissance américaine face aux autres nations. Ce projet avait pour nom de code : Projet Manhattan (Leblanc, 1987).

Dans ce projet, deux axes de recherche furent lancés simultanément : l'un visant à produire une bombe atomique avec de l'uranium enrichi tandis que le deuxième avait pour objectif de produire une bombe avec du plutonium, autre élément fissile. Pour ce faire, des réacteurs nucléaires virent le jour au États-Unis dont le premier a été construit en 1942. Ce réacteur servit d'installation pilote à la production de plutonium à grande échelle. Ce projet a conduit à l'explosion de deux bombes sur le territoire japonais. La première bombe chargée en uranium et du nom de Little Boy explosa au-dessus d'Hiroshima le 6 août 1945 tandis que Fat Man chargée en plutonium, explosa le 9 août au-dessus de Nagasaki, annonçant la fin de la Deuxième Guerre Mondiale.

Peu de temps après, la Guerre Froide éclata entre le bloc soviétique et les États-Unis avec pour enjeu la course à l'armement nucléaire. Dans ce contexte historique, des scientifiques ont créé, en 1947, une horloge du nom de l'Horloge de l'Apocalypse (ou Doomsday Clock en anglais), illustrée en Figure 2. Cette horloge alerte la population mondiale de la proximité de la destruction de notre monde en conséquence ultime du développement de technologies ou d'actions humaines dangereuses. C'est une métaphore, un rappel des périls auxquels nous devons faire face si nous voulons survivre sur cette planète. Cette horloge décompte le temps restant jusqu'à atteindre minuit qui représente la fin du monde (« Bulletin of the Atomic Scientists », 2022). Ce décompte est influencé par la gestion humaine face aux menaces nucléaires, écologiques et technologiques. Il peut diminuer pour se rapprocher de minuit mais il peut aussi être rallongé, comme après la chute du mur de Berlin mettant fin à la Guerre Froide.

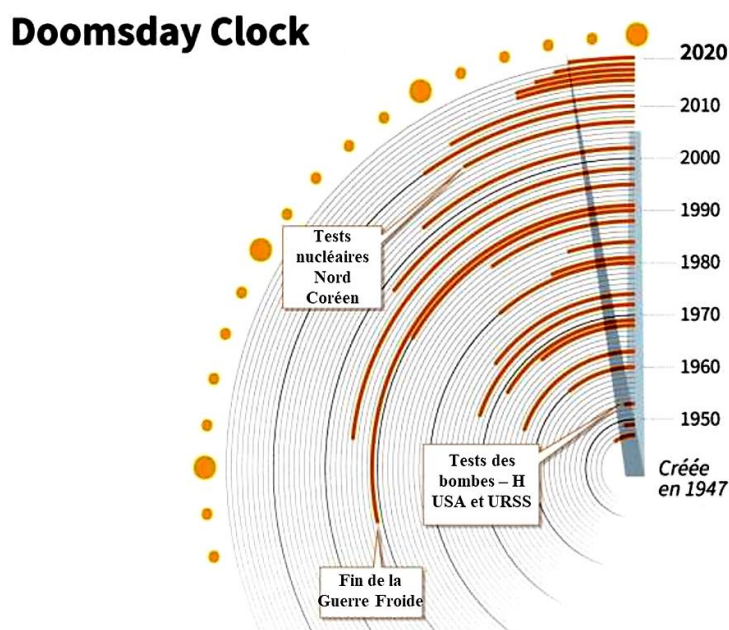


Figure 2 : L'horloge de l'Apocalypse (« Bulletin of the Atomic Scientists », 2022)

Lors de la création de l'horloge, l'aiguille fut placée à 23h53min00s par le rédacteur en chef du Bulletin, Eugène Rabinowitch, qui expliqua son raisonnement dans les pages du Bulletin (« Bulletin of the Atomic Scientists », 2022). Le nombre de minutes restant avant minuit est mis à jour régulièrement par le Bulletin of the Atomic Scientists de l'université de Chicago. Depuis le 23 janvier 2020, l'horloge affiche 23h 58min 20s. La raison avancée est « l'incapacité des dirigeants mondiaux à faire face aux menaces imminentes d'une guerre nucléaire et du changement climatique » (« Bulletin of the Atomic Scientists », 2022).

Le développement autour de la réaction de fission ne s'est pas limité qu'au secteur militaire. En effet, l'industrie nucléaire s'est développée rapidement dans le secteur civil avec des applications dans la production d'énergie notamment. Depuis les années 50, et ce jusqu'à nos jours, de nombreux réacteurs nucléaires sont utilisés pour la production d'électricité. Selon les données de septembre 2021, rapportées par l'AIEA (Agence Internationale de l'Énergie Atomique), le parc nucléaire mondial est composé de 444 réacteurs nucléaires opérationnels répartis entre 32 pays, avec une production mondiale d'électricité, provenant du nucléaire, d'environ 10% par rapport à la production globale d'électricité mondiale (« AIEA », 2021). Toujours selon cette même agence, la France est le deuxième pays au monde, après les États-Unis, le plus nucléarisé et compte 56 réacteurs opérationnels sur son sol, avec une production d'électricité, provenant des réacteurs nucléaires, d'environ 71% par rapport à la production globale d'électricité en France (« AIEA », 2021).

Enfin, de nombreuses techniques et technologies utilisant des actinides sont largement utilisées de nos jours comme le blindage de véhicules à l'uranium, la propulsion navale, la médecine nucléaire ou la datation uranium-thorium.

Ces avancées engendrent de nouveaux défis géostratégiques, géopolitiques et environnementaux et soulèvent une multitude de questions concernant l'impact sur la sécurité, l'environnement, la biosphère et la population humaine. Parallèlement à ces enjeux, des recherches autour de la toxicité de ces éléments au sens large (environnement et vivant) sont également un centre d'intérêt majeur. Mais finalement, quelles sont les propriétés physico-chimiques qui rendent uniques les actinides ?

2. De la structure électronique aux propriétés physico-chimiques des actinides en solution

Dans la classification périodique de Mendeleïev (Figure 3), les actinides sont une famille composée de quinze éléments chimiques. Cette série débute par l'actinium ($Z=89$) et se termine au lawrencium ($Z=103$). Les actinides sont tous des éléments du bloc f hormis le Lawrencium, pour dont l'appartenance à la famille n'est pas tranchée, et sont communément dénommés « éléments 5f ».(W. B. Jensen, 1982; Lavelle, 2008)

Le tableau périodique de Mendeleïev est présenté avec les colonnes numérotées de 1 à 18 et les périodes indiquées à gauche. Les éléments f, c'est-à-dire les lanthanides et les actinides, sont mis en évidence par des couleurs : la série des lanthanides (éléments 57 à 71) est en rose, et la série des actinides (éléments 89 à 103) est en orange. Les lettres 'L' et 'A' sont placées dans les cases correspondantes des périodes 6 et 7 pour indiquer l'emplacement de ces séries.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	H Hydrogène 1,0																2 He Hélium 4,0	
2	3 Li Lithium 6,9	4 Be Béryllium 9,0										5 B Bore 10,8	6 C Carbone 12,0	7 N Azote 14,0	8 O Oxygène 16,0	9 F Fluor 19,0	10 Ne Neon 20,2	
3	11 Na Sodium 23,0	12 Mg Magnésium 24,3										13 Al Aluminium 27,0	14 Si Silicium 28,1	15 P Phosphore 31,0	16 S Soufre 32,1	17 Cl Chlore 35,5	18 Ar Argon 39,9	
4	19 K Potassium 39,1	20 Ca Calcium 40,1	21 Sc Scandium 45,0	22 Ti Titane 47,9	23 V Vanadium 50,9	24 Cr Chrome 52,0	25 Mn Manganèse 54,9	26 Fe Fer 55,8	27 Co Cobalt 58,9	28 Ni Nickel 58,7	29 Cu Cuivre 63,5	30 Zn Zinc 65,4	31 Ga Gallium 69,7	32 Ge Germanium 72,6	33 As Arsenic 74,9	34 Se Sélénium 79,0	35 Br Brome 79,9	36 Kr Krypton 83,8
5	37 Rb Rubidium 85,5	38 Sr Strontium 87,6	39 Y Yttrium 88,9	40 Zr Zirconium 91,2	41 Nb Niobium 92,9	42 Mo Molybdène 95,9	43 Tc Technétium 98,9	44 Ru Ruthénium 101,1	45 Rh Rhodium 106,4	46 Pd Palladium 106,4	47 Ag Argent 107,9	48 Cd Cadmium 112,4	49 In Indium 114,8	50 Sn Étain 118,7	51 Sb Antimoine 121,7	52 Te Tellure 127,6	53 I Iode 126,9	54 Xe Xénon 131,3
6	55 Cs Césium 132,9	56 Ba Baryum 137,3	L	72 Hf Hafnium 178,5	73 Ta Tantale 180,9	74 W Tungstène 183,9	75 Re Rhenium 186,2	76 Os Osmium 190,2	77 Ir Iridium 192,2	78 Pt Platine 195,1	79 Au Or 197,0	80 Hg Mercure 200,6	81 Tl Thallium 204,4	82 Pb Plomb 207,2	83 Bi Bismuth 209,0	84 Po Polonium = 209	85 At Astate = 210	86 Rn Radon = 222
7	87 Fr Francium = 223	88 Ra Radium = 226	A	104 Rf Rutherfordium = 267	105 Db Dubnium = 268	106 Sg Seaborgium = 269	107 Bh Bohrium = 270	108 Hs Hassium = 277	109 Mt Meitnérium = 278	110 Ds Darmstadtium = 281	111 Rg Roentgenium = 282	112 Cn Copernicium = 285	113 Nh Nihonium = 286	114 Fl Flevoorium = 289	115 Mc Moscovium = 289	116 Lv Livermorium = 293	117 Ts Tennessee = 294	118 Og Oganesson = 294
	57 La Lanthane 138,9	58 Ce Cérium 140,1	59 Pr Praséodyme 140,9	60 Nd Néodyme 144,2	61 Pm Prométhium = 145	62 Sm Samarium 150,4	63 Eu Europium 152,0	64 Gd Gadolinium 157,2	65 Tb Terbium 158,9	66 Dy Dyprosium 162,5	67 Ho Holmium 164,9	68 Er Erbium 167,3	69 Tm Thulium 168,9	70 Yb Ytterbium 173,0	71 Lu Lutérium 175,0			
	89 Ac Actinium = 227	90 Th Thorium 232,0	91 Pa Protactinium 231,0	92 U Uranium 238,0	93 Np Neptunium = 237	94 Pu Plutonium = 244	95 Am Américium = 243	96 Cm Curium = 247	97 Bk Berkélium = 247	98 Cf Californium = 251	99 Es Einsteinium = 254	100 Fm Fermium = 257	101 Md Mendélium = 258	102 No Nobélium = 259	103 Lr Lawrencium = 260			

Figure 3 : Tableau périodique de Mendeleïev (éléments f : série des lanthanides en rose, série des actinides en orange).

La famille des actinides a la particularité d'être composée uniquement de radioéléments. Un radioélément possède un noyau atomique instable. Ce noyau se désintègre tout en émettant, des particules de matière sous différentes formes de rayonnements qui peuvent être particulières dans le cas des rayonnements α , β , ou bien électromagnétiques dans le cas du rayonnement γ . Dans cette partie, les propriétés du noyau atomique ainsi que la structure électronique de ces éléments, influençant leur réactivité, seront abordées.

a) Structure électronique : des propriétés au comportement chimique

Les actinides dans leurs états fondamentaux correspondent au remplissage de la couche 5f avec comme structure générale $[Rn]5f^m6d^m7s^2$. Les actinides ont souvent été considérés comme une famille analogue aux lanthanides qui possède une sous-couche 4f de configuration électronique générale $[Xe]4f^n5d^m6s^2$. (Morss, Edelstein, Fuger et Katz, 2006) La comparaison des structures électroniques des actinides et des lanthanides à l'état fondamental est rappelée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des structures électroniques des lanthanides et des actinides (Clark, 2000)

Actinide	Configuration	Lanthanide	Configuration
⁸⁹ Ac	$[Rn] 6d^1 7s^2$	⁵⁷ La	$[Xe] 5d^1 6s^2$
⁹⁰ Th	$[Rn] 6d^2 7s^2$	⁵⁸ Ce	$[Xe] 4f^1 5d^1 6s^2$
⁹¹ Pa	$[Rn] 5f^2 6d^1 7s^2$	⁵⁹ Pr	$[Xe] 4f^3 6s^2$
⁹² U	$[Rn] 5f^3 6d^1 7s^2$	⁶⁰ Nd	$[Xe] 4f^4 6s^2$
⁹³ Np	$[Rn] 5f^4 6d^1 7s^2$	⁶¹ Pm	$[Xe] 4f^5 6s^2$
⁹⁴ Pu	$[Rn] 5f^6 7s^2$	⁶² Sm	$[Xe] 4f^6 6s^2$
⁹⁵ Am	$[Rn] 5f^7 7s^2$	⁶³ Eu	$[Xe] 4f^7 6s^2$
⁹⁶ Cm	$[Rn] 5f^7 6d^1 7s^2$	⁶⁴ Gd	$[Xe] 4f^7 5d^1 6s^2$
⁹⁷ Bk	$[Rn] 5f^9 7s^2$	⁶⁵ Tb	$[Xe] 4f^9 6s^2$
⁹⁸ Cf	$[Rn] 5f^{10} 7s^2$	⁶⁶ Dy	$[Xe] 4f^{10} 6s^2$
⁹⁹ Es	$[Rn] 5f^{11} 7s^2$	⁶⁷ Ho	$[Xe] 4f^{11} 6s^2$
¹⁰⁰ Fm	$[Rn] 5f^{12} 7s^2$	⁶⁸ Er	$[Xe] 4f^{12} 6s^2$
¹⁰¹ Md	$[Rn] 5f^{13} 7s^2$	⁶⁹ Tm	$[Xe] 4f^{13} 6s^2$
¹⁰² No	$[Rn] 5f^{14} 7s^2$	⁷⁰ Yb	$[Xe] 4f^{14} 6s^2$
¹⁰³ Lr	$[Rn] 5f^{14} 6d^1 7s^2$	⁷¹ Lu	$[Xe] 4f^{14} 5d^1 6s^2$

D'après les configurations électroniques énumérées dans le Tableau 1, les orbitales 6d des actinides semblent énergétiquement plus accessibles que les orbitales 5d des lanthanides, particulièrement au début de la série. Les actinides du début de la série jusqu'à l'américium présentent un comportement et une réactivité plus complexes que ceux des lanthanides car les orbitales 5f sont incomplètes et sont étendues dans l'espace alors que les orbitales 4f des lanthanides sont localisées. Ce phénomène explique la multiplicité des états d'oxydation des actinides du début de la série alors que les lanthanides présentent principalement l'état d'oxydation trivalent (Seaborg, 1993).

Lorsqu'on se déplace, de gauche à droite, dans la série des actinides, dans la classification périodique, l'augmentation de la charge nucléaire a pour conséquence la contraction des orbitales de valence. Cette contraction est appelée la contraction actinidique. Le même type de contraction est également observée pour la série des lanthanides et est appelée la contraction lanthanidique.

Pour la première moitié des actinides (du protactinium à l'américium), les propriétés des orbitales 5f et 6d que l'on vient d'évoquer favorisent ainsi l'existence de plusieurs états d'oxydation. A partir du curium et ce, jusqu'au lawrencium, l'état d'oxydation +III prédomine à cause de la contraction relative de ces deux orbitales alors que les lanthanides ne possèdent qu'un seul état d'oxydation stable +III pour l'ensemble de la famille.

Ces observations sur la structure électronique des actinides impactent, par conséquence, la réactivité de ces éléments, qui sera décrit dans la partie suivante.

b) Réactivité des actinides en solution aqueuse

Afin de décrire au mieux le comportement des actinides en solution aqueuse, il est nécessaire d'aborder la spéciation de ces éléments. La spéciation d'un élément est la connaissance de sa forme chimique, ce qui inclut le degré d'oxydation, la nature du polyèdre de coordination et les différentes formes de liaisons possibles dans un environnement donné. La spéciation des actinides en solution aqueuse dépend non seulement de la nature même de l'actinide mais également des propriétés physico-chimiques du milieu comme le potentiel redox, le pH, la dureté des ligands au sens de Pearson, les concentrations en cations et anions (force ionique). Les états d'oxydation des actinides, les plus stables, en milieu aqueux, sont regroupés dans le Tableau 2.

Les propriétés d'oxydoréduction des actinides sont complexes et variées. Lorsqu'on analyse les données du Tableau 2, on peut répartir la famille des actinides en deux groupes.

Le début de la série des actinides (du protactinium à l'américium), possède une multitude d'états d'oxydation allant de +III à +VI en solution (l'état d'oxydation +VII n'étant observable que dans certaines conditions spécifiques). A partir du curium, seul l'état d'oxydation +III est observable.

Tableau 2 : Etats d'oxydation des actinides en milieu aqueux (les états les plus stables sont en rouge).

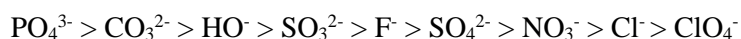
Actinide	Etats d'oxydation				
⁸⁹ Ac	III				
⁹⁰ Th	IV				
⁹¹ Pa		IV	V		
⁹² U	III	IV	V	VI	
⁹³ Np	III	IV	V	VI	VII
⁹⁴ Pu	III	IV	V	VI	VII
⁹⁵ Am	III	IV	V	VI	VII
⁹⁶ Cm	III				
⁹⁷ Bk	III				
⁹⁸ Cf	III				
⁹⁹ Es	III				
¹⁰⁰ Fm	III				
¹⁰¹ Md	III				
¹⁰² No	II	III			
¹⁰³ Lr	III				

Par ailleurs, l'uranium, le neptunium, le plutonium et l'américium ont la capacité à former des oxocations de forme linéaire, appelés actinyles, pour des degrés d'oxydation +V ou +VI et de structure $\{AnO_2^{n+}\}$ (Choppin, 1983). L'apparition de cette liaison transdioxo est à l'origine d'une forte anisotropie axiale qui impacte la chimie de coordination. Par conséquent, les ligands qui complètent la sphère de coordination de l'oxocation seront situés dans le plan équatorial.

Afin de comprendre la complexation des actinides en solution, il est possible d'utiliser la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) (R. Pearson, 1963). Cette théorie est appliquée pour interpréter qualitativement la sélectivité des réactions de complexation. L'énoncé général du principe HSAB repose sur le fait qu'un acide dur (peu polarisable) préfère se coordonner avec une base dure et qu'un acide mou (plus polarisable) interagit préférentiellement avec une base molle. Les ions actinides sont considérés comme des acides durs réagissant préférentiellement avec les bases dures (R. Pearson, 1963; R. G. Pearson, 1997).

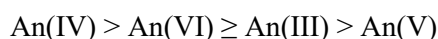
L'interaction entre un acide dur et une base dure est principalement de nature électrostatique. En ce qui concerne les acides mous, ils sont caractérisés par une plus grande taille et une faible charge positive tandis que les bases molles ont une forte polarisabilité et une faible électronégativité. L'interaction entre un acide mou et une base molle conduit généralement à la formation de liaisons relativement plus covalentes.

La réactivité des ligands considérés comme bases dures avec les actinides suit généralement l'ordre suivant :



(Altmaier, Gaona et Fanghänel, 2013)

Dans le cas des ligands organiques qui présentent de l'oxygène comme atome donneur, la stabilité des complexes est fonction de la basicité du ligand (donnée par les valeurs de pKa des acides de Lewis conjugués) comme : $\text{HO}^- > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ (phénolate) $> \text{RCOO}^-$ (carboxylate). En solution aqueuse et sans l'effet de l'encombrement stérique, la préférence des actinides pour former des complexes suit généralement l'ordre suivant :



où la deuxième ligne représente la charge effective de l'ion. Les états d'oxydation formels sont indiqués entre parenthèses (Choppin, 1983). Néanmoins, en tenant compte de l'encombrement stérique, l'ordre de réactivité entre An(III) et An(VI) peut être inversé. Les An(IV) devraient former les complexes les plus stables en solution en raison de leur charge effective élevée. En revanche, les An(V) devraient former les complexes les plus faibles avec les ligands. Enfin, pour un même état d'oxydation, la stabilité des complexes d'actinides augmente avec le numéro atomique.

Par ailleurs, les actinides présentent une très forte affinité vis-à-vis des groupements HO^- . Lors d'une hydrolyse, huit ou neuf molécules d'eau sont localisées autour du cation pour des degrés d'oxydation +III et +IV. En revanche, seulement quatre ou cinq molécules d'eau sont présentes essentiellement dans le plan équatorial dans le cas des cations au degré d'oxydation +V et +VI.

L'hydrolyse implique le transfert d'un proton entre deux molécules d'eau, de la première vers la deuxième sphère de coordination qui, ensuite, est expulsée en dehors de ce système. Les cations An(III) et An(V), qui ont une charge effective plus faible, conduisent à la formation d'espèces monomères, tandis que les cations An(IV) et An(VI), qui ont une charge effective plus importante, forment des polymères. A terme, les espèces hydratées peuvent donner lieu à la formation d'un réseau macromoléculaire colloïdal, quasiment inerte à toute réaction chimique, qui est de plus susceptible de sédimenter.

L'hydrolyse est un phénomène important et capital pour la compréhension de la chimie en solution aqueuse des actinides ainsi que la chimie de coordination de ces ions.

3. Actinides dans l'environnement : sources et comportements du Pu et du Th

De manière générale, les actinides, qu'ils soient d'origine naturelle ou artificielle, peuvent être présents dans les différents compartiments de l'environnement. La radioactivité est présente naturellement dans l'environnement depuis la formation de la Terre. L'U et Th, naturellement présents sur Terre, appartiennent à la famille des éléments primordiaux (présent sur Terre depuis sa formation).

Mon travail portant exclusivement sur le Th et le Pu, seuls ces deux éléments seront traités dans la suite de cette introduction.

a) Origine naturelle du Th et du Pu

Dans la croûte terrestre, le thorium est trois à quatre fois plus abondant que l'uranium avec une teneur moyenne qui varie de 9 à 12 ppm ce qui représente une activité massique de 25 à 28 Bq.kg⁻¹ de sol en moyenne (Henner et Garcia-Sanchez, 2002). Le thorium est présent dans diverses roches comme le granite, le basalte, le schistes, les roches sédimentaires avec des teneurs variables (Choppin et Wong, 1998). Dans les eaux douces, les teneurs en thorium varient de 1,5.10⁻³ à 5.10⁻² Bq.L⁻¹ et de 2,9.10⁻⁵ à 4,4.10⁻³ Bq.L⁻¹ dans les eaux océaniques. De manière générale, le thorium a une très faible solubilité ce qui limite fortement sa migration. Néanmoins, une partie du thorium peut être plus mobile lorsqu'il est sous forme de colloïdes ou lié à des complexant chimiques, qui sont eux, mobiles (Henner et Garcia-Sanchez, 2002).

Le plutonium est en quasi-totalité d'origine artificielle bien qu'il reste une très faible quantité de Pu-244 d'origine naturelle, de l'ordre de 10⁻²³g.kg⁻¹, qui peut être visible de nos jours (Taylor, 2001). Il y a environ 2 milliards d'années, cet élément était produit de façon naturelle, sur notre planète, dans un réacteur nucléaire naturel à Oklo, au Gabon. Depuis cet évènement, le plutonium a disparu naturellement par décroissance radioactive.

De plus, de faibles quantités de Pu-239 sont présentes dans les minerais uranifères contenant l'isotope U-238. L'U-238 se désintègre naturellement en Pu-239 après capture neutronique suivi d'une double désintégration β^- . La quantité de Pu-239 formée annuellement sur Terre est estimée à quelques kilogrammes (Beaugelin-Seiller, Fraysse et Roussel-Debet, 2004). En comparant la masse de plutonium

répartie sur la Terre (environ 10^{-23} g.kg⁻¹) par rapport à la masse de la Terre ($5,98.10^{24}$ kg), la quantité de plutonium d'origine naturelle est donc infime (Beaugelin-Seiller et al., 2004).

b) Origine anthropique du Th et du Pu

- Essais militaires (Pu) :

Les essais d'armes nucléaires font partie, avec les rejets d'installations nucléaires et les accidents, des sources principales à l'origine de la propagation des actinides et plus particulièrement du plutonium dans l'environnement. La Guerre Froide a eu pour conséquence d'augmenter drastiquement les stocks de plutonium militaire de plusieurs pays notamment les États-Unis et l'URSS. De 1945 à 1998, plus de 2400 essais nucléaires, dont 543 essais atmosphériques et 1876 essais nucléaires souterrains ont été réalisés sur tout le Globe (Figure 4). Postérieurement à l'arrêt des essais aériens par la France en 1974, ces tests atmosphériques ont définitivement cessé en 1980 avec le renoncement de la Chine à ce type d'essais.

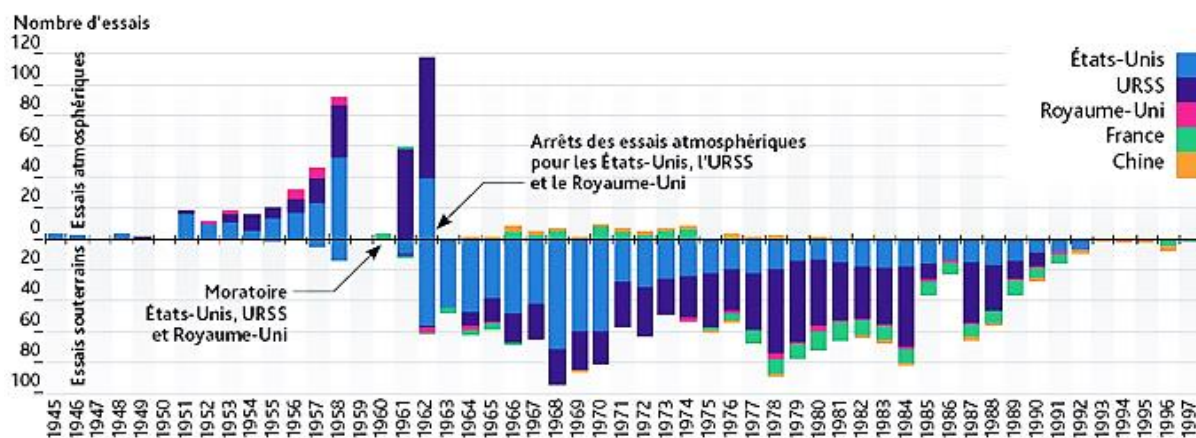


Figure 4 : Nombre d'essais nucléaires souterrains et atmosphériques dans le monde de 1945 à 1998 (source : <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Environnement/retombees-tirs-armes-nucleaires/>)

La course à l'armement nucléaire a eu pour conséquence la libération de plutonium dans l'environnement sur les lieux de production ainsi que les sites des essais nucléaires. Presque la totalité des essais nucléaires atmosphériques ont eu lieu avant 1963, que ce soit en nombre mais aussi en puissance. Une estimation à l'échelle de l'ensemble de l'hémisphère nord a montré que la majeure partie des radionucléides produits lors des explosions s'est déposée avant 1970 et actuellement ces retombées sont très faibles. Comme le montre Hirose et ses collaborateurs, les retombées de Pu-239 et Pu-240 ont été

divisées par 1000 entre 1965 et 1995 à Tokyo/Tsukuba au Japon (Hirose, Igarashi, Aoyama et Miyao, 2001).

Selon le rapport de l'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) en 1982, ces essais atmosphériques ont conduit à la dispersion à l'échelle mondiale des isotopes 238 à 242 du plutonium. Le Tableau 3 indique les quantités totales de plutonium ainsi introduites dans l'atmosphère au début des années 1980.

Tableau 3 : Quantités des différents isotopes du plutonium produites lors des essais atmosphériques d'armes nucléaires (United Nations, 1982)

Isotope	Période de demi-vie (ans)	Activités recensées dans l'atmosphère (Bq)
<i>Pu-238</i>	87,75	$0,33 \cdot 10^{15}$
<i>Pu-239</i>	$2,41 \cdot 10^4$	$7,80 \cdot 10^{15}$
<i>Pu-240</i>	$6,56 \cdot 10^3$	$5,20 \cdot 10^{15}$
<i>Pu-241</i>	14,29	$1,70 \cdot 10^{17}$
<i>Pu-242</i>	$3,75 \cdot 10^5$	$1,60 \cdot 10^{13}$

D'autre part, les sites d'essais ont été également contaminés. Entre 1946 et 1958, les îles de Bikini et Eniwetok ont reçu une activité totale de Pu-239 et Pu-240 d'environ $1 \cdot 10^{10}$ Bq. Jusqu'en 1961, une activité totale de Pu-239 et Pu-240 d'environ $6 \cdot 10^{12}$ Bq a été constatée sur le Nevada Test Site (Despres, 1995). La présence de plutonium d'origine militaire dans l'environnement provient donc essentiellement des retombées atmosphériques des essais nucléaires mais accidents impliquant des engins à propulsion nucléaire, comme les modules spatiaux et des avions militaires, participent à une libération faible mais non négligeable d'actinides.

Ainsi, l'accident du satellite américain Transit-5BN-3 et son générateur SNAP-9A, a provoqué la libération d'environ 10^{14} Bq de Pu-238, majoritairement dans l'hémisphère Sud en 1964 (Atwood, 2010). De plus, des accidents d'avions B52 transportant des missiles thermonucléaires ont donné lieu à une contamination notable de $5 \cdot 10^{10}$ Bq en Pu-239 en 1966, à Palomarés (Espagne) et de $9 \cdot 10^{10}$ Bq en Pu-239 en 1968, à Thulé (Groenland).

- Rejets du Pu par les installations civiles et accidents majeurs de centrales nucléaires civiles :

La deuxième source importante de plutonium dans l'environnement provient des incidents et accidents survenus dans les centrales nucléaires. L'accident de la centrale nucléaire civile de Tchernobyl (Ukraine)

en 1986 est le plus important accident impliquant une centrale nucléaire libérant ainsi dans l'environnement une très grande quantité de radionucléides, dont le plutonium, pour une activité totale d'environ $5,2 \cdot 10^{18}$ Bq. Cet accident a été classé au niveau maximal sur l'échelle INES (International Nuclear Event Scale). Lors de cet accident, 4% du combustible ont été répandus dans l'environnement dont 1,5% hors des frontières de l'ex-URSS (Higley, 2006). Les rejets des différents isotopes du plutonium, estimés dans le rapport de UNSCEAR de 2000, sont regroupés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Estimation des activités des différents isotopes du plutonium rejetées lors de l'accident de Tchernobyl (United Nations, 2000)

Isotope	Période de demi-vie (ans)	Activités estimées de l'accident de Tchernobyl (Bq)
<i>Pu-238</i>	87,75	$3,0 \cdot 10^{13}$ - $3,5 \cdot 10^{13}$
<i>Pu-239</i>	$2,41 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^{13}$ - $3,3 \cdot 10^{13}$
<i>Pu-240</i>	$6,56 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^{13}$ - $5,3 \cdot 10^{13}$
<i>Pu-241</i>	14,29	$5,1 \cdot 10^{15}$ - $6,3 \cdot 10^{15}$

De nos jours, la radioactivité autour de la centrale ainsi qu'en son sein est encore largement détectable. Un sarcophage, appelé l'arche de Tchernobyl, a permis d'isoler totalement le réacteur n°4 de la centrale afin de réduire et de confiner la radioactivité du réacteur éventré.

Plus récemment, en 2011, un deuxième accident majeur de niveau 7 s'est produit à la centrale de Fukushima Daiichi (Japon). Un tsunami suivi d'un séisme ont mis hors service le système de refroidissement principal entraînant une fusion des cœurs des réacteurs 1,2 et 3 ainsi qu'une surchauffe de la piscine de désactivation du réacteur n°4. Cependant malgré l'important rejet de radioactivité dans l'environnement autour de $7,7 \cdot 10^{17}$ Bq (Nuclear Emergency Response Headquarters, Government of Japan, 2011), de récentes études ont montré que la quantité des différents isotopes de plutonium libérée dans l'environnement est négligeable. A titre de comparaison, les traces de la détonation de Nagasaki seront détectables dans l'environnement bien plus longtemps que celles du plutonium provenant de l'accident (Johansen et al., 2021).

- Activités minières et extraction du Th :

L'extraction et le raffinage du minerai peuvent augmenter localement, de façon artificielle, les quantités de thorium naturellement présents dans l'environnement, en dispersant des particules de Th-232 (Garnier-Laplace, Colle et Morello, 2001). Une étude dans les mines de Chine révèle que les concentrations des particules de Th-232 varient considérablement dans les zones d'extraction et de

raffinages avec des concentrations moyennes d'activité du Th-232 dans les zones d'extraction et de raffinage proches de 6 mBq m^{-3} (Wang, Zhong, Liang, Xing et Zhu, 2016). De plus, les activités minières peuvent contaminer les ressources exploitées par les populations proches de ces sites (Arogunjo et al., 2009; Ault, Gosen, Krahn et Croff, 2016).

4. Pu et Th en milieux biologiques

a) Nature de la toxicité

L'utilisation de l'énergie nucléaire dans de nombreux pays industrialisés a soulevé de nouvelles problématiques. De nombreux questionnements d'ordre sociétal et environnemental liés aux risques de pollution et de contamination humaine sont apparus dès le début de l'exploitation de cette nouvelle source d'énergie.

Au niveau biologique, les actinides font partie des éléments chimiques qui n'ont aucune fonction essentielle. Ces éléments sont tous considérés toxiques, d'une part en raison à leur comportement chimique similaire aux métaux lourds (chimiotoxique) mais aussi à cause de leur radioactivité (radiotoxique). L'impact de la radiotoxicité est défini suivant plusieurs facteurs tels que la nature des radiations (α , β , γ), de l'énergie, leur intensité, la durée d'exposition et les tissus touchés. Selon ces facteurs, la radiotoxicité peut entraîner des dégâts immédiats (brûlures, altération de gènes, mort) ou qui peuvent apparaître dans le temps comme des cancers.

Le Tableau 5 détaille les propriétés nucléaires des radionucléides Th-232 et Pu-239 et sont comparées à celles des isotopes de l'uranium naturel qui possède une toxicité chimique plus importante que sa radiotoxicité. Les radionucléides sont classés, suivant leur radiotoxicité, en quatre groupes, de 1 (très forte) à 4 (faible).

Tableau 5 : Propriétés nucléaires des radionucléides Th-232 et Pu-239 utilisés dans cette étude comparée à l'uranium naturel.

Radioisotope	Mode de désintégration	Activité massique	Période	Groupe de radiotoxicité
U-238 (99,275% de l' U_{nat}) (Ammerich et al., 2014b)	α, γ	$1,24.10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$	$4,47.10^9$ ans	4 (faible)
U-235 (0,719% de l' U_{nat}) (Ammerich et al., 2014b)	α, γ	$8,00.10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$	$7,04.10^8$ ans	1 (très forte)
U-234 (0,006% de l' U_{nat}) (Ammerich et al., 2014b)	α, γ	$2,30.10^8 \text{ Bq.g}^{-1}$	$2,46.10^5$ ans	1 (très forte)
Th-232 (Ammerich et al., 2013)	α	$4,05.10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$	$1,40.10^{10}$ ans	2 (forte)
Pu-239 (Ammerich et al., 2014a)	α, γ	$2,30.10^9 \text{ Bq.g}^{-1}$	$2,41.10^4$ ans	1 (très forte)

Pour le thorium, sa toxicité chimique est comparable à celle de l'uranium tandis que sa radiotoxicité est supérieure à celle de l'uranium (Ammerich et al., 2014b). L'isotope de Pu-239 est, lui, considéré comme étant très radiotoxique. La toxicité chimique du plutonium au niveau cellulaire a pu être mise en avant pour le Pu-242 (Ammerich et al., 2014a).

Ces radionucléides ont des effets toxiques sur l'organisme qui diffèrent suivant les modes d'exposition : externe (source de rayonnement à l'extérieur du corps) et interne aigue ou chronique (source de rayonnement à l'intérieur du corps). Les particules α présentent des effets toxiques importants lors d'une exposition interne dans l'organisme tandis que les rayonnements γ , qui sont des rayonnements très pénétrants, sont nocifs que ce soit par exposition interne mais également externe. Néanmoins, les particules α sont beaucoup énergétiques que les autres rayonnements donc par extension, plus nocifs pour l'organisme vivant.

b) Études en milieu biologique

La contamination désigne la présence d'un élément pathogène au sein d'un organisme vivant. Dans notre cas, ce sont des éléments radioactifs qui vont interagir avec l'organisme et provoquer des modifications dans les équilibres biologiques. Les principales voies de contamination des actinides lors d'une exposition se font par inhalation d'aérosols (voie pulmonaire), par ingestion (gastro-intestinale), par pénétration subcutanée (blessure) et cutanée.

En milieu biologique, les actinides impactent les équilibres biologiques naturellement présents et sont stockés dans les organes cibles. Une fois dans l'organisme et dans les organes cibles, leur excrétion ne dépend plus de leur voie d'entrée.

Les injections intramusculaire de Th(IV) chez le rat et intraveineuse chez le chien, montrent que seulement 10% de thorium est excrété dans les urines après 24h. *In vivo*, le Th(IV) soluble interagit avec les tissus des différents compartiments biologiques tels que les os, le foie, la moelle épinière, et les reins, mais également avec des acides aminés et des protéines pour former des complexes stables. Les os sont le site préférentiel d'accumulation du thorium et peuvent stocker entre 70 et 80% de la quantité injectée suivant la durée de la contamination. 6% sont retrouvés dans le foie et environ 16% sont répartis entre les tissus mous, les reins et l'excrétion (Figure 5) (Ansoborlo et al., 2006; Smith, 1995; Stover, Atherton, Keller et Buster, 1960).

Dans le cas d'une injection de plutonium, la distribution du Pu(IV) est similaire quelle que soit l'espèce animale étudiée. Le plutonium est très faiblement excrété de l'organisme par les urines (Romanov et al., 2020). Après une inhalation, la radiométrie post-mortem sur l'homme a démontré que 90 % de l'activité du plutonium dans les sites extra-pulmonaires étaient accumulés dans le foie et le squelette (Romanov et al., 2020). De plus, la fraction de plutonium déposée dans le squelette augmente au cours du temps (Romanov et al., 2020). Chez différentes espèces animales, 80 à 90% du Pu(IV) injecté est déposé dans les os et le foie, avec une répartition os-foie qui varie selon l'espèce animale étudiée (*Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. I*, 1990; Morss et al., 2006; Stover et al., 1960). Les poumons sont également une cible préférentielle du plutonium lorsque l'individu subit une contamination par inhalation.

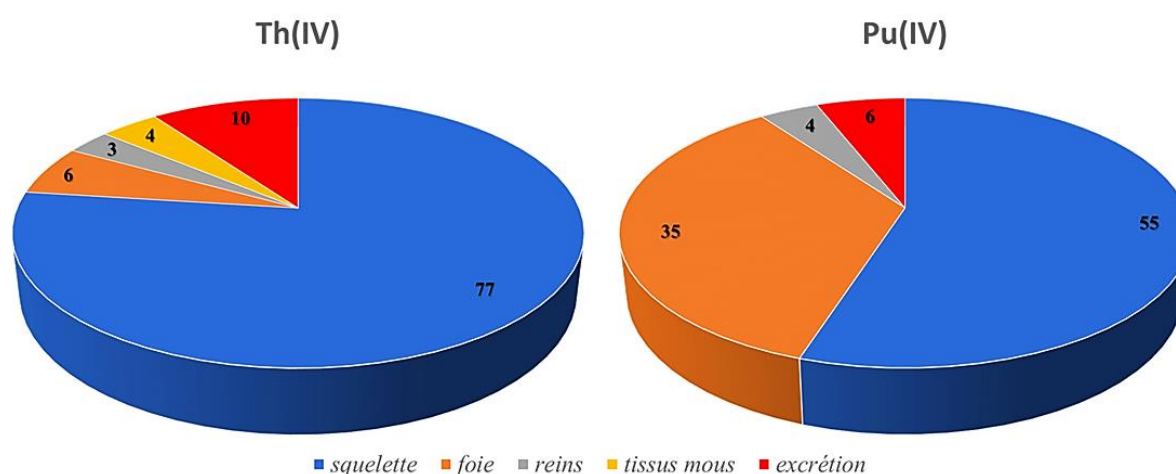


Figure 5 : Représentation graphique de la bio-distribution, post injection, dans les différents organes majeurs du Th(IV) et du Pu(IV) chez le chien (*Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. I*, 1990; Stover et al., 1960)

Afin de décrire le phénomène de bio-distribution, un système de compartiments a été créé à partir de données empiriques par la Commission internationale de protection radiologique (CIPR). Dans ce modèle, le sang est le principal vecteur permettant au thorium et au plutonium de migrer vers les différents compartiments (Figure 6). Le squelette, qui est un compartiment majeur de la fixation du Pu(IV) et Th(IV), est divisé en fonction de la nature de l'os (cortical ou trabéculaire) et de la zone (surface, volume ou moelle). Le foie et les reins sont également divisés afin d'illustrer des différences dans ces organes. Les tissus mous sont, quant à eux, divisés en trois parties selon le temps de rétention des actinides. Au sein des tissus mous, ST0 désigne des échanges rapides dans le fluide extracellulaire, ST1 est pour les échanges de rapidité intermédiaire et ST2 pour les échanges lents.

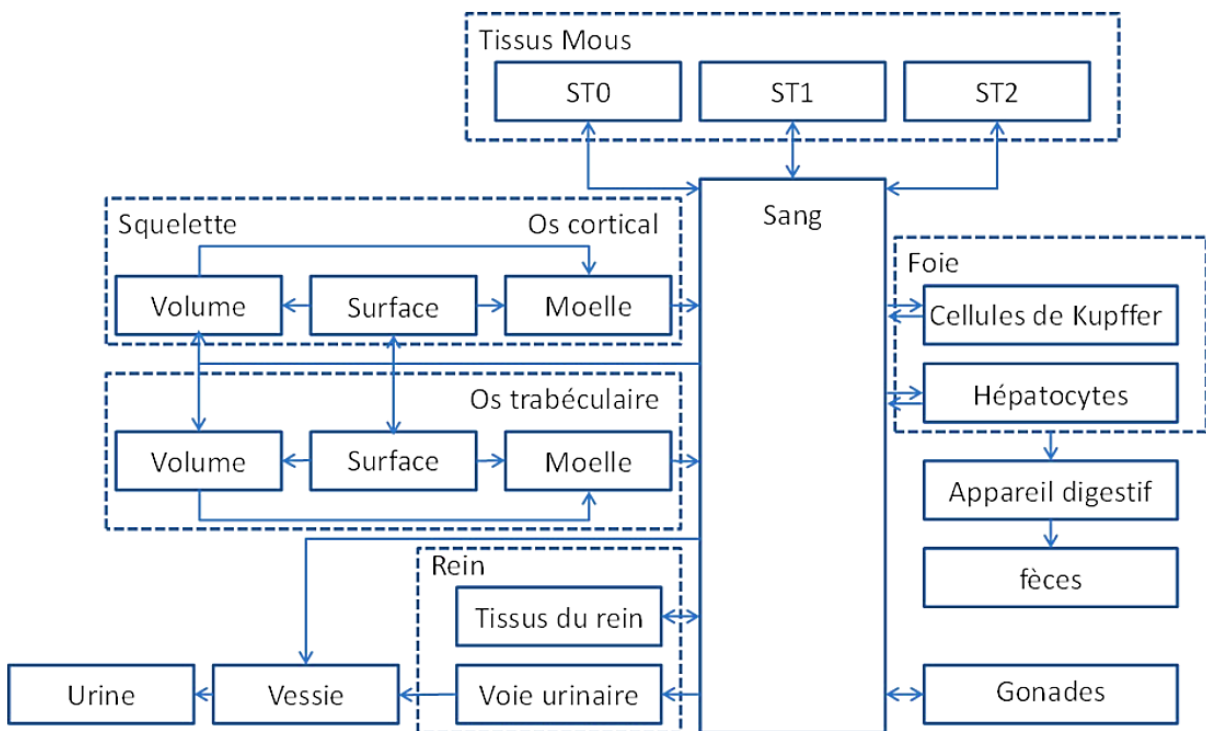


Figure 6 : Modèle bio-cinétique des actinides après contamination (*Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. 1, 1990; Smith, 1995*)

Dans ce modèle, les échanges inter- et intra-compartiments sont régis par des constantes qui sont dépendantes de la voie d'administration et de la nature de l'actinide étudié. Les vitesses d'accumulation, d'échange et d'excrétion dans les organes sont des informations essentielles à la compréhension de ces systèmes complexes. Les études toxicologiques et médicales ont permis d'affiner ces modèles et de prévoir les quantités d'actinides excrétées et retenues dans les différents compartiments.

En outre, ce modèle montre que le sang est le principal vecteur des actinides (le plutonium ou le thorium dans notre cas) vers les organes cibles. Les études *in vivo* sont très complexes à réaliser et des études *in*

in vitro complémentaires permettent d'isoler un ou deux compartiments du modèle établi afin de les étudier plus précisément. Bien sûr ces données sont plus simplistes que les données *in vivo* mais elles offrent une première approche sur le comportement des actinides dans des conditions proches du milieu physiologique.

Dans la suite de ce chapitre, seules les études *in vitro* des interactions du Th(IV) et du Pu(IV) avec des protéines seront décrites. La connaissance des mécanismes d'interaction entre ces actinides et les protéines est nécessaire et permet de contribuer à une meilleure évaluation de l'impact des actinides sur les mécanismes entrant en jeu dans les différentes fonctions biologiques des protéines.

II. Interactions protéines-actinides, que sait-on ?

Le développement des techniques de caractérisation physico-chimique a rendu accessible les interprétations précises sur les modes d'interaction des protéines d'un point de vue thermodynamique mais également structural.

1. Quelques rappels sur la structure d'une protéine

Les protéines sont des macromolécules biologiques constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Ces chaînes sont un assemblage d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (Figure 7).

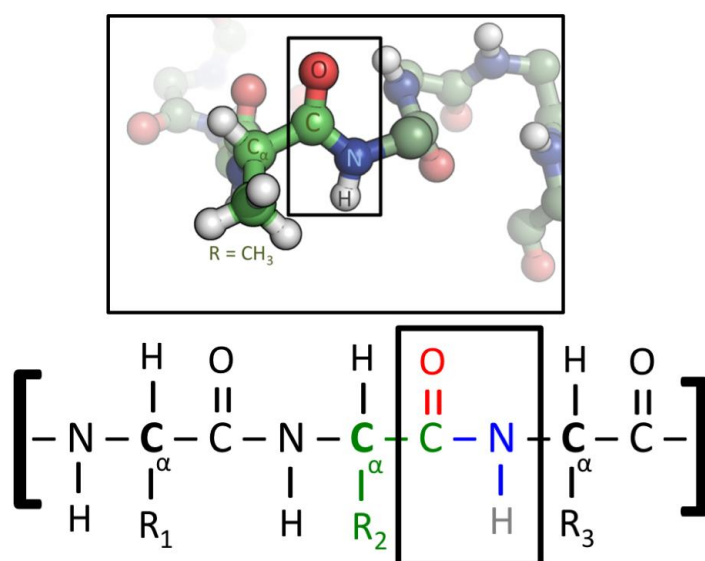
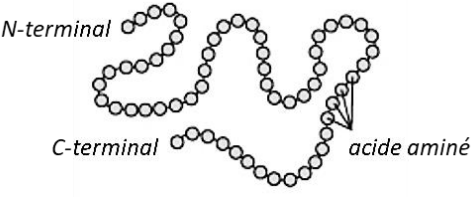
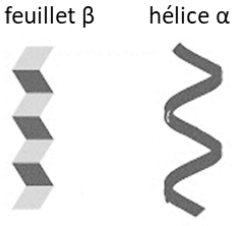
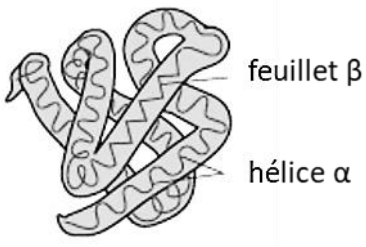



Figure 7 : Mise en évidence de la liaison peptidique

La liaison peptidique est une liaison covalente qui est le résultat d'une réaction de condensation qui s'établit entre une fonction acide carboxylique COOH d'un premier acide aminé et la fonction amine NH₂ du deuxième. Ces chaînes polypeptidiques adoptent ensuite une certaine conformation dans l'espace qui dépend de la structuration à différents niveaux. Il existe quatre niveaux de structure dans une protéine, regroupés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Différents niveaux de structure des protéines

Niveau de structure	Description
<i>Structure primaire</i>	
<i>Structure secondaire</i>	
<i>Structure tertiaire</i>	
<i>Structure quaternaire</i>	

- La structure primaire de la protéine est l'enchaînement des acides aminés. Le premier acide aminé qui compose la séquence est, par convention, celui qui possède une amine libre à son extrémité,

noté N-terminal. De la même façon, le dernier acide aminé de cette séquence possède un carboxylate libre, noté C-terminal.

- La structure secondaire est le repliement local de la chaîne principale de la protéine. Ce repliement se produit par la création des liaisons hydrogène entre les acides aminés et forme plusieurs structures dont l'hélice α et le feuillet β qui sont les plus courants. Ces repliements peuvent être déterminés par résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire ou certaines méthodes de spectroscopie infrarouge.
- La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de sa chaîne principale dans l'espace par des attractions entre les hélices α et les feuillets β par des liaisons fortes. La structure tridimensionnelle définit la fonction biologique des protéines. Les protéines s'organisent souvent de façon modulaire en domaines structuraux distincts qui correspondent aux parties de la protéine acquérant une conformation indépendamment du reste de la structure. Ces domaines structuraux sont associés à une fonction individuelle comme la fixation d'un ligand, la reconnaissance d'un autre partenaire, l'ancrage membranaire, etc. De plus, une protéine constituée de plusieurs domaines structuraux peut associer plusieurs fonctions distinctes. Ces structures peuvent être observées par cristallographie par rayons X et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.
- La structure quaternaire n'est possible que pour des protéines complexes composées de plusieurs chaînes polypeptidiques associées par la formation de liaisons non covalentes comme des liaisons hydrogènes, ioniques mais également par des interactions hydrophobes et des forces de Van der Waals.

Les protéines peuvent, par conséquent, adopter des structures primaires, secondaires, tertiaires et même quaternaires qui sont la clef de leur activité. De plus, une fois la protéine formée, des modifications post-traductionnelles sont possibles et ont pour effet de modifier les propriétés physiques ou chimiques de ces macromolécules.

Les protéines sont présentes dans toutes les cellules qu'elles soient animales ou végétales. Cependant certaines protéines comme la phosvitine ou l'ostéopontine sont spécifiques des cellules animales. Dans ce travail, nous nous sommes intéressées plus précisément aux métalloprotéines.

Depuis les années 1950, les métalloprotéines, ont été au centre de l'attention des chimistes et des biochimistes. Les études sur la capacité d'interaction des protéines présentes dans notre organisme avec différents métaux sont nécessaires pour la compréhension de nombreux mécanismes biochimiques mis en jeu. En 1958, John Kendrew et ses collaborateurs ont pu observer et élucider la première structure 3D d'une protéine, la myoglobine du cachalot révélant ainsi la présence d'un atome de fer (Kendrew et al., 1958).

Les métalloprotéines représentent plus d'un tiers de l'ensemble des protéines et ont la particularité de posséder un ou plusieurs sites de fixation d'ions métalliques. Les groupements fonctionnels des acides aminés qui composent ces métalloprotéines interagissent avec les ions métalliques identifiés. Le cycle imidazole des histidines, le groupement thiolate des cystéines, le groupement carboxylate des aspartates et glutamates et la fonction phénolate des tyrosines sont les principaux groupes impliqués dans la chélation des espèces ioniques métalliques. De plus, selon la structure de la métalloprotéine, la plupart des chaînes latérales des acides aminés et le squelette carboné peuvent être impliqués dans la chélation des ions métalliques.

En plus de ces groupes donneurs présents sur la protéine elle-même, des groupements organiques non protéiques, appelés groupements prosthétiques, peuvent interagir avec des protéines afin d'activer leur fonction biologique. Le groupement prosthétique le plus connu est la porphyrine stabilisée au sein de l'hémoglobine et de la myoglobine afin d'activer sa fonction biologique (transport de l'oxygène dans le sang). Enfin, des molécules d'eau ainsi que des anions carbonates inorganiques peuvent également être présents en tant que ligands des ions métalliques.

Les métaux dans ces protéines peuvent donc être liés soit de façon directe via les chaînes latérales des acides aminés, soit de façon indirecte via la complexation avec un ligand non protéinique tel que la porphyrine au sein de la myoglobine (Figure 8).

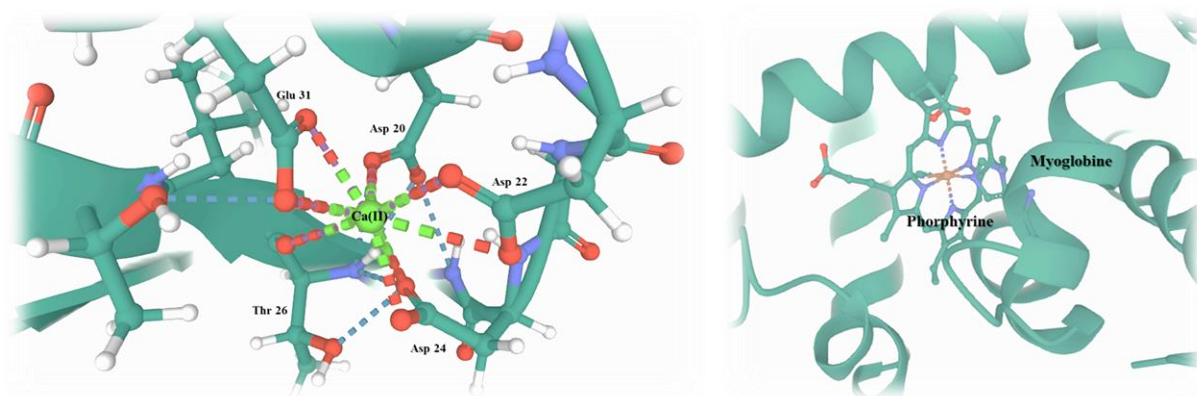


Figure 8 : Interaction locale d'un Ca(II) dans la calmoduline (*PDB : 1CKK ; à gauche*) (Osawa et al., 1999) et interaction d'une porphyrine contenant du fer en son centre avec la myoglobine (*PDB : 1A56 ; à droite*) (Timkovich, Bergmann, Arciero et Hooper, 1998)

Les métaux essentiels pour l'organisme tels que le fer, le cuivre, le manganèse (qui possèdent des états d'oxydation multiples) mais aussi le zinc, le calcium et le magnésium (qui ne possèdent que l'état d'oxydation +II), sont les cations qui interagissent le plus communément avec les métalloprotéines. Dans une moindre mesure, le nickel, le cobalt, le molybdène, le vanadium ou le tungstène sont également

présents dans les sites actifs. Ces différents métaux peuvent avoir soit un rôle structural au sein de la protéine, soit un rôle catalytique (Degtyarenko, 2005).

L'étude de l'interaction des métaux avec les métalloprotéines s'étend aux métaux exogènes dans le but d'identifier les éventuelles modifications de la fonction biologique de la métalloprotéine. Ces études incluent les métaux de transition et certains métalloïdes comme l'arsenic, le cadmium, le mercure, le plomb et le chrome (Appenroth, 2010).

Des mesures *in vitro* ont montré que certains de ces métaux lourds et métalloïdes bloquent le repliement des protéines chimiquement dénaturées. Dans des études *in vivo*, ces observations ont également mis en évidence une interférence du métal lourd dans le repliement des protéines provoquant l'agrégation des protéines naissantes dans les cellules vivantes (Tamás, Sharma, Ibstedt, Jacobson et Christen, 2014). En interférant avec le repliement des protéines naissantes ou dépliées, les métaux lourds peuvent donc affecter profondément l'homéostasie et la viabilité cellulaire. Ce dénaturement provoque, soit un déplacement des ions métalliques essentiels, soit la formation d'un complexe entre différents groupes fonctionnels de la chaîne latérale de la métalloprotéine et un ou plusieurs métaux lourds (J. A. Lemire, Harrison et Turner, 2013).

Les (métallo)protéines étant impliquées dans les différents processus biologiques et occupant une position dominante dans le métabolisme, elles détiennent, par conséquent, une place privilégiée dans l'étude des mécanismes de la toxicologie des actinides. Ces mécanismes moléculaires restent à ce jour mal compris.

2. Interaction des An(IV) avec les protéines et métalloprotéines

Parmi l'ensemble des protéines connues susceptibles d'interagir avec les actinides, les protéines sériques impliquées dans le transport et l'homéostasie des métaux ainsi que les protéines présentes dans les principaux organes cibles comme le foie, les reins et le squelette ont attiré l'attention de la communauté scientifique. L'identification de ces protéines cibles des actinides a ouvert la porte à un nouveau champ de recherche axé sur la caractérisation thermodynamique et structurelle des sites de liaison des actinides dans ces macromolécules. Ces investigations sont essentielles pour définir et comprendre l'impact de ces métaux sur la structure et la fonction des protéines. Cependant malgré le développement des techniques spectroscopiques qui ont contribué aux avancées dans ce domaine, les résultats restent incomplets.

De plus, les données thermodynamiques ne sont souvent pas comparables car elles dépendent fortement des conditions d'analyse. Le choix du système modèle ou du milieu est essentiel et influence fortement

la détermination des données. Ces différents paramètres rendent donc la comparaison des constantes d'affinité expérimentales difficile.

La majorité des études sur ces protéines ont été menées avec l'U(VI) et le Pu(IV) bien que certaines études se soient également intéressées aux An(III). Dans ce paragraphe, seules les recherches autour des interactions entre An(IV), et plus particulièrement du Pu(IV) (et dans une moindre mesure Th(IV)) avec les protéines cibles sont présentées.

- Très récemment, les protéines phosphorylées comme l'**ostéopontine** ont suscité un intérêt croissant, dans la complexation des actinides, de la part de la communauté scientifique. L'ostéopontine est une protéine hyper-phosphorylée, intrinsèquement désordonnée, dont le rôle principal est lié à la minéralisation osseuse. Elle est sécrétée par plusieurs organes dont les cellules osseuses et les reins (Sodek, Ganss et McKee, 2000). L'interaction de l'ostéopontine avec le Th(IV) a été étudiée par Creff et ses collaborateurs, et observe que le Th(IV) se lie à la protéine par des groupes phosphates et carboxylates. (Creff et al., 2016).
- Parmi les protéines impliquées dans le transport du Ca(II), la **calmoduline** semble être une protéine cible du plutonium. Par exemple, Seeger et ses collaborateurs ont étudié par diffusion des neutrons aux petits angles, l'interaction de la calmoduline avec le Pu(III). En 1997, il a pu observer que le site de complexation du Pu(III) est identique à celui du Ca(II) au sein de la calmoduline (Seeger et al., 1997). D'autre part, des études menées par Aryal et ses collaborateurs ont permis d'identifier plusieurs protéines potentielles cibles du Pu(IV) dont la plupart sont des protéines « naturelles » de liaison du calcium (Aryal et al., 2011).
- Bien que l'**albumine** ne soit pas la cible privilégiée des actinides dans le plasma sanguin, son interaction avec le Th(IV) a été étudiée (Ali, Kumar, Kumar et Pandey, 2016). Cette étude a démontré une probable interaction des groupes carboxylates et amides avec le métal. De plus, la structure secondaire de la protéine semble également être affectée par la présence des actinides.
- L'**hémoglobine**, l'une des protéines les plus abondantes présentes dans les globules rouges, est composée de quatre groupes hémiques complexant le Fe(II). Cependant cette protéine n'est pas une cible avérée des actinides *in vivo*. Néanmoins, son mode d'interaction avec le Th(IV) a été récemment étudié (Kumar et al., 2016). L'affinité entre le Th(IV) et l'hémoglobine serait comparable à celle de l'albumine. Les deux cations interagissent avec la protéine, principalement via les groupes carboxylates et amides, ce qui entraînerait une perte de conformation de l'hélice α .
- L'os est un tissu hautement vascularisé, contrôlé par un système cellulaire qui assure sa croissance et son homéostasie. Le tissu osseux est composé d'une partie protéique contenant

principalement du collagène mais aussi des protéines non collagéniques imprégnée d'une matrice minérale d'hydroxyapatite et de sels tels que le magnésium. Une partie des protéines non collagéniques peuvent être libérées par la circulation sanguine et parmi elles, la **fétuine-A**, représente plus de 25% en masse dans le sérum (Jahnen-Dechent, Heiss, Schäfer et Ketteler, 2011). Cette protéine est sécrétée dans le sang par les cellules du foie. Une étude menée par Vidaud et ses collaborateurs (Vidaud, Miccoli, Brulfert et Aupiais, 2019) sur cette protéine a mis en avant, par le biais d'analyses couplant la spectrométrie de masse avec des techniques de séparation comme l'électrophorèse capillaire, une interaction avec le Pu(IV). Pour aller plus loin, la fétuine-A pourrait entrer en compétition avec une autre protéine sérique, la transferrine, pour se lier au plutonium, soit dans le sang, soit directement à la surface des os.

- La **transferrine**, notée Tf, est de loin la protéine la plus étudiée. Cette protéine, synthétisée par le foie, permet le transfert du fer du sang vers les organes cibles. La transferrine est constituée de deux lobes distincts, appelés lobe C et lobe N, reliés par une chaîne polypeptidique. Elle fera l'objet d'une description détaillée dans le chapitre 4 qui lui est dédié.

En 1981, la complexation du Th(IV) avec la transferrine a été mise en évidence dans un complexe Th₂-transferrine, noté Th₂Tf, par Harris. Dans cette étude, un atome de Th(IV) est lié, dans le lobe C par deux groupes tyrosine, tandis qu'un deuxième atome Th(IV) est lié par un seul groupe tyrosine, ce qui semble indiquer que le site de complexation du lobe N est légèrement plus petit que le site situé dans le lobe C (Harris, Carrano, Pecoraro et Raymond, 1981).

En 1987, Duffield et ses collaborateurs ont montré dans une approche préliminaire utilisant la spectroscopie d'absorption UV-Visible que l'interaction de la transferrine avec le Fe(III) est similaire à celle de Pu(IV) et du Th(IV) (Duffield, 1987). Cette similitude entre les différents cations a été vérifiée dans une étude comparant l'environnement proche des complexes Th₂Tf et Pu₂Tf, par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS), à l'interaction du Fe(III) décrite dans la littérature (Jeanson et al., 2010).

- La **ferritine**, notée F, est une protéine présente dans différents organes ainsi que dans le compartiment sanguin. La fonction biologique de cette protéine réside dans le stockage de fer. Comme pour la transferrine, cette protéine fera l'objet d'une description détaillée dans le chapitre 3 qui lui est dédié. Cependant contrairement à la transferrine, très peu d'études ont été menées sur l'interaction du Pu(IV) et du Th(IV) avec la ferritine.

Ces deux dernières protéines, faisant l'objet de ce travail de thèse, participent au cycle du fer dans l'organisme humain.

3. Le cycle du fer dans l'organisme humain

Les protéines sériques sont des cibles préférentielles des actinides avec de fortes constantes de complexation. Ces observations concordent avec le modèle CIPR indiquant que le compartiment sanguin est un acteur majeur de la bio-distribution des métaux dans l'organisme impactant le squelette, les reins et le foie notamment. Parmi les protéines sériques, la transferrine, dont le rôle réside dans le transport du Fe(III) du sang vers les organes, a attiré nettement l'attention car cette protéine peut former des complexes stables avec les actinides, avec des sites de complexation similaires à ceux du Fe(III) et même une possibilité d'internaliser les actinides dans les cellules. De ce fait, il paraît intéressant de se pencher sur le cycle du fer dans l'organisme mais aussi de comparer les données physico-chimiques du Fe(III), élément naturel de complexation de la transferrine et du Pu(IV) dont l'affinité avec la protéine est très importante.

a) Cycle et rôle du fer chez les vertébrés

- Origine du fer :

Le fer présent dans l'organisme provient exclusivement de l'alimentation où il existe essentiellement sous deux formes, une forme libre (appelée non hémique) et une forme liée à l'hème (fer hémique). La teneur en fer des aliments est très variable et sa biodisponibilité alimentaire dépend de sa nature. L'organisme humain contient de 3 à 5 g de fer au total mais son métabolisme l'économise au maximum, fonctionnant quasiment en circuit fermé (Omar, Feki et Kaabachi, 2006).

Dans l'organisme, le fer joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques comme le transport d'oxygène, le transport d'électrons ou la synthèse d'ADN. Lorsque le fer se retrouve sous forme libre, il peut être engagé dans des réactions d'oxydoréduction conduisant à la formation de radicaux libres qui peuvent générer un stress oxydatif lorsque les défenses antioxydantes de la cellule sont dépassées. Afin d'éviter cette toxicité, des systèmes protéiques de transport du fer au travers des membranes cellulaires ainsi que leur stockage sous une forme non toxique et facilement mobilisable en cas de besoin ont été développés dans l'organisme (Beaumont et Karim, 2013).

Le fer est un élément peu excrété par les voies urinaires. Par conséquent, l'organisme limite son absorption intestinale et favorise son stockage dans le foie et les macrophages de la rate par un mécanisme hautement contrôlé.

b) Absorption intestinale du fer

L'absorption du fer alimentaire nécessite que celui-ci traverse les membranes apicales et basolatérales des cellules épithéliales du duodénum (Anderson et Frazer, 2005). Le membrane apicale et basolatérale définissent la polarité cellulaire. La membrane apicale est l'extrémité cellulaire en contact avec l'environnement extérieur tandis que la membrane basolatérale est l'extrémité cellulaire en contact avec le milieu intérieur.

L'épithélium intestinal est la couche de cellules qui recouvre les villosités de l'intérieur de l'intestin et fait la liaison entre l'intérieur de l'intestin et l'intérieur de l'organisme. Les cellules de la villosité, les entérocytes, sont responsables de l'absorption intestinale du fer (Figure 9).

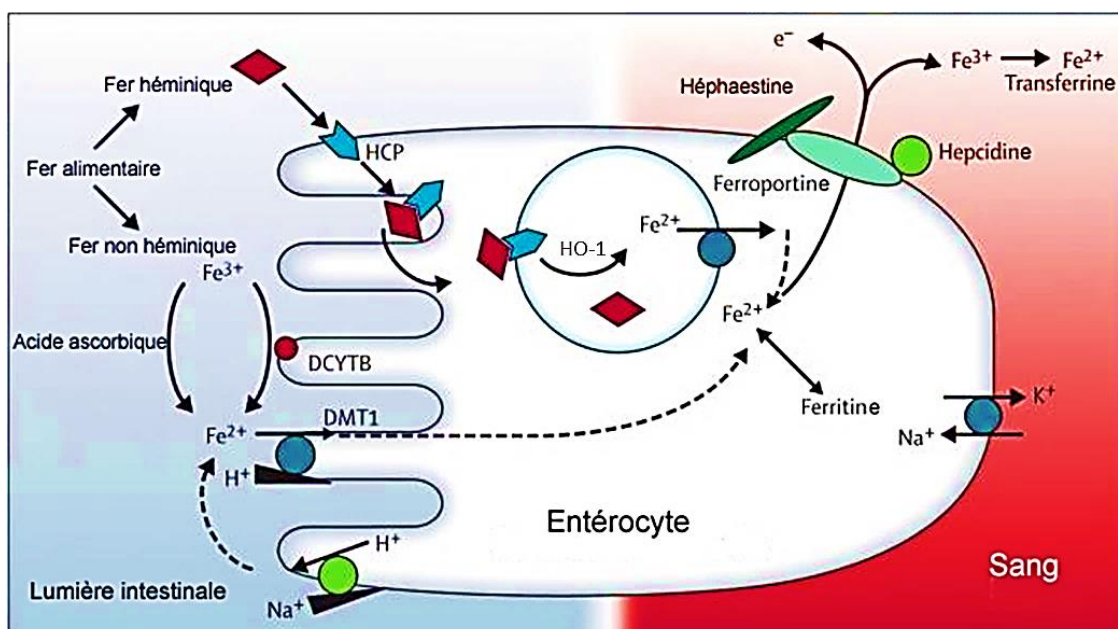


Figure 9 : Schéma de l'absorption intestinale du fer dans le duodénum (source : <http://clashdot.wdfiles.com/local--files/info%3Airon-metabolism/FeAbs.jpg>)

Le schéma ci-dessus, reprend une partie du cycle du fer de façon simplifiée afin d'expliquer les mécanismes d'absorption du fer sous ses deux formes dans les entérocytes jusqu'à leur libération dans le compartiment sanguin.

- Incorporation du fer héminique dans les entérocytes :

Le fer héminique est principalement présent dans les aliments d'origine animale (biodisponibilité de 20 à 30 %) et est facilement absorbé. Il est incorporé dans la structure de l'hème et rentre dans la constitution d'enzymes respiratoires (cytochromes, oxydases, peroxydases, etc.), de l'hémoglobine et de la myoglobine. Dans l'organisme, le fer héminique représente 65 % de la quantité totale de fer (Omar et al., 2006).

Une fois que l'hème est libéré des hémoprotéines (essentiellement l'hémoglobine et la myoglobine) au niveau de l'estomac par acidification et l'action des enzymes protéolytiques, la protéine HCP (Heme Carrier Protein) située au niveau du pôle apical des entérocytes pourrait être impliquée dans l'absorption alimentaire du fer héminique (Shayeghi et al., 2005).

Le fer contenu dans l'hème est ensuite libéré dans les entérocytes après une dégradation enzymatique par l'hème-oxygénase (HO-1) qui produit du monoxyde de carbone, du fer ferreux Fe(II) et la biliverdine. Le fer ferreux pénètre alors dans un réservoir intracellulaire situé dans l'entérocyte, appelé Dcytb-DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) (Beaumont et Karim, 2013).

- Incorporation du fer non héminique dans les entérocytes :

Le fer non héminique est, quant à lui, présent dans les aliments de source végétale ainsi que dans le lait et dans les œufs. Sa biodisponibilité alimentaire est de l'ordre de 2 à 5 %, bien inférieure à celle du fer héminique. Les réserves de fer non héminique représentent de 35 % de la quantité totale de fer dans l'organisme (Omar et al., 2006).

Dans le tractus gastro-intestinal, le fer non héminique, sous l'action des enzymes gastriques, se retrouve sous forme ferrique Fe(III). Cet état d'oxydation n'étant pas biodisponible, le fer ferrique est réduit en fer ferreux à la surface de la bordure en brosse des entérocytes duodénaux soit par des enzymes comme la réductase ferrique, Dcytb (duodenal cytochrome b) soit par réaction avec l'acide ascorbique et la lumière intestinale (Anderson et Frazer, 2005). Après cette réduction, le fer ferreux peut alors traverser la membrane par transport du DMT1 (Conrad et Umbreit, 2002).

- Le fer dans les entérocytes :

Une fois que le fer héminique et non héminique se retrouvent dans les entérocytes, leur devenir dépend des demandes de l'organisme. Si l'organisme n'a pas besoin de fer dans l'immédiat, il reste dans les entérocytes, stocké au sein de la ferritine, protéine qui régule l'homéostasie du fer. L'entérocyte pourra donc utiliser ce fer lors de sa desquamation (Vaulont, 2017).

En revanche, quand l'organisme a besoin de fer, la ferroportine, seul exportateur de fer connu à ce jour, le dirige vers le pôle basal de l'entérocyte afin de passer la barrière membranaire pour être exporté dans le compartiment sanguin. L'hepcidine est une hormone peptidique constituée de 25 acides aminés synthétisés par le foie. Cette hormone est considérée comme le ferostat de l'organisme car elle permet la régulation de la quantité de fer relarguée dans le compartiment sanguin (Ganz, 2011).

L'héphaestine est une ferroxidase membranaire qui permet l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique. Une fois oxydé par l'héphaestine, le fer ferrique se retrouve dans le sang et peut interagir avec une protéine sérique bien connue, la transferrine, qui permet le transfert de ce métal jusqu'aux cellules des organes demandeurs (Vaulont, 2017).

- Le fer, du sérum jusqu'à l'internalisation cellulaire :

Dans le compartiment sanguin, la transferrine interagit avec les cations ferriques et délivre le fer aux cellules. Un complexe entre le récepteur de la transferrine et la transferrine porteuse de deux cations ferrique se forme sur la paroi externe de la membrane cellulaire et pénètre dans la cellule par endocytose (Cheng, Zak, Aisen, Harrison et Walz, 2004). Les cations ferriques sont libérés dans l'endosome par acidification du milieu, puis ils sont transférés de l'endosome vers le cytosol probablement grâce au transporteur DMT1 (Fleming et al., 1998). Une fois que la transferrine se dissocie de ses deux cations métalliques, la transferrine et son récepteur sont ensuite tous deux recyclés à la surface cellulaire puis, ne reconnaissant plus la transferrine, ce complexe se dissocie libérant la transferrine dans le compartiment sanguin afin qu'elle se lie de nouveau à deux cations ferriques.

Les deux atomes de fer relâchés par la transferrine dans les cellules interagissent avec la ferritine, métalloprotéine ubiquitaire, dont le rôle est la régulation du fer au sein de la cellule. Cette protéine peut accumuler le fer sous une forme de réserve mais aussi l'isoler sous une forme non toxique et permettant d'éviter les dommages oxydatifs (Finazzi et Arosio, 2014). Le fer stocké au sein de la ferritine est recyclé et remis à disposition selon les besoins de la cellule. Cependant ces mécanismes de relargage du fer stocké dans la ferritine sont peu connus. La réduction du fer est nécessaire à ce recyclage et plusieurs agents réducteurs ont été proposés, particulièrement l'anion superoxyde et l'ascorbate. De nombreuses études suggèrent que le fer est libéré par une dégradation protéolytique de la ferritine, de type protéosomale ou lysosomale (Vaulont, 2017).

Mais les cellules impliquées dans la production de la ferritine n'ont pas été clairement identifiées. Il se pourrait que les macrophages jouent un rôle prépondérant dans l'export de la ferritine. Des auteurs suggèrent que la ferritine serait issue d'une fuite des cellules endommagées et non d'un mécanisme de sécrétion classique (Kell et Pretorius, 2014).

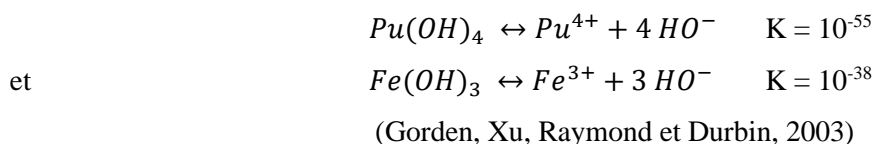
Le foie est l'organe majeur du stockage du fer dans l'organisme. Cet organe assure de multiples fonctions vitales telles que la synthèse et sécrétion de la bile, le métabolisme des sucres, des lipides et des protéines de détoxification, le stockage de la vitamine B12 entre autres. Le foie est capable d'accumuler le fer lié à la ferritine pour empêcher la circulation d'une trop grande quantité de fer libre (Vaulont, 2017).

Le cycle du fer fait ressortir l'impact non négligeable de la transferrine. Cette protéine, hautement affine des actinides (IV) dont le Pu(IV) pourrait donc entraîner, par transport, une contamination cellulaire chronique au sein de la cellule. Une étude menée par Jensen et ses collaborateurs a montré qu'une interaction du Pu(IV) avec la transferrine peut amener à son internalisation cellulaire (M. P. Jensen et al., 2011). La ferritine est la deuxième protéine majeure du cycle du fer car elle permet l'homéostasie du fer au niveau cellulaire. Peu d'informations concernant son interaction avec le Pu(IV) sont disponibles à ce jour. Si cette interaction est avérée, cette protéine pourrait être en mesure de stocker, à court ou long terme, du Pu(IV) et donc d'augmenter la durée de contamination.

c) Quelle similitude biologique entre le Fe(III) et le Pu(IV) ?

Il a été constaté que le Pu(IV) a une affinité avérée avec la transferrine, protéine impliquée dans le cycle du fer. De ce fait, nous abordons dans cette partie, les similitudes, en milieu biologique, entre le Pu(IV) et le Fe(III) pour tenter d'apporter des premiers éléments de réponse.

Le Pu(IV) et le Fe(III) possèdent un état d'oxydation différent en milieu biologique. Cependant ces deux éléments présentent de nombreuses similitudes dans leurs propriétés chimiques ainsi que dans les interactions biologiques (Ansoborlo et al., 2006). La coordinance typique de 10 pour le Pu(IV) et de 6 pour le Fe(III), intrinsèquement liée à leur rayon ionique (0,960 Å pour le Pu(IV) et 0,645 Å pour le Fe(III)) (Shannon, 1976). Bien que leur rayon ionique soit différent, les potentiels ioniques (z/r) du Fe(III) et du Pu(IV) (respectivement 4,6 et 4,3) sont très proches et ces deux métaux sont considérés comme des acides durs au sens de Pearson. De plus, ces deux métaux forment des hydroxydes Pu(OH)₄ et Fe(OH)₃, hautement insolubles, suivant les réactions suivantes :



Les premières constantes d'hydrolyse, exprimée en logK, sont similaires, de 1,5 et 3, respectivement pour les (Pu(OH)³⁺ et Fe(OH)²⁺) (Edelstein, 1980; Gorden et al., 2003). Cette analogie entre le Pu(IV)

et le Fe(III) est également illustrée avec la comparaison des valeurs de plusieurs constantes de complexation des deux cations avec les mêmes ligands (Figure 10) (Ansoborlo et al., 2006).

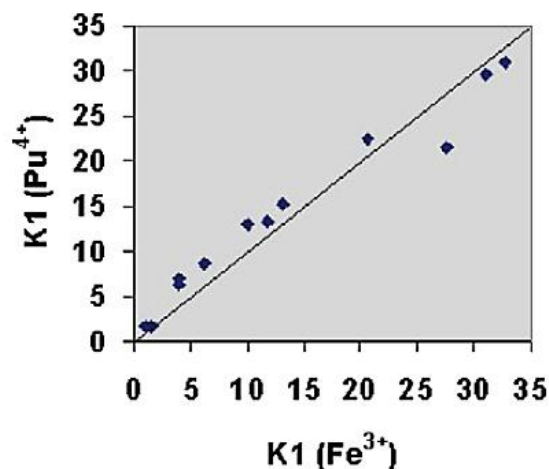


Figure 10 : Analogie entre le Pu(IV) et le Fe(III) entre les valeurs log K_1 de différents agents chélateurs ($I = 0$; $T = 25$ °C) symbolisées par des losanges. La courbe représente l'analogie parfaite (1 :1) (Ansoborlo et al., 2006)

Enfin, les similitudes dans le comportement chimique du Pu(IV) et du Fe(III) ont également été observées avec la transferrine. Ces deux métaux interagissent dans les mêmes sites de complexation. Cette interaction amène également un changement de conformation selon Jensen qui a montré que le complexe mixte Pu_CFe_NTf a une conformation similaire à Fe_2Tf et pourrait donc être internalisé dans des cellules (Figure 11) (M. P. Jensen et al., 2011).

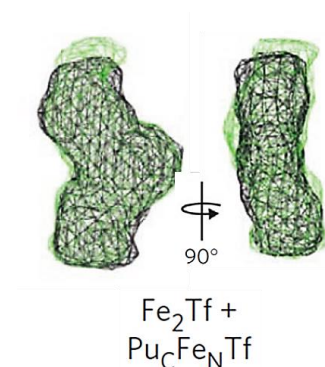


Figure 11 : Comparaison des conformation d'un complexe Fe_2 -transferrine et Pu_CFe_N -transferrine (M. P. Jensen et al., 2011)

La similitude entre le Pu(IV) et le Fe(III) en milieu biologique ainsi que la mise en évidence de l'interaction du Pu(IV) avec de nombreuses protéines dont la transferrine, qui est impliquée dans le cycle du fer, laisse supposer que ce métal pourrait reproduire le cycle du fer jusqu'à une possible internalisation cellulaire. Dans ce travail, nous avons étudié deux protéines impliquées dans le cycle du fer : la transferrine qui joue le rôle de transport du sérum vers les cellules et la ferritine qui permet le stockage du fer dans la cellule.

Chapitre II :

*Préparation et caractérisation de la
solution de carbonate de plutonium*

I. Le plutonium : origine, découverte et propriétés physico-chimiques

Pendant le Projet Manhattan mis en place aux États-Unis entre les années 1939 et 1945, le plutonium est devenu un élément d'intérêt majeur dans le cadre militaire. Après la fin de la Deuxième Guerre Mondiale, le Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) voit le jour en France le 18 octobre 1945. Cet organisme est affecté aux recherches scientifiques et techniques en vue de l'utilisation de l'énergie nucléaire dans les domaines de la santé (notamment les applications médicales), de l'industrie (électricité) et de la défense nationale. A partir de 1958, le CEA extrait le plutonium du combustible irradié pour élaborer l'arme atomique. Dans les années 1980, le plutonium est utilisé dans l'élaboration d'un nouveau type de combustible : le Mox. Ce nouveau combustible vise notamment à valoriser les éléments radioactifs issus du combustible usé.

Le plutonium utilisé dans ces différents domaines est l'objet de nombreux programmes scientifiques liés à sa possible dissémination.

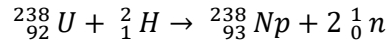
1. Découverte du plutonium

Le plutonium est le 94^{ème} élément de la classification périodique de Mendeleïev, avec comme symbole Pu. Le nom de cet élément évoque la planète Pluton découverte après Uranus et Neptune. Il a été nommé par analogie aux éléments qui le précèdent dans la classification périodique, l'uranium et le neptunium. Le plutonium possède vingt isotopes de masse comprise entre 228 et 247 et tous sont radioactifs. Le Tableau 7 présente les principaux isotopes dont la période de demi-vie est supérieure à un an.

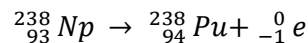
Tableau 7 : Principaux isotopes du plutonium ayant une période de demi-vie supérieure à un an (Delacroix, Guerre et Leblanc, 2006)

Isotope	Période (années)	Type de rayonnement
<i>Pu-236</i>	2,86	α
<i>Pu-238</i>	87,75	α
<i>Pu-239</i>	$2,41.10^4$	α
<i>Pu-240</i>	$6,56.10^3$	α
<i>Pu-241</i>	14,29	α, β^-
<i>Pu-242</i>	$3,75.10^5$	α
<i>Pu-244</i>	$8,08.10^7$	α

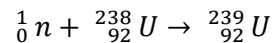
Le plutonium a été préparé par synthèse nucléaire, pour la première fois, en décembre 1940 par l'équipe de Glenn T. Seaborg à Berkeley en Californie. La réaction nucléaire a été réalisée à l'aide d'un cyclotron en bombardant une cible d'uranium-238 par des noyaux d'hydrogène lourd accélérés à 16MeV. Cette réaction nucléaire a conduit à l'obtention de l'isotope neptunium-238 (Seaborg, 1992).



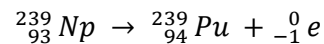
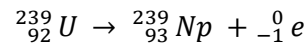
Le neptunium-238, qui est émetteur β^- et dont la demi-vie radioactive est de 2,117 jours par décroissance β^- , se transforme en plutonium-238.



A la suite de cette découverte, en 1941, le plutonium-239 est produit par absorption neutronique d'une source d'uranium-238 afin d'obtenir l'uranium-239.



L'uranium-239 décroît, par le biais d'une double désintégration β^- en neptunium-239 puis en plutonium-239 suivant les réactions suivantes :



Le radioisotope plutonium-239 étant fissile (capacité du noyau à subir une fission nucléaire sous l'effet d'un bombardement de neutrons thermiques), a été notamment au cœur du Projet Manhattan pour la conception de la bombe atomique.

Le plutonium est un élément qui possède des caractéristiques physico-chimiques très variées. Ces propriétés lui confèrent une chimie très riche mais également très complexe. Le prochain paragraphe détaille les propriétés physico-chimiques du plutonium en solution aqueuse.

2. Propriétés physico-chimiques du plutonium en solution aqueuse

a) États d'oxydation du plutonium en solution

La configuration électronique du plutonium est $[Rn]5f^67s^2$. De plus, il possède un caractère très électropositif ce qui lui permet de présenter un grand nombre d'états d'oxydation allant de +III à +VII en solution.

Les potentiels redox qui couplent les quatre états d'oxydation courants du plutonium en solution acide (III, IV, V et VI), soit respectivement Pu^{3+} , Pu^{4+} , PuO_2^+ et PuO_2^{2+} , dans des conditions de pH et de milieu appropriées (R. J. Lemire et NEA Data Bank, 2001) sont remarquablement similaires et approximativement égaux à 1,0 volt (Katz, Morss et Seaborg, 1986), comme le montre la Figure 12.

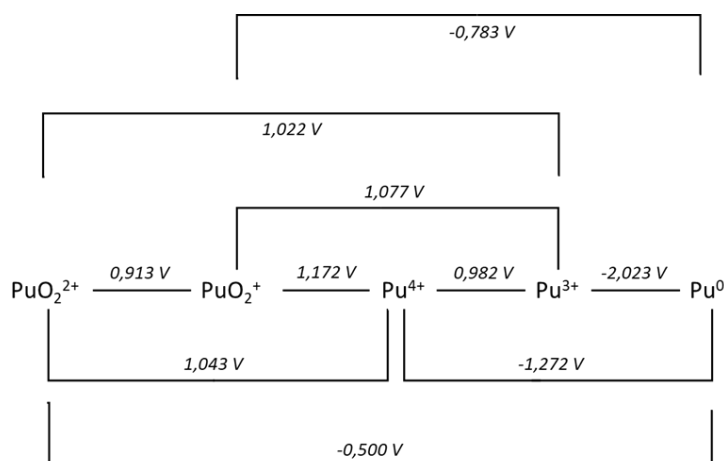


Figure 12 : Potentiel d'oxydo-réduction des différentes formes du plutonium (1 M $HClO_4$, 25°C), en Volt par rapport à l'électrode normale à hydrogène (R. J. Lemire et NEA Data Bank, 2001)

La spectrophotométrie d'absorption est un outil de diagnostic essentiel pour l'identification de l'état d'oxydation du plutonium. Ainsi, chacun des différents états d'oxydation présente une signature spectrale caractéristique dans le domaine UV-visible et proche infra-rouge en plus d'avoir une couleur caractéristique en solution (Figure 13).

Ces bandes sont plus ou moins intenses selon l'état d'oxydation du plutonium et permettent également de pouvoir le quantifier lorsque leur coefficient d'extinction molaire est connu (Cohen, 1961; Morss et al., 2006).

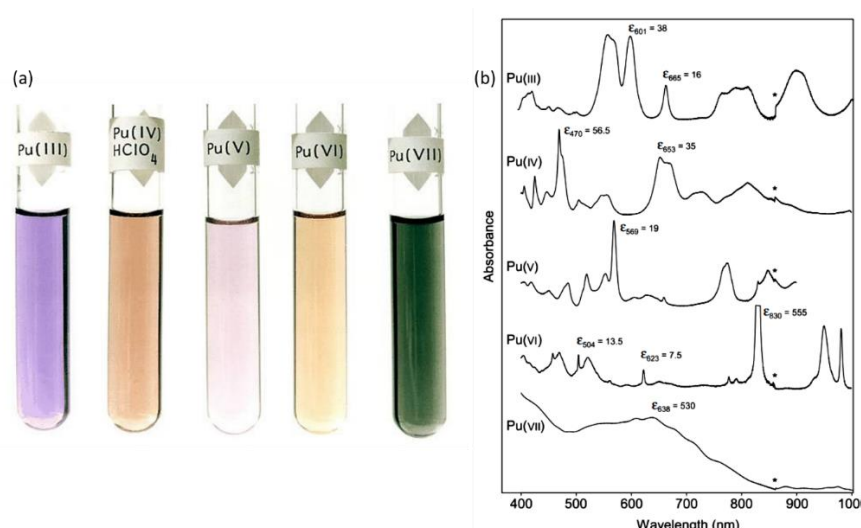
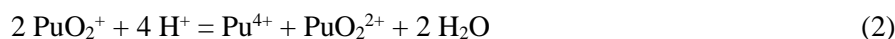
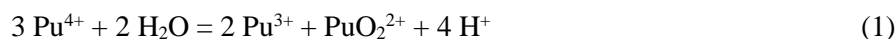


Figure 13 : (a) Ions aquo du plutonium dans une solution à 1 M en perchlorate (*Le Pu(V) est dans NaClO₄ à pH = 7, le Pu(VII) est dans 2,5 M NaOH*) ; (b) Spectres d'absorption électronique des principaux ions du plutonium aquo enregistrés à 25 °C (Clark, 2000)

La radioactivité du plutonium est à l'origine de la décomposition radiolytique de l'eau générant des agents d'oxydoréduction assez puissants, notamment des radicaux à courte durée de vie H[•], HO[•] et O[•], ainsi que des produits de recombinaison radicalaire tels que H₂, O₂ et H₂O₂.

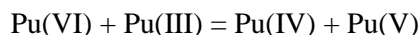
Les produits de la radiolyse de l'eau participent à la réduction du Pu(VI) et du Pu(V) en Pu(IV) et Pu(III). Ces réactions conduisent donc à la coexistence des quatre états d'oxydation différents dans la même solution.

De plus, en l'absence d'agent complexant et en solution faiblement acide, le Pu(IV) a tendance à se dismuter pour former du Pu(III) et du Pu(VI), comme le montre l'équation (1). Le Pu(V) peut aussi dismuter (équation (2)), dans un milieu faiblement acide, pour former du Pu(IV) et du Pu(VI).



Les réactions d'oxydation ou de réduction des couples Pu⁴⁺/Pu³⁺ et PuO₂²⁺/PuO₂⁺ sont des réactions rapides faisant intervenir l'échange d'un seul électron sans formation ou rupture de liaison. Cependant, les couples PuO₂²⁺/Pu⁴⁺ ; PuO₂⁺/Pu³⁺ ; PuO₂⁺/Pu⁴⁺ impliquent la formation ou la rupture de deux liaisons métal-oxygène Pu=O, d'où une cinétique plus lente. Cette liaison fait intervenir des protons dans le mécanisme réactionnel, ce qui complexifie encore ce mécanisme. Les réactions de dismutation sont réversibles, mais très lentes. (Connick, 1949; Rabideau, 1953).

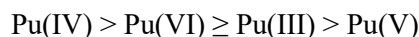
L'équilibre entre les quatre états d'oxydation est fonction de la force ionique du milieu, de la présence de ligand(s) et des réactions d'hydrolyse.



Chaque état d'oxydation présente une chimie de coordination variée, une réactivité caractéristique et une solubilité des complexes moléculaires spécifique. La chimie du plutonium en solution aqueuse est donc particulièrement complexe et fascinante (Pikaev, Shilov et Gogolev, 1997).

b) Complexation du plutonium en solution

La chimie de coordination des ions plutonium est caractéristique des acides « durs » au sens de Pearson (espèces peu polarisables). Ceux-ci réagissent donc préférentiellement avec des « bases dures » comportant des atomes donneurs comme l'oxygène ou le fluor afin de former des complexes très stables. Les ions du plutonium ont des rayons ioniques relativement grands, allant de 0,71 Å pour le Pu(VI) jusqu'à 1,00 Å pour le Pu(III) (Shannon, 1976) et forment donc des complexes avec des nombres de coordination élevés allant de 8 à 12. L'affinité diminue suivant la charge effective du plutonium selon la séquence suivante :



Les ions du plutonium ont un caractère oxophile et forment donc facilement des complexes avec des ligands oxo. La stabilité des complexes formés dépend de la charge et de la basicité du ligand. Par exemple, la stabilité des différents complexes avec le plutonium suit l'ordre suivant :



(Clark, 2000; Morss et al., 2006)

Le perchlorate est souvent considéré comme un contre-ion sans interaction, mais il se coordonne au plutonium à de très fortes concentrations. Les complexes de nitrate sont beaucoup plus stables que les espèces analogues de perchlorate et légèrement plus stables que les complexes de chlorure de même stœchiométrie. Le phosphate est un ligand exceptionnellement fort pour le plutonium qui le chélate généralement de manière bidentée. La stabilité des complexes oxoanioniques du plutonium suit la tendance décrite ci-dessus, le Pu(IV) étant l'état d'oxydation qui établit les complexes les plus stables

et le Pu(V) les moins stables. La liaison dans ces complexes peut être décrite comme ionique et la géométrie est principalement régie par des considérations stériques (Clark, 2000; Morss et al., 2006).

c) Le cas particulier de l'hydrolyse

Le comportement hydrolytique des ions plutonium a fait l'objet de nombreuses études. Cet intérêt a été intensifié par l'importance pratique de l'hydrolyse dans la manipulation des solutions. La caractérisation de l'hydrolyse du plutonium est la pierre angulaire de la compréhension de sa chimie de coordination aqueuse, en particulier de la stabilité thermodynamique des complexes. La tendance à l'hydrolyse suit la même tendance que la complexation. Ainsi, à pH équivalent, l'hydrolyse est plus importante pour Pu(IV) que pour Pu(V). Les réactions globales de l'hydrolyse du Pu(IV) sont décrites par l'équation générale (5) et sa spéciation dans l'eau est représentée sur la Figure 14.

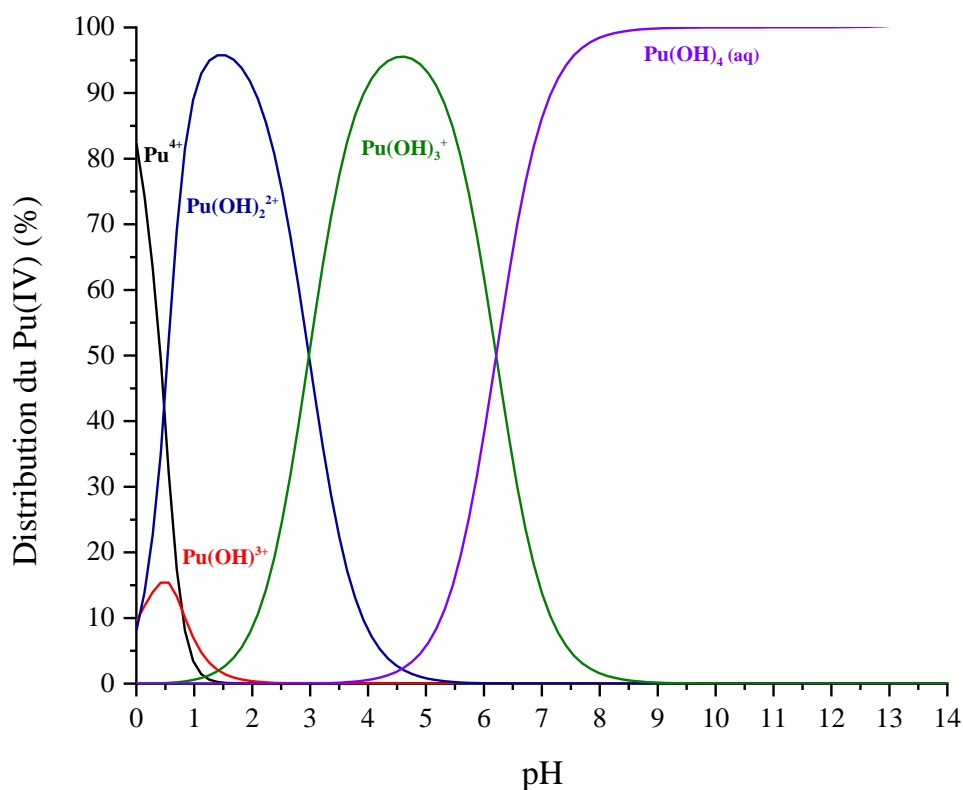


Figure 14 : Spéciation du plutonium (IV) dans l'eau ([Pu] = 2,5 mM) à 25°C. Ce calcul a été réalisé à l'aide du logiciel JChes© en prenant en compte les différentes constantes thermodynamiques de l'hydrolyse du Pu(IV) citées ci-dessous. La précipitation du Pu n'a pas été prise en compte.

Les constantes de formation globales de l'hydrolyse du plutonium sont répertoriées dans le Tableau 8 et montrent la grande stabilité de ces complexes.

Tableau 8 : Constantes d'hydrolyse du Pu(IV) (I = 0 ; T = 298,15 K) (Guillaumont, 2003; Knopp, Neck et Kim, 1999; Neck et Kim, 2001)

Réaction d'hydrolyse	$\log_{10} \beta^{\circ}_{m,n}$
$\text{Pu}^{4+} + \text{HO}^- = \text{Pu}(\text{OH})^{3+} + \text{H}^+$	$14,6 \pm 0,2$
$\text{Pu}^{4+} + 2 \text{HO}^- = \text{Pu}(\text{OH})_2^{2+} + 2 \text{H}^+$	$28,6 \pm 0,3$
$\text{Pu}^{4+} + 3 \text{HO}^- = \text{Pu}(\text{OH})_3^+ + 3 \text{H}^+$	$39,7 \pm 0,4$
$\text{Pu}^{4+} + 4 \text{HO}^- = \text{Pu}(\text{OH})_4 (\text{aq}) + 4 \text{H}^+$	$47,5 \pm 0,5$

De tous les états d'oxydation, le Pu(IV) a la particularité de pouvoir s'hydrolyser même dans des solutions acides à pH 1 et former des hydroxydes et des précipités polymériques ou colloïdaux (Lemire et al., 2001 ; Neck et Kim, 2001 ; Rothe et al., 2004). Le nombre de coordination et les structures des hydroxydes purs peuvent être déduits des nombres d'hydratation, de la stœchiométrie des espèces hydroxo, et des structures déduites de la diffraction au rayons X réalisée sur les solides correspondants.

II. Préparation d'une solution aqueuse de Pu(IV)

Une solution de carbonate de plutonium a été préparée et caractérisée afin d'être utilisée pour l'étude de l'interaction du Pu(IV) avec la transferrine et la ferritine. Pour réaliser cette préparation, les données physico-chimiques concernant le comportement du plutonium en solution aqueuse, décrites ci-dessus, ont été utilisées. Les détails des étapes dont nous allons parler dans cette partie sont disponibles en Annexe A. La solution de plutonium disponible au laboratoire provient d'une association de plusieurs échantillons antérieurs. Elle ne peut être utilisée telle quel car d'autres métaux sont présents dans le milieu ainsi que différents ligands forts (protéines, petits ligands organiques et inorganiques). Par ailleurs, cette solution ne doit contenir que du Pu(IV) qui est l'état d'oxydation que nous souhaitons étudier.

Une première réflexion autour du dispositif mis en place en boîte à gant et répondant à toutes les étapes du retraitement a été réalisée. Le volume de la solution à retraiter était d'environ 3 millilitres, cette solution a été placée dans un creuset en porcelaine pouvant supporter de hautes températures. Un épi-radiateur a été utilisé chauffer de la solution lors du retraitement. Ce système de chauffe permet d'éviter l'ébullition et une évaporation trop rapide des solutions. Enfin, pour éviter que la chaleur n'endommage la boîte à gant, le creuset en porcelaine a été placé sur une brique réfractaire (Figure 15). Lors de chaque

étape, un contrôle par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible (Annexe C) a permis de s'assurer de l'état d'oxydation et de complexation du plutonium en solution.

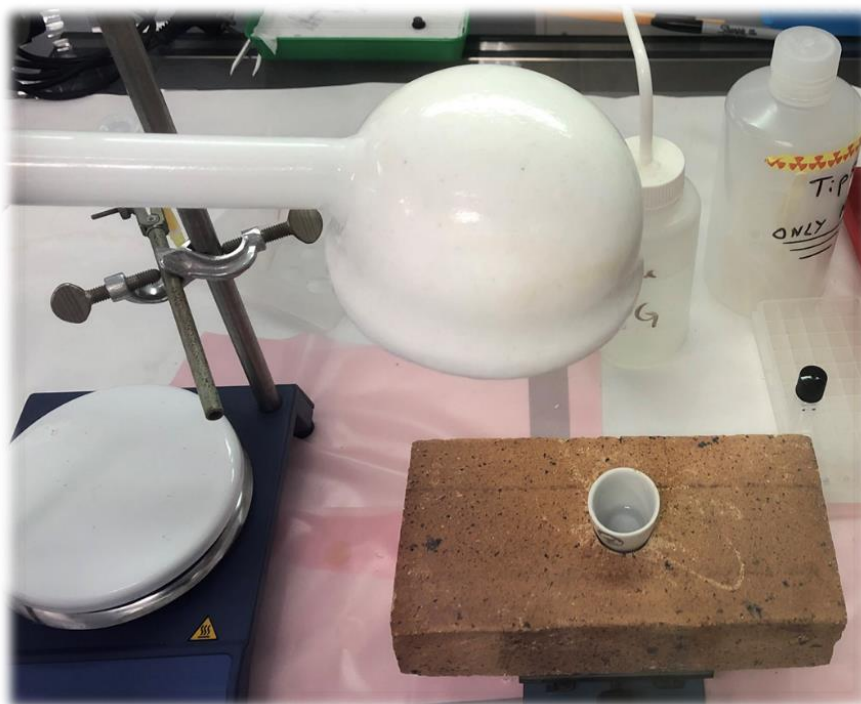


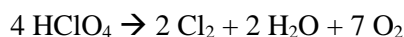
Figure 15 : Photo du montage utilisé

1. Destruction de la matière organique et stabilisation du Pu

Le plutonium, dans la solution à retraiter, est contenu dans de l'acide nitrique peu concentré. La couleur de la solution est verdâtre, synonyme d'une solution contenant majoritairement du Pu(IV). Cette solution présente également des composés insolubles, probablement organiques.

a) Oxydation en Pu(VI) et destruction de la matière organique

La première étape de ce retraitement a consisté en une destruction totale de la matière organique et une oxydation en Pu(VI) de tous les états d'oxydation du plutonium qui aurait pu se trouver en équilibre dans la solution initiale. Plusieurs cycles de chauffe pendant lesquels de l'acide perchlorique concentré est ajouté dans le milieu ont été réalisés. Au cours de ces cycles, l'acide perchlorique concentré subit une décomposition thermique conduisant à la formation de « fumées blanches » à partir de 200°C, suivant la réaction générale suivante :



(Henderson, Miasek et Swaddle, 1971)

Au cours de cette décomposition, il apparaît dans le milieu réactionnel des radicaux chlorés présentant des temps de vie courts associés à une forte réactivité notamment redox (Henderson et al., 1971; Solymosi, 1977). Bien que la décomposition de l'acide perchlorique ait été l'objet de nombreuses études, la réaction d'oxydation du Pu(IV) en Pu(VI) semble complexe. Au cours de cette décomposition, des produits intermédiaires se forment comme des chlorite, hypochlorite, etc, qui sont des oxydants puissants. De plus, le phénomène de radiolyse de l'eau par le plutonium, peut également conduire à la formation de radicaux $\bullet\text{O}_2^-$ et $\bullet\text{HO}_2$ qui ont également un pouvoir oxydant très fort, bien que cela ne soit pas le facteur prépondérant de cette oxydation (P. S. Rao et Hayon, 1975).

De plus, la forte acidité du milieu ainsi que sa température, provoquent la décomposition de la matière organique. Cette réaction est appelée la minéralisation chimique et consiste en la destruction de la matière organique jusqu'à l'obtention de petites molécules comme la formation de H_2O , CO_2 par exemple. Les métaux à l'état ionique y sont également présents.

A la fin de cette étape, la couleur de la solution est jaune-orangée et un spectre de cette solution est enregistré par UV-Visible (Figure 16). Ce dernier est en accord avec le spectre d'absorption du Pu(VI) (confère Figure 13) dont le coefficient d'extinction molaire ϵ_{830} est de l'ordre de $555 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

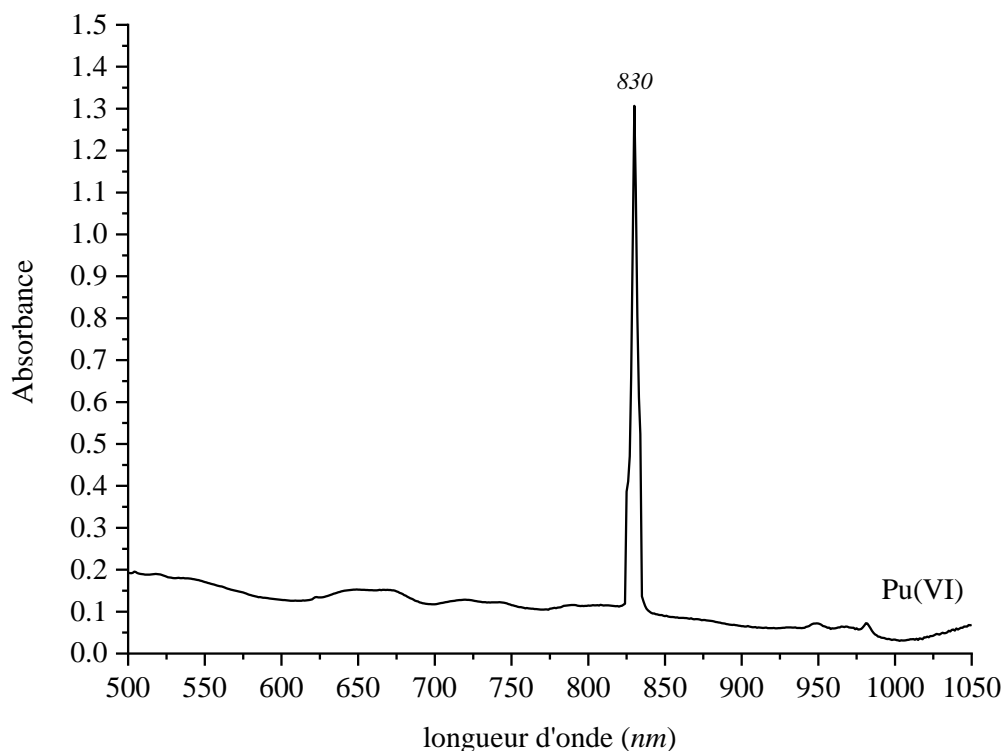


Figure 16 : Spectre UV-Visible de la solution de Pu(VI) après oxydation aux fumées blanches

b) Réduction du Pu(VI) en Pu(III) par un mélange hydrazine/hydroxylammonium nitrate

Il a ensuite été nécessaire de séparer le plutonium des autres métaux ainsi que des résidus organiques et inorganiques encore présents. Pour ce faire, le plutonium doit être d'abord entièrement réduit à son état d'oxydation +III afin de pouvoir le purifier par résine échangeuse d'ion. Cette réduction a été réalisée en ajoutant dans le milieu réactionnel un mélange d'hydrazine N_2H_4 et du nitrate d'hydroxylammonium $[(NH_3OH)(NO_3)]$ (Figure 17), noté NH et NHA respectivement. Avant de pouvoir réaliser ces étapes de réduction en Pu(III) puis de séparation, il est nécessaire de changer le milieu acide de la solution. L'acide perchlorique a donc été évaporé puis remplacé par de l'acide nitrique. Les réactions de réduction et d'oxydation du plutonium dans des solutions contenant de l'acide nitrique ont été largement étudiées. L'hydroxylamine et l'hydrazine sont des agents réducteurs qui répondent à notre problématique car ces composés sont non métalliques en plus de donner des produits d'oxydation volatils et d'avoir une réactivité très forte qui permet de réduire toutes les formes du plutonium à l'état d'oxydation +III. De plus, lors de la réduction la solution a changé de couleur passant de jaune-orangée à vert-gris.

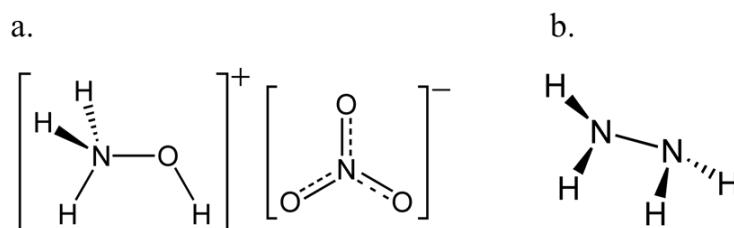
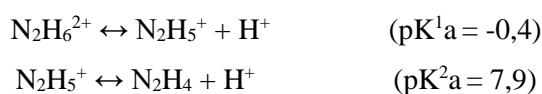


Figure 17 : a. Structure du nitrate d'hydroxylammonium ; b. Structure de l'hydrazine

Dans cette partie, nous avons détaillé les réactions d'oxydo-réduction mises en jeu entre les différents états d'oxydation du Pu et l'hydrazine et l'hydroxylammonium car elles sont peu souvent décrites dans leur intégralité. Il faut également noter que toutes ces réactions se produisent simultanément.

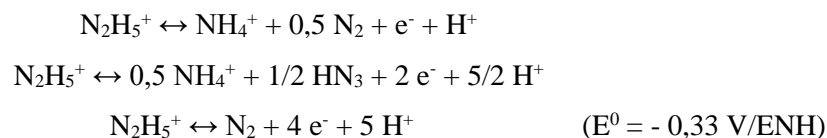
- Hydrazine :

L'hydrazine (N_2H_4) est une base possédant deux couples acido-basiques :



(Kotrly et Sucha, 1985)

Notre solution étant en milieu acide très concentré, l'hydrazine est présente en solution sous la forme d'ion hydrazinium ($N_2H_5^+$). La spéciation de l'hydrazine est présentée en Figure 18. L'ion hydrazinium peut subir une oxydation suivant un processus comprenant un, deux ou quatre électrons suivant les équilibres décrits ci-dessous, bien que les potentiels standards ne soient pas publiés (Kotrly et Sucha, 1985; Schmidt, 1984).



Par ailleurs, les deux premiers processus d'oxydation à 1 et 2 électrons aboutissent à la formation de l'ion ammonium. Ce phénomène sous-entend que ces processus d'oxydation de l'hydrazine ne représentent que le bilan réactionnel et non les mécanismes mis en jeu.

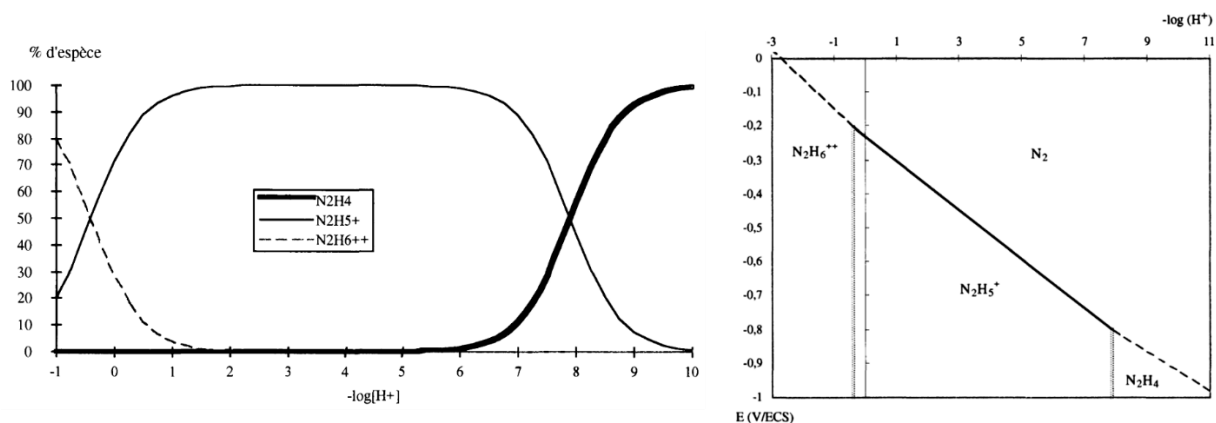
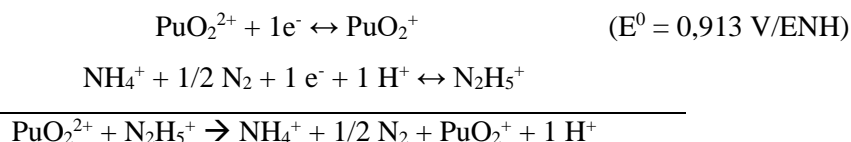


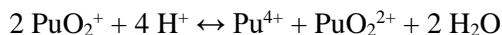
Figure 18 : A gauche : diagramme de répartition des espèces de l'hydrazine suivant le pH. A droite : Diagramme potentiel-pH du couple N_2 /hydrazine (Kotrly et Sucha, 1985; Schmidt, 1984).

D'un point de vue thermodynamique, et conformément au diagramme potentiel-pH représenté dans la Figure 18, l'hydrazine peut réduire le Pu(VI) en Pu(III) ($E_{Pu(VI)/Pu(III)} = 1,022 \text{ V/ENH}$). Koltunov et Zhuravleva ont étudié en détail la réduction du Pu(VI) en présence d'hydrazine. Celle-ci s'effectue en plusieurs étapes :

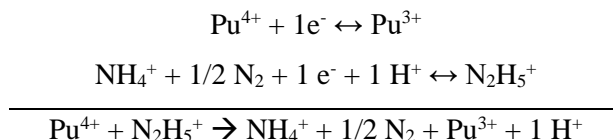


Cette réaction qui est la plus probable (Koltunov et Zhuravleva, 1974) se produit rapidement car un seul échange d'électron est nécessaire pour réduire le Pu(VI) en Pu(V). Dans notre cas, le milieu réactionnel

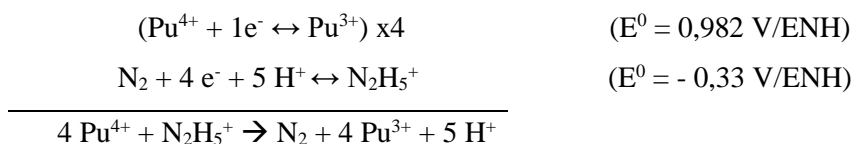
étant très acide (environ 7M), le Pu(V) est fortement instable et dismute pour former du Pu(VI) et du Pu(IV) en solution.



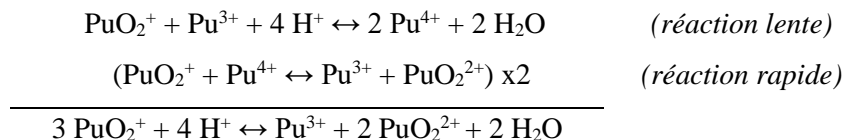
La dismutation du Pu(V) dépend de la présence et de la concentration des états d'oxydation du plutonium en solution ainsi que de la concentration totale en plutonium. Le Pu(V) peut également être réduit en Pu(IV) avec l'hydrazine. Le produit final de la réduction avec l'hydrazine décrite ci-dessous est le Pu(III) suivant deux réactions redox possibles (Koltunov et Zhuravleva 1974) :



et



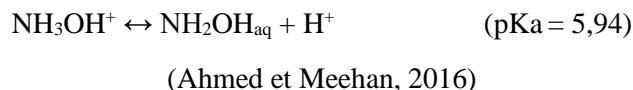
De plus, lorsque la concentration de Pu(III) est importante en solution, sa réaction avec le Pu(V), indiquée ci-dessous, doit également être prise en compte.



Le Pu(VI) est réduit jusqu'au Pu(III) car le potentiel de l'hydrazine est plus faible que celui du couple Pu(VI)/Pu(IV). Cependant, lors de cette étape, la réduction est réalisée à température ambiante ce qui limite cette réaction car sa cinétique est lente pour des températures inférieures à 50°C. La chauffe est assez délicate dans cette étape car elle peut rendre instable très rapidement le milieu, l'hydrazine étant connue pour être un composé explosif avec un point éclair de 38°C (Schmidt, 1984).

- Hydroxylammonium :

Pour accélérer la réduction du Pu(VI) en Pu(III), de l'hydroxylamine, en solution acide, est également ajoutée dans la solution. Ce composé possède des propriétés acido-basiques qui s'expriment selon la réaction suivante :



L'hydroxylammonium possède également plusieurs couples redox présentés sur la Figure 19.

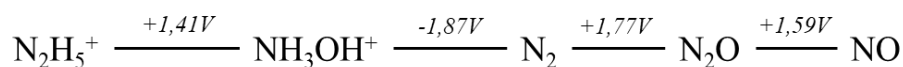
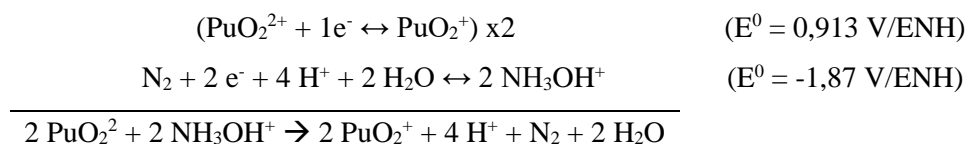
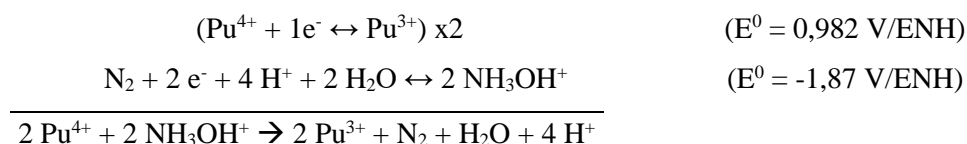


Figure 19 : Couples redox de l'hydroxylammonium (Bard, Parsons et Jordan, 1985)

En parallèle de l'hydrazine, Koltunov et ses collaborateurs ont également étudié la réduction du Pu(VI) par l'hydroxylamine jusqu'à obtenir du Pu(III) (Koltunov, Zhuravleva et Shapovalov, 1981). Comme pour l'hydrazine, le Pu(VI) subit une première réduction en Pu(V) selon la réaction suivante :



Après la dismutation du Pu(V) suivant les réactions présentées plus haut, le Pu(IV) est rapidement réduit par l'hydroxylamine en Pu(III) dont la réaction suit la réaction globale suivante :



Au cours de cette réaction, la concentration de Pu(V) augmente jusqu'à un maximum, puis diminue lorsque la concentration de Pu(III) augmente (Koltunov et al., 1981). De plus, il est important de noter que le mélange de ces deux réducteurs forts induit également des réactions acido-basiques avec la solution d'acide nitrique diminuant leur capacité d'interaction avec le plutonium (Richardson et Swanson, 1975).

Un mélange d'hydrazine et d'hydroxylamine ont donc été ajoutés en excès dans la solution afin de réduire le Pu(VI) en Pu(III). Un spectre UV-Visible (Figure 20) a été enregistré 60 minutes après avoir introduit les agents réducteurs en solution. La coloration est vert-bleue ce qui semble indiquer que plusieurs états d'oxydation sont présents dans la solution. De plus, le spectre du milieu réactionnel montre différentes bandes caractéristiques des états d'oxydation du plutonium en solution allant de +III à +VI.

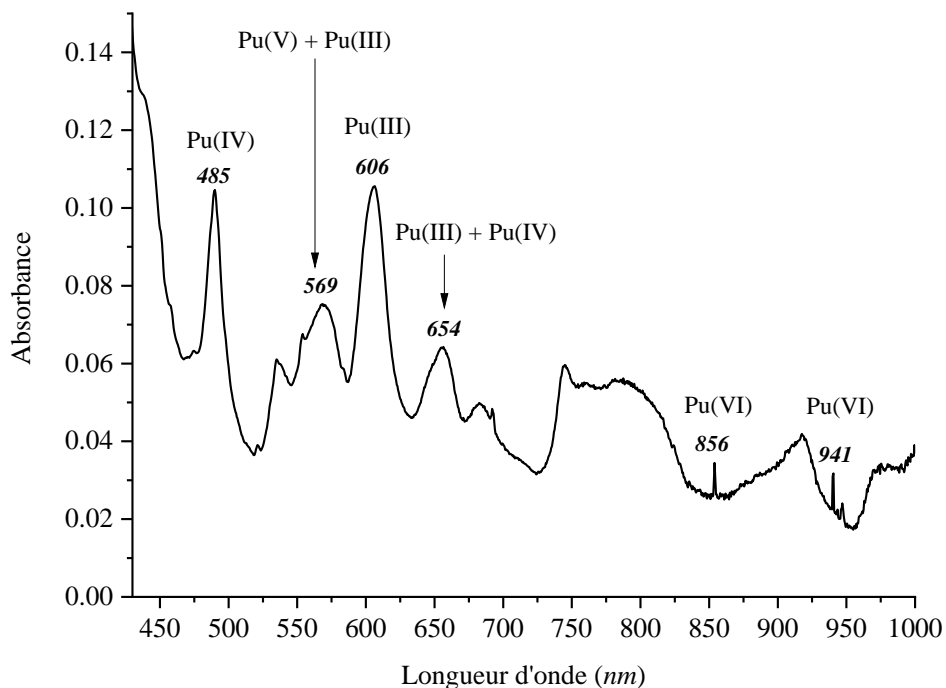


Figure 20 : Spectre UV-Visible de la réduction du plutonium en solution et mise en évidence d'un mélange d'états d'oxydation.

L'attribution des différentes bandes observées dans ce spectre est réalisée et regroupée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Attribution des bandes caractéristiques des différents états d'oxydation du Pu lors de l'acquisition du spectre UV-Visible

État d'oxydation	Bandes caractéristiques (nm)	Coefficient d'extinction molaire (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Pu(III)	569 nm, 606 nm et 654 nm	$\epsilon_{606} = 38$
Pu(IV)	485 nm et 654 nm	$\epsilon_{485} = 56$
Pu(V)	569 nm	$\epsilon_{569} = 19$
Pu(VI)	856 nm et 941 nm	$\epsilon_{856} = 555$

Ces observations indiquent donc que la réduction du Pu(VI) en Pu(III) n'est pas terminée lors de l'acquisition du spectre car des bandes résiduelles de Pu(VI) sont encore présentes. Néanmoins, le coefficient d'extinction molaire du Pu(VI) à 856 nm nous indique que ce dernier est présent à de faibles concentrations.

La solution est à nouveau contrôlée, à $t = +24h$. Le spectre UV-Visible montre clairement la présence de Pu(III) et l'absence d'autres états d'oxydation (Figure 21). La coloration de la solution est gris-bleue caractéristique du Pu(III) unique en solution dans l'acide nitrique.

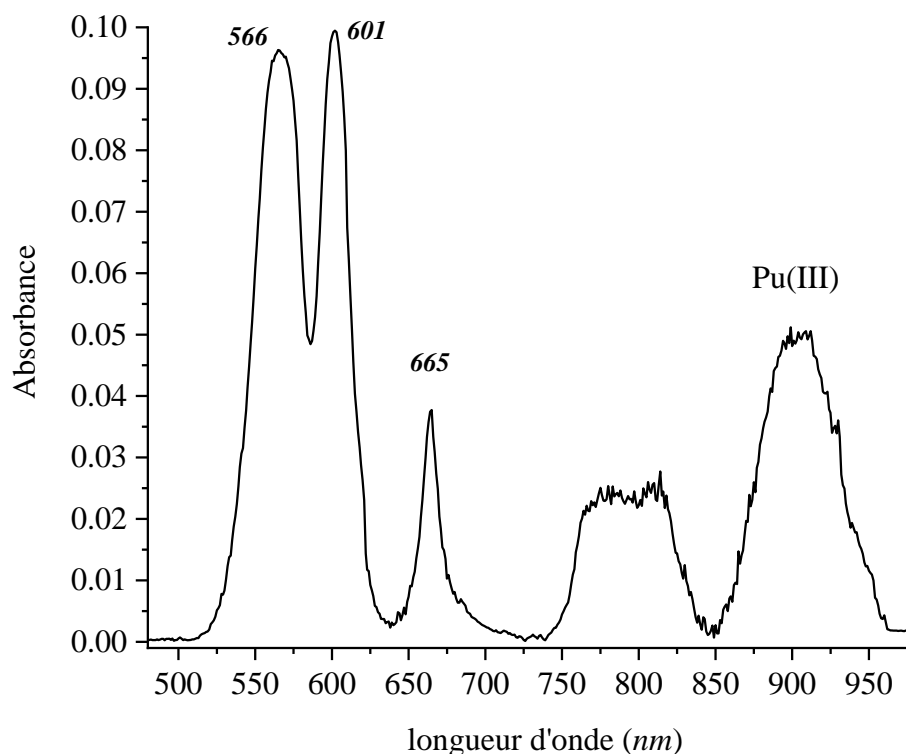
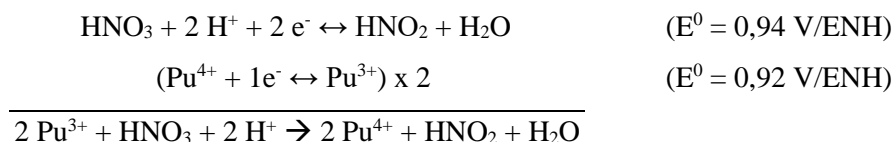


Figure 21 : Spectre UV-Visible à $t=+24h$ du plutonium après la réduction par un mélange d'hydrazine et d'hydroxylamine

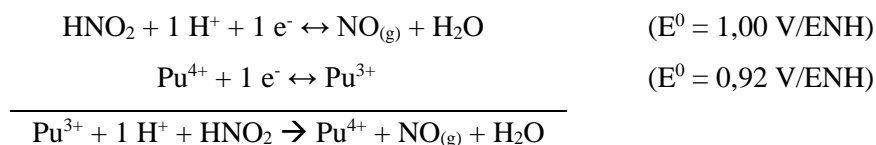
c) Réoxydation du Pu(III) en Pu(IV)

Pour obtenir le Pu(IV) et procéder à la purification sur résine, la solution est chauffée afin de détruire l'excès d'hydrazine et d'hydroxylammonium. La décomposition de l'acide nitrique par chauffage, conduit à la formation d'acide nitreux HNO_2 qui peut se décomposer en NO_x sous forme de gaz et réagir avec le Pu(III) en solution. Les NO_x formés sont des agents oxydants utilisés ici pour réoxyder le Pu(III) en Pu(IV) tout comme l'acide nitreux qui peut être utilisé pour ajuster l'état d'oxydation du plutonium.

Dans l'acide nitrique, la valeur du potentiel standard apparent du couple Pu(IV)/Pu(III) est estimée autour de 0,92 V/ESH (Fallet, Larabi-Gruet, Jakab-Costenoble et Moisy, 2016). Cette valeur est inférieure à celle reportée en milieu acide perchlorique (0,982 V/ESH). Cette différence est probablement due à la complexation par les anions nitrate. Lorsque la concentration en acide nitrique est supérieure à 2 mol.L⁻¹, cet équilibre est complètement déplacé vers la droite (Koltunov et al., 1981).



Il faut également considérer la présence de HNO₂ qui oxyde facilement le Pu(III) en Pu(IV) suivant la réaction suivante:



Un dégagement de vapeurs rousses apparaît suivi d'un changement radical de la coloration de la solution passant au vert clair caractéristique du Pu(IV) dans l'acide nitrique.

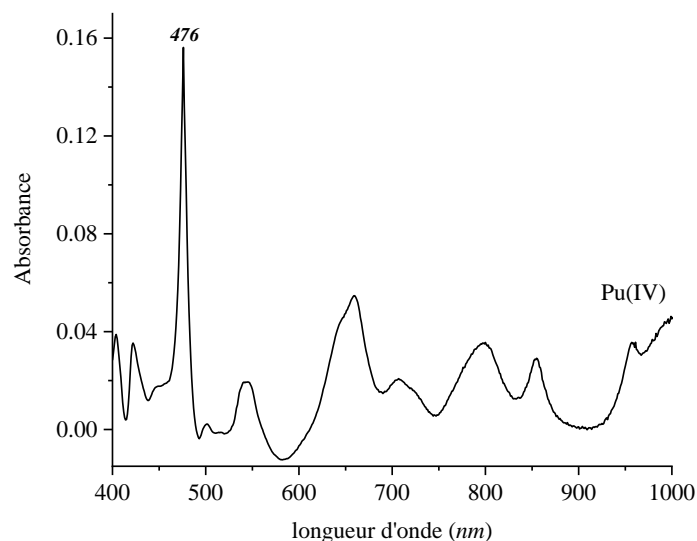
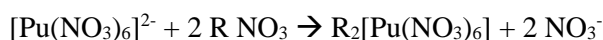
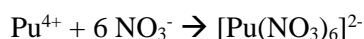


Figure 22 : Spectre UV-Visible du Pu(IV) après la destruction du NH/NHA

Le spectre UV-Visible de la solution est enregistré (Figure 22) et confirme que la totalité du plutonium se trouve à l'état d'oxydation +IV. La solution va pouvoir être éluée dans une colonne résine échangeuse d'anions.

2. Purification de la solution de plutonium par résine échangeuse d'anions

La résine DOWEX 1/8 chlorure a été utilisée pour procéder à la séparation des ions métalliques présents dans la solution. Cette résine a été préalablement conditionnée en milieu nitrique 7M. A cette acidité, le Pu(IV) est retenu par la résine grâce à la formation du complexe $[\text{Pu}(\text{NO}_3)_6]^{2-}$ selon les réactions suivantes :



(R représente la chaîne apolaire de la résine)

Lorsque la concentration d'acide nitrique est élevée, l'augmentation de l'activité des nitrates favorise la formation de $[\text{Pu}(\text{NO}_3)_6]^{2-}$ ce qui augmente le coefficient de distribution. L'absorption de la résine atteint son maximum pour une concentration en nitrate d'environ 7,5M (Ryan et Wheelwright, 1959). Lorsque cette concentration est supérieure à 7,5M, la présence des nitrates diminue l'affinité de la résine pour le plutonium (Danon, 1956; Ryan et Wheelwright, 1959; Trémillon, 1965). De plus, cette résine a la particularité de ne pas fixer les ions alcalins, les alcalino-terreux ainsi que des métaux tel que le Fe(III) ou Am(III) qui sont les métaux potentiellement présents dans cette solution.

Afin de conserver une concentration en plutonium suffisante pour pouvoir le détecter en UV-Visible, les étapes de purification doivent engager un minimum de volume. Pour cette purification, quatre étapes ont été réalisées (Figure 23).

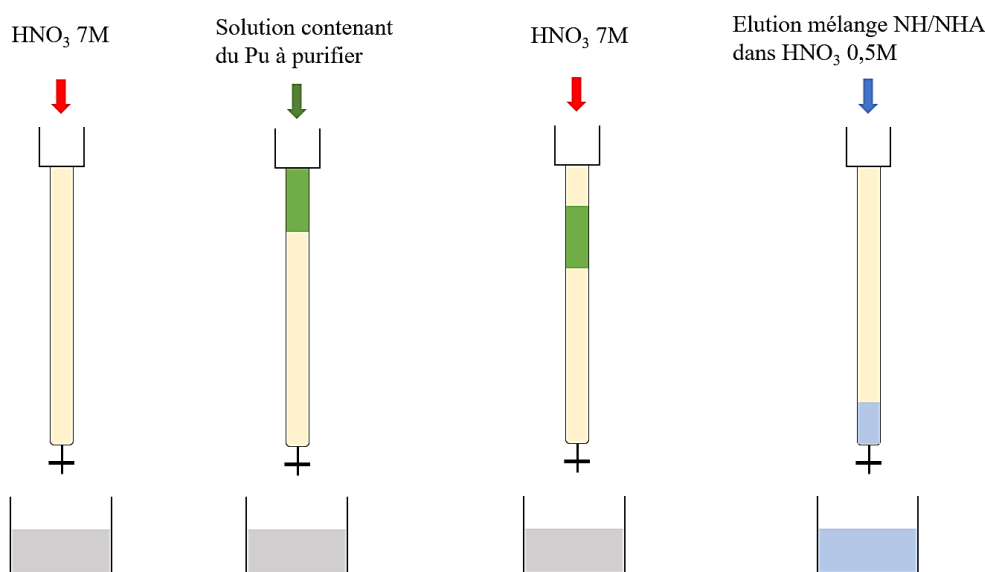


Figure 23 : Schéma de la purification de la solution de Pu(IV) sur une résine DOWEX 1/8 chlorure.

La solution de plutonium a été éluée avec un volume équivalent à la solution à purifier par de l'acide nitrique 7M. Cette solution va entraîner tous les ions qui ne se sont pas fixés sur la résine comme l'Am(III) qui est un descendant de la désintégration du plutonium et le Fe(III). Pour accélérer la désorption du plutonium un mélange d'hydrazine et d'hydroxylamine dans de l'acide nitrique 0,5M a été utilisé. La faible acidité associée à la réduction du Pu(IV) en Pu(III) permet la récupération du plutonium dans un faible volume. La solution est ensuite chauffée pour détruire l'hydrazine et l'hydroxylamine et réoxyder le plutonium à son état d'oxydation +IV. Un spectre UV-Visible de la solution a été réalisé pour s'assurer de l'état d'oxydation (Figure 24).

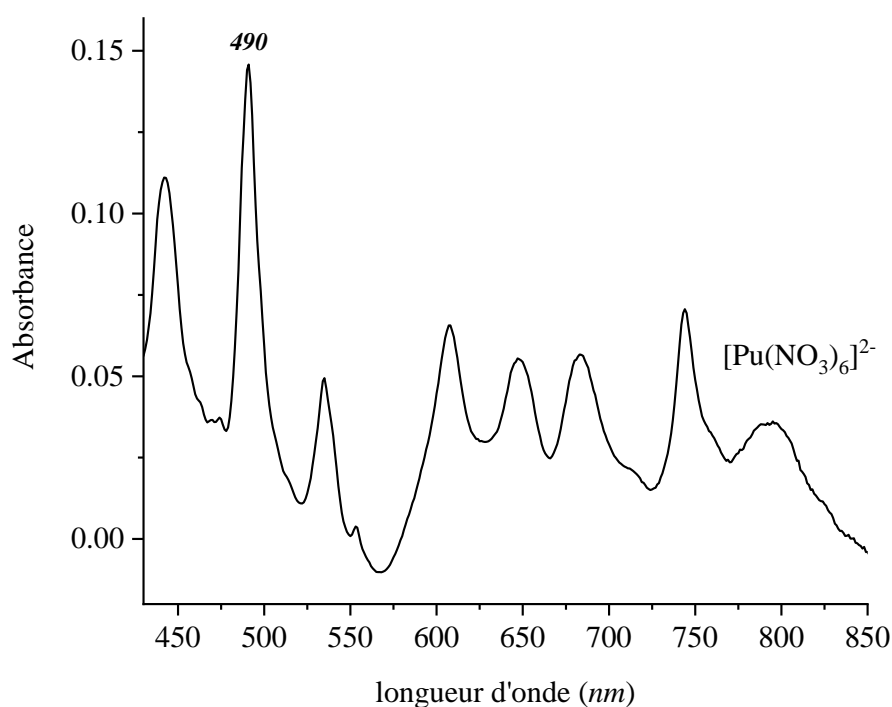


Figure 24 : Spectre UV-Visible du complexe hexanitrate de Pu(IV) après purification par une résine échangeuse d'ions DOWEX.

En comparant ce spectre aux données de Marsh et ses collaborateurs Figure 25, on constate que le spectre obtenu ne correspond pas celui du Pu(IV) en solution (*ligne bleue dans la Figure 25*), pour une acidité comprise entre 2,0 et 7,5 M mais à celui du complexe hexanitrate de plutonium $\text{Pu}(\text{NO}_3)_6^{2-}$ (*ligne rouge Figure 25*) dont l'acidité est comprise en 9,5 et 12,0 M (dans laquelle ce complexe est analysé) (Marsh, Veirs, Jarvinen, Barr et Moody, 2000).

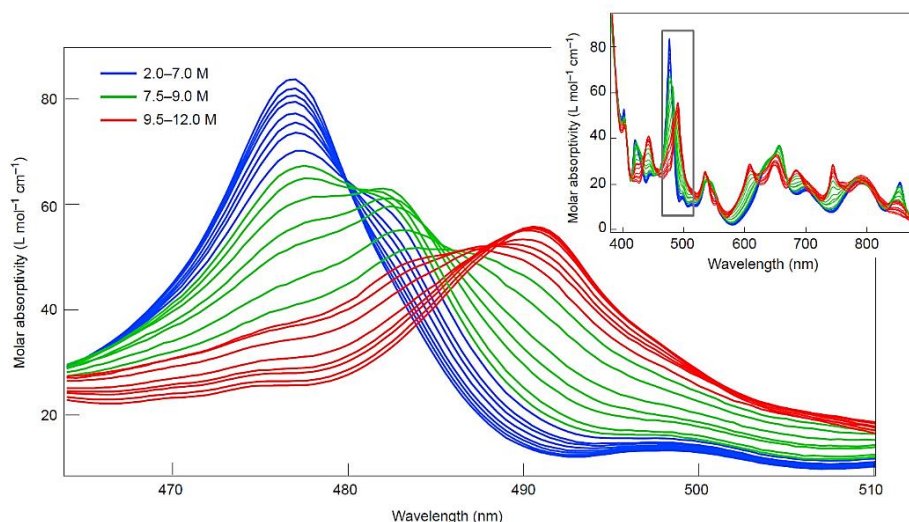


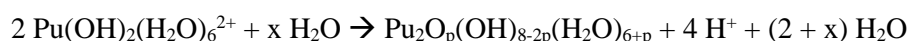
Figure 25 : Spectres d'absorption des complexes de plutonium dans l'acide nitrique ((Marsh et al., 2000)

La bande caractéristique à 490 nm, dans notre spectre (Figure 24) semble indiquer une forte acidité de l'ordre de 10 M provenant de la destruction des agents complexant ainsi que de l'évaporation de l'eau du milieu (Marsh et al., 2000). Afin de diminuer l'acidité ainsi que la concentration en nitrate tout en gardant le plutonium dans son état d'oxydation +IV, une dernière étape a consisté à précipiter sous forme colloïdale le plutonium et à le reprendre dans un acide moins concentré.

3. Précipitation du Pu(IV) sous forme colloïdale et reprise dans un acide dilué

Les solutions aqueuses de plutonium peuvent former des polymères colloïdaux. Ces colloïdes sont des particules très fines dont la formation est intimement liée à la chimie d'hydrolyse du métal. Leur formation dépend de l'acidité de la solution aqueuse, de la concentration en plutonium, de la présence d'autres ions, et de la température (Rainey, 1959). Dans des conditions spécifiques, ces colloïdes peuvent se décomposer ou se désagréger en espèces ioniques solubles, ou bien vieillir en matériaux relativement insolubles comme les oxyhydroxydes (Newton, Hobart et Palmer, 1986).

Rothe et ses collaborateurs ont proposé un modèle de formation des colloïdes du Pu(IV) en corrélation avec leurs données spectroscopiques (Rothe, Walther, Denecke et Fanghänel, 2004). Ce modèle, basé sur l'accumulation progressive d'espèces polynucléaires et la perte d'eau, propose la formation du complexe $\text{Pu}(\text{OH})_2^{2+}$ par l'hydrolyse du Pu^{4+} suivie d'une condensation menant à un monomère de $\text{Pu}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Ces monomères subissent une nouvelle condensation formant ainsi un dimère cubique (Figure 26) suivant la réaction décrite dans l'équation ci-dessous :



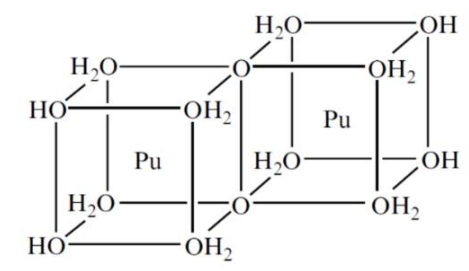


Figure 26 : Structure d'un dimère de plutonium(IV) colloïdal (Morss et al., 2006)

La reprise d'espèces colloïdales de Pu (IV) a dû être réalisée dans un temps très court car ces espèces deviennent plus insolubles dans le temps. Cette reprise s'est effectuée dans le milieu acide voulu. La solution d'hexanitrate de plutonium a été basifiée par une solution d'hydroxyde de sodium concentrée. La solution, incolore avant cette étape, devient légèrement verte puis par centrifugation, les colloïdes formés sont concentrés au fond du tube où leur couleur verdâtre est clairement visible tandis que la solution aqueuse redevient incolore.

Plusieurs étapes de lavage à l'eau ont été réalisées afin de laver les colloïdes de plutonium. Les colloïdes sont ensuite dissous dans une solution de HNO₃ à 0,5M. Un spectre UV-Visible a été enregistré afin de s'assurer que le plutonium se trouve uniquement à l'état d'oxydation +IV (Figure 27). Le complexe hexanitrate ainsi que toutes les traces de colloïdes ont disparu.

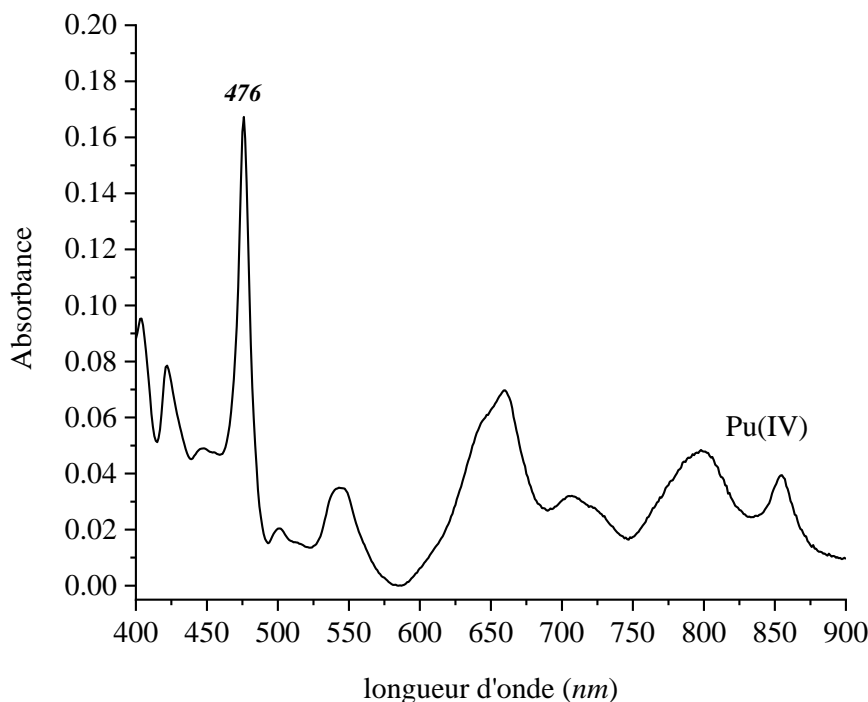


Figure 27 : Spectre UV-Visible du Pu(IV) après la reprise des colloïdes de plutonium(IV) dans une solution HNO₃ 0,5 M

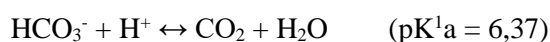
Cette solution finale purifiée peut être utilisée afin de mener les études d'interaction entre le Pu(IV) et les protéines objets de ce travail : la ferritine et la transferrine. Une dernière étape a consisté à protéger le Pu(IV) afin d'éviter les réactions d'hydrolyse et la formation de colloïdes de plutonium.

La réflexion sur le choix du ligand protecteur nous a conduit à utiliser un ligand présent biologiquement, qui peut interagir avec le plutonium dans le sang. Le carbonate est ainsi le ligand idéal car il est fortement concentré dans le sérum et intervient dans la coordination du fer avec la transferrine.

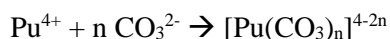
III. Préparation et caractérisation d'une solution de carbonate de plutonium

1. Données bibliographiques

Le carbonate est une espèce qui présente deux pKa pour lesquels les réactions acido-basiques sont décrites ci-dessous :



En solution, les complexes de carbonate de plutonium peuvent exister sous une variété de formes qui dépendent du pH de la solution et de la concentration en ions carbonate. La formation de complexes simples de forme $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_n]^{4-2n}$, avec $n = 0$ à 5 (Clark et al., 1998) peut être décrite par la réaction suivante :



Les constantes globales de formation des complexes de carbonate de plutonium simples sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Constantes de formation globales des complexes de carbonates de plutonium(IV) (Guillaumont, 2003; Neck et Kim, 2000; Rai et al., 1999; Yamaguchi, Sakamoto et Ohnuki, 1994)

<i>Stœchiométrie réactionnelle</i>	<i>log₁₀ β^o_n</i>	<i>Force ionique</i>
$\text{Pu}^{4+} + \text{CO}_3^{2-} = [\text{Pu}(\text{CO}_3)]^{2+}$	13,6	0
$\text{Pu}^{4+} + 2 \text{CO}_3^{2-} = [\text{Pu}(\text{CO}_3)_2] \text{ (aq)}$	24,0	
$\text{Pu}^{4+} + 3 \text{CO}_3^{2-} = [\text{Pu}(\text{CO}_3)_3]^{2-}$	31,5	
$\text{Pu}^{4+} + 4 \text{CO}_3^{2-} = [\text{Pu}(\text{CO}_3)_4]^{4-}$	34,5	
$\text{Pu}^{4+} + 5 \text{CO}_3^{2-} = [\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	32,8	

La spéciation du plutonium en présence de carbonate dans une solution aqueuse a été calculée par le logiciel JChess© afin de visualiser la répartition des espèces du plutonium à différents pH, représentée en Figure 28. Ces calculs ont été réalisés à 25°C et avec des concentrations initiales en Pu et en carbonate de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M et 3 M respectivement, qui correspondent à nos conditions expérimentales. De plus, la précipitation n'est pas prise en compte lors de la réalisation de ce calcul afin de n'observer que les espèces majoritaires en solution.

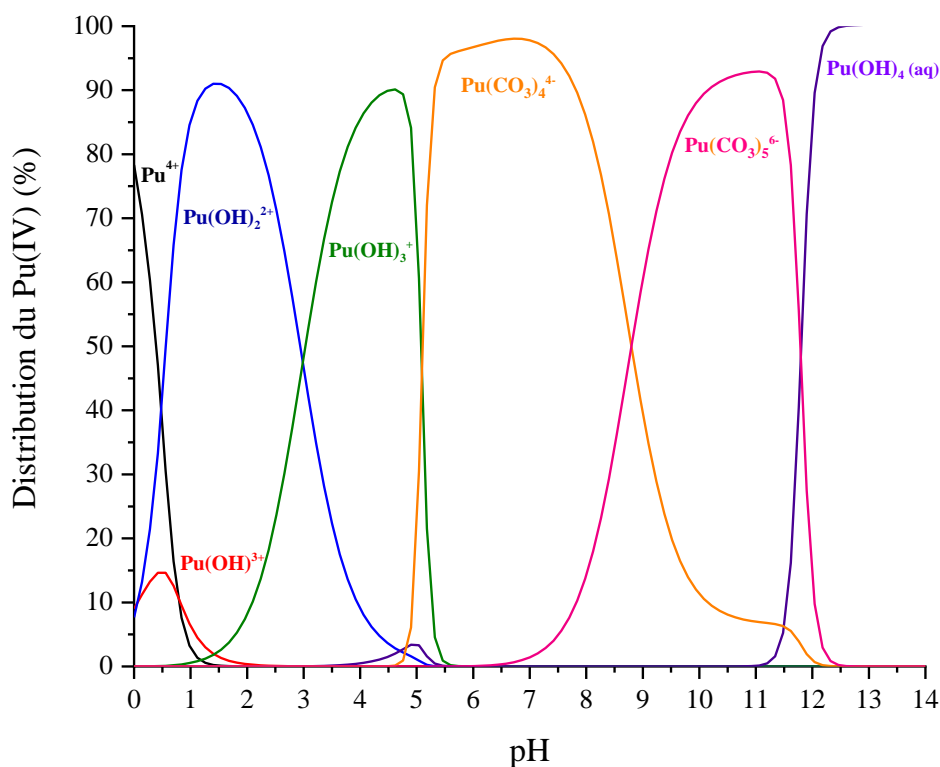
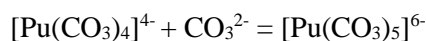


Figure 28 : Spéciation du Pu(IV) en présence de carbonate en solution ([Pu] = 2,5 mM ; [CO₃²⁻] = 3 M) à 25°C. Ce calcul est réalisé à l'aide du logiciel JChess en prenant les différentes constantes thermodynamiques des complexes de carbonate de Pu(IV) citées ci-dessus.

La solution finale de carbonate de Pu(IV) est environ à pH =10. Dans les calculs de Jchess©, illustrés en Figure 28, la constante d'équilibre à ce pH, entre les complexes $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_4]^{4-}$ et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ suit l'équilibre suivant :



Cet équilibre se produit à un pH compris entre 8 et 11 selon le diagramme de spéciation calculé. Cet équilibre peut être déplacé selon la quantité de carbonate libre dans le milieu suivant la réaction acidobasique $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. Par conséquent, la formation du complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ limite ne dépend que de la réaction acidobasique du carbonate et non de la quantité des anions HO^- en solution (Capdevila, Vitorge, Giffaut et Delmau, 1996; R. J. Lemire et NEA Data Bank, 2001).

L'identification du complexe de carbonate de Pu(IV) limite permet de fournir un point de départ pour l'identification des autres complexes. Cette approche, utilisée par Capdevila et ses collaborateurs, a permis de mettre en avant un équilibre entre $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_4]^{4-}$ et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ qui est le complexe limite de carbonate de plutonium(IV) (Capdevila et al., 1996). Cette observation a été justifiée par analogie avec la formation d'autres complexes pentacarbonato d'éléments f tétravalents, notamment avec le Th(IV) (Clark et al., 1998).

Ces premières observations nous ont permis également de réaliser une solution de carbonate de Th(IV). Le Th (IV) a été utilisée comme analogue chimique du Pu(IV).

2. Réalisation de la solution de carbonate de plutonium et caractérisation par méthodes spectroscopiques

La solution de carbonate de plutonium a été préparée en ajoutant, dans une solution de carbonate concentrée de 3M, la solution de Pu(IV). Après cet ajout, le pH de la solution est environ de 10. Le protocole de préparation de cette solution est décrit en Annexe A. À ce pH et d'après la spéciation du plutonium calculée en utilisant JChess, le complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ est attendu comme étant l'espèce majoritaire et le complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_4]^{4-}$ minoritaire. Cette solution a ensuite été centrifugée afin de sédimenter les éventuels colloïdes de plutonium dans la solution. Le surnageant de cette solution a été analysé par spectrophotométrie d'absorption UV-visible afin de caractériser et de confirmer la présence d'un complexe de carbonate de plutonium (Figure 29). Ce spectre est également comparé avec les données issues de la littérature.

Le spectre obtenu est caractéristique du complexe limite $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$. Les études réalisées par Tait et ses collaborateurs suggèrent que la bande à 486 nm du spectre indique une formation de complexe

carbonaté, visible dans une gamme de pH compris entre 8,8 et 12 dans un milieu concentré en carbonate (Tait, Ekberg, Palmer et Morris, 1995).

Plus tard, Capdevilla et ses collaborateurs ont mené des études sur l'identification du complexe correspondant à la bande à 486 nm. Ces résultats suggèrent que cette bande est associée au complexe limite de carbonate de plutonium $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$. Ce résultat a été confirmé par les travaux de Clark et ses collaborateurs (Capdevilla et al., 1996; Clark et al., 1998).

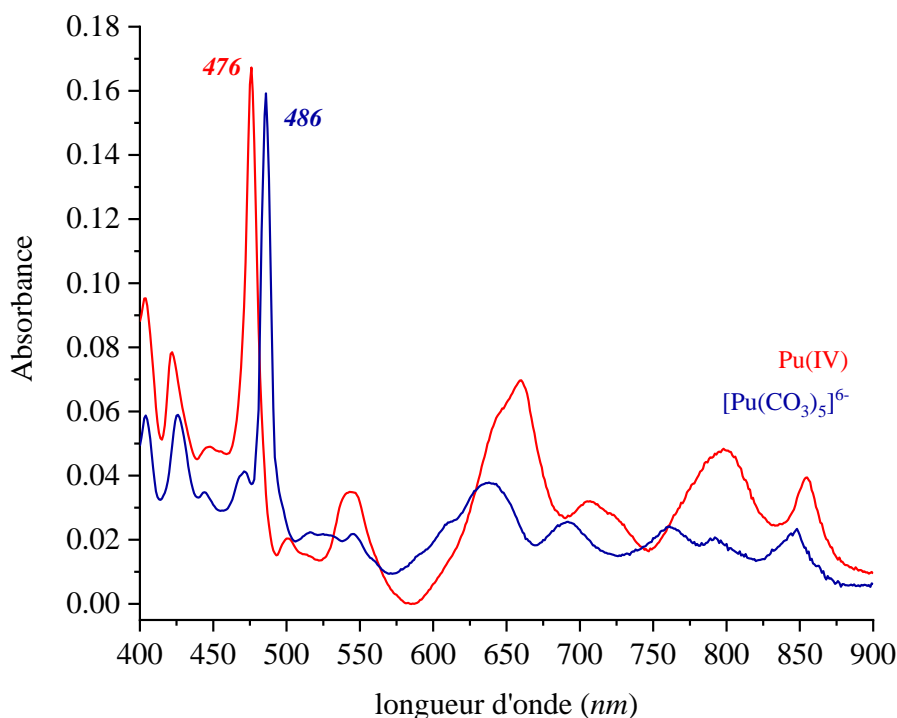


Figure 29 : Comparaison du spectre UV-Visible du Pu(IV) (en rouge) à celui du complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (en bleu)

Afin de compléter la caractérisation du complexe formé dans ce travail, une analyse par EXAFS (Extended X-Ray Fine Structure) a été réalisée sur la ligne MARS du synchrotron SOLEIL. Les distances obtenues après l'ajustement du spectre avec un modèle $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$, sont comparés à la littérature afin de confirmer la présence de ce complexe.

Le spectre EXAFS du complexe de carbonate de Pu(IV), à pH 10, a été enregistré au seuil L_{III} du plutonium (18 057 eV). En parallèle, une solution de carbonate de Th(IV) préparée dans les mêmes conditions a également été enregistrée au seuil L_{III} du thorium (16 300 eV).

La Figure 30 représente le signal EXAFS et le module de la transformée de Fourier du signal EXAFS avec les courbes ajustées en pointillés et les paramètres d'ajustement sont reportés dans le Tableau 11.

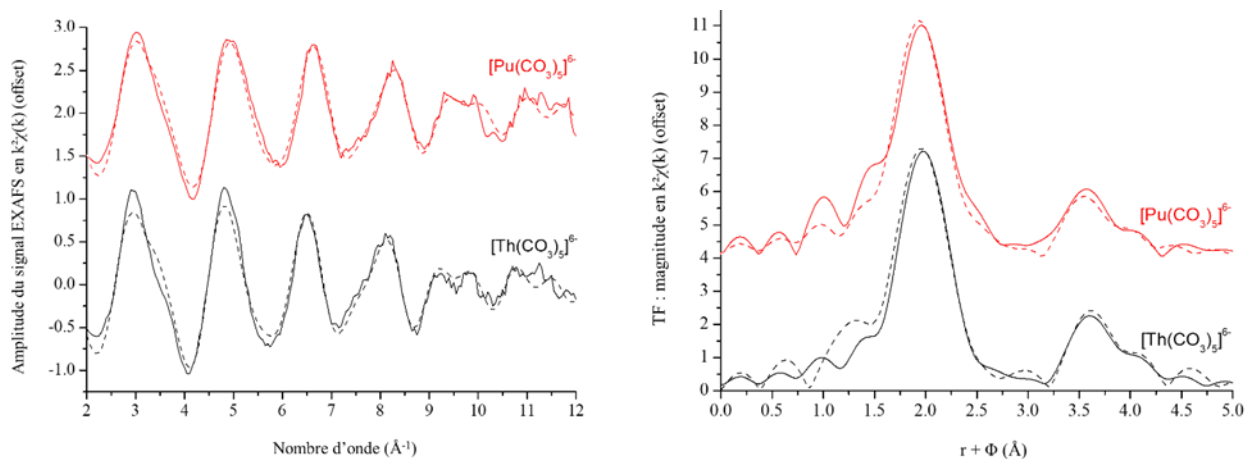


Figure 30 : à gauche : Spectre EXAFS des complexes de carbonate de Th(IV) (en noir) et de carbonate de plutonium(IV) (en rouge) ; à droite : les transformées de Fourier des spectres EXAFS correspondant. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (pointillés).

Les paramètres d'ajustement (Tableau 11) des complexes $An^{IV}(CO_3)_5^{6-}$ ($An = Pu, Th$) ont été obtenus à partir des modèles cristallins disponibles dans la littérature : $Na_6[Th(CO_3)_5] \cdot 12H_2O$ dans le cas du thorium et $Na_6[Pu(CO_3)_5] \cdot Na_2(CO_3) \cdot 12H_2O$ dans le cas du plutonium. Les sphères de coordination $\{Th(CO_3)_5\}$ et $\{Pu(CO_3)_5\}$ extraites de ces structures sont illustrées sur la Figure 31 et ont servi pour l'ajustement des spectres expérimentaux.

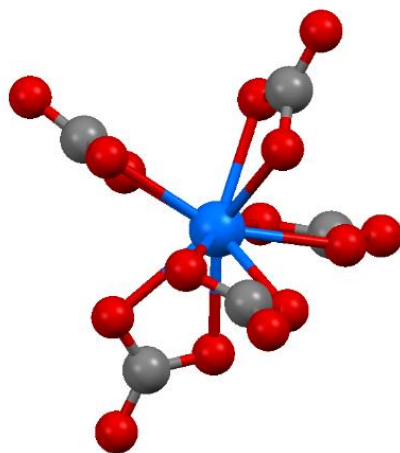


Figure 31 : Structure du complexe $[An^{IV}(CO_3)_5]^{6-}$ ($An = Th, Pu$) utilisé pour l'ajustement des spectres expérimentaux. (bille bleue : An^{IV} , bille rouge : oxygène et bille grise : carbone)

Tableau 11 : Paramètres du meilleur ajustement obtenu pour les spectres EXAFS des complexes $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ et $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ comparés aux distances des structures cristallines. (σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, ΔE_0 est l'ajustement en énergie, S_0^2 est le facteur d'amplitude, R-factor est le facteur d'accord et Q-factor est le facteur de qualité). L'incertitude sur le dernier chiffre est entre parenthèses.

Complexe	Première sphère : O	Deuxième sphère : C	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Q-factor R-factor
$[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	10,2(4) O à 2,44(2) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	5,1(4) C à 2,88(1) Å $\sigma^2 = 0,008 \text{ \AA}^2$	1,0 6,54	38 2,6%
<i>littérature</i> $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	10 O à 2,42(1) Å	5 C à 2,88(1) Å		
$[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	10,8(4) O à 2,50(8) Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$	5,2(4) C à 2,96(9) Å $\sigma^2 = 0,014 \text{ \AA}^2$	1,0 4,21	39 2,9%
<i>littérature</i> $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	10 O à 2,49(1) Å	5 C à 3,03(1) Å		

Dans la structure cristalline de $\text{Na}_6[\text{Th}(\text{CO}_3)_5] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, le thorium est entouré par dix atomes d'oxygène appartenant à cinq carbonates bidentes. Les distances Th-O sont comprises entre 2,45 Å et 2,56 Å avec une distance moyenne de 2,49(1) Å. Cinq carbones sont présents dans la deuxième sphère de coordination avec des distances Th-C comprises entre 2,89 Å et 3,26 Å et une distance moyenne de 3,03(1) Å et, enfin, les distances des oxygènes distaux (Figure 32) sont comprises entre 4,11 Å et 4,64 Å avec une distance moyenne de 4,30(2) Å (Voliotis et Rimsky, 1975).

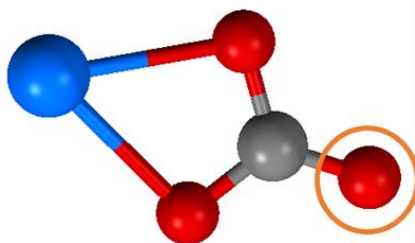


Figure 32 : Représentation d'un oxygène distal, entouré en orange, d'un carbonate avec une interaction bidente

Les valeurs obtenues par ajustement des spectres EXAFS de ces solutions montrent que pour le complexe $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$, 10,3(4) oxygènes sont présents en première sphère de coordination avec une

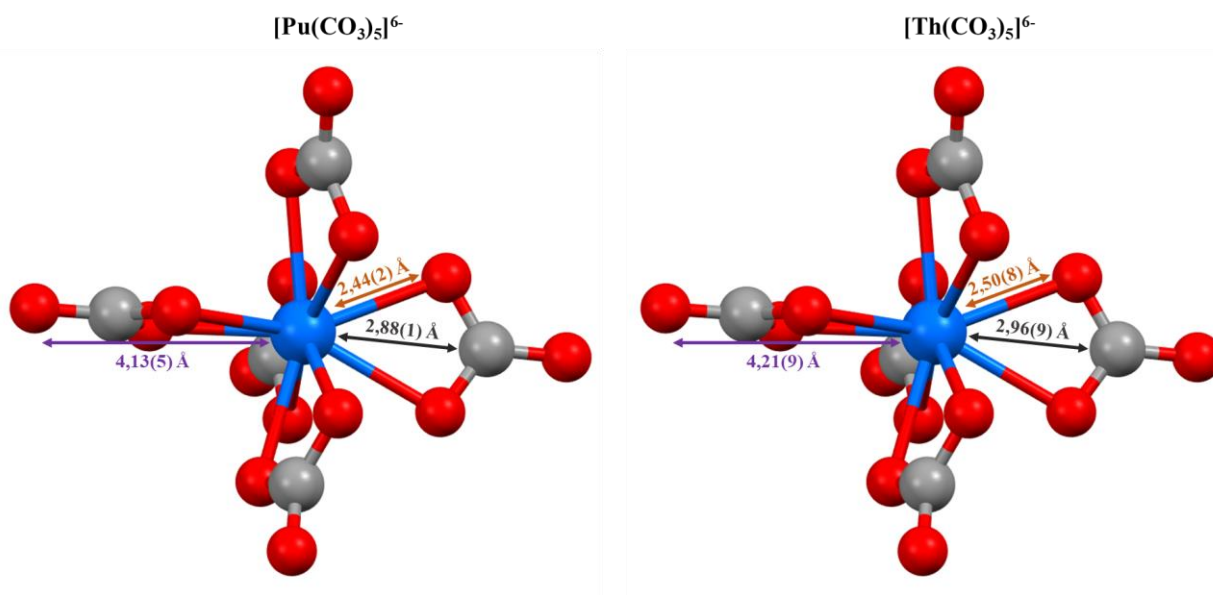
distance moyenne Th-O de 2,50(8) Å. La deuxième sphère de coordination du complexe est composée de 5,4(4) carbones qui se situent à une distance moyenne Th-C de 2,96(9) Å et les oxygènes distaux sont situés à 4,21(9) Å.

En ce qui concerne les données cristallographiques de la structure $\text{Na}_6[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5] \cdot \text{Na}_2(\text{CO}_3) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, le plutonium est entouré de dix atomes d'oxygène en première sphère de coordination avec des distances Pu-O qui couvrent une plage relativement étroite de 2,38(1) - 2,43(1) Å, avec une valeur moyenne de 2,42(1) Å. La deuxième sphère de coordination est composée de cinq atomes de carbone à une distance moyenne Pu-C de 2,88(1) Å et des oxygènes distaux (Figure 32) qui se situent à une distance moyenne de 4,12(1) Å (Clark et al., 1998).

Avec l'ajustement du spectre EXAFS nous obtenons, 10,2(4) oxygènes en première sphère de coordination avec une distance moyenne Pu-O de 2,44(6) Å. La deuxième sphère de coordination 5,1(4) carbones situés à 2,88(1) Å et des oxygènes distaux à 4,13(5) Å.

Ces données EXAFS sont donc en accord avec les structures cristallines des complexes de carbonate d'actinide (IV) et permettent de confirmer la structure du complexe formé dans nos solutions.

En résumé, les structures des deux complexes pentacarbonato de Th(IV) et Pu(IV), sont schématisées Figure 33. Ces solutions ont été utilisées pour mener les études d'interaction entre les An(IV) et les protéines cibles du cycle du fer : la ferritine et la transferrine.



Chapitre III :

La ferritine

Le chapitre précédent a porté sur l'élaboration et la caractérisation d'une solution de carbonate de plutonium. Dans le présent chapitre, nous nous intéressons à l'interaction des actinides (IV), protégés par des carbonates, avec une protéine cible impliquée dans le cycle du fer : la ferritine. Ces interactions seront comparées à celle du Fe(III) pour mettre en avant les similitudes de comportement entre ces différents métaux.

I. La ferritine, protéine omniprésente dans le Vivant

1. Généralités de la ferritine

En 1937, Laufberger, isole pour la première fois une nouvelle protéine de la rate de cheval qui contient jusqu'à 23 % de fer en poids sec. Cette nouvelle protéine reçoit le nom de ferritine. Quelques années plus tard, Addison et ses collaborateurs démontrent que la ferritine peut être détectée de manière fiable dans le sérum humain (Addison et al., 1972).

Les ferritines sont une famille de protéines présentes dans les trois règnes de la vie, c'est-à-dire les eucaryotes, les bactéries et les archées, sous forme de ferritine, de bactérioferritine et d'archéoferritine récemment identifiée (Ebrahimi, Hagedoorn, van der Weel, Verhaert et Hagen, 2012).

Bien qu'il existe différents types de ferritine, leur structure protéique globale reste similaire. Dans le cas des bactérioferritines, des groupes hémiques sont présents dans la structure sans toutefois modifier la structure globale de cette dernière (Honarmand Ebrahimi, Hagedoorn et Hagen, 2015).

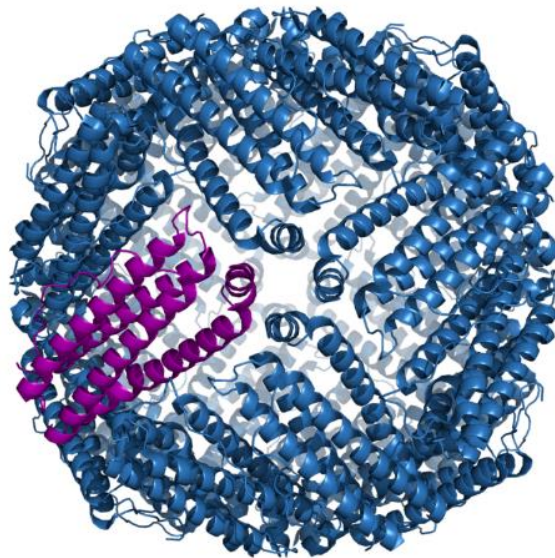


Figure 34 : Structure de la ferritine constituée de 24 sous-unités dont l'une est représentée en violet (PDB : 1LB3) (Granier et al., 2003)

De façon générale, la ferritine (Figure 34) est une protéine oligomère constituée de 24 sous-unités α -hélicoïdales qui s'assemblent pour former une coquille creuse approximativement sphérique d'un diamètre extérieur de 120-140 Å avec une cavité interne de diamètre de 80 Å dans laquelle réside un cœur ferrique (Laghaei, Evans et Coalson, 2013). Cette protéine est impliquée dans le stockage et la régulation intracellulaire du fer (Arosio et Levi, 2002). La ferritine est ainsi capable d'accueillir et de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer dans deux compartiments distincts : le cœur ferrique et la coquille protéique.

Des études sur la répartition du fer au sein de la ferritine hépatique ont montré que, dans le cœur ferrique, la charge en fer est estimée entre 1100-1850 atomes de fer avec une distribution moyenne de 1500 ± 300 atomes de fer (Chasteen et Harrison, 1999; Jutz, van Rijn, Santos Miranda et Böker, 2015; Pan et al., 2009). De plus, Pan et ses collaborateurs ont observé que la probabilité de saturer la cavité ferrique de la ferritine est très faible. L'accumulation du fer au sein du cœur ferrique se produit par l'absorption et l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) et la production d'un minéral cristallin ferrique, traditionnellement décrit comme de la ferrihydrite [$5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$] (Chasteen et Harrison, 1999).

Ces données laissent suggérer que, par la différence entre la capacité maximale de la protéine et la capacité de stockage du cœur ferrique, la capacité de charge en fer de la coquille protéique peut être estimée à environ 2500-3500 atomes de fer.

2. Structure et rôle des sous-unités

La ferritine est le produit de l'auto-assemblage de deux types de sous-unités : la sous-unité L "light" de 19 kDa et la sous-unité H "high" de 21 kDa. Ces sous-unités sont composées de 172 résidus répartis sous la forme de cinq α -hélices de structure similaire. Les quatre premières α -hélices, nommées A, B, C, et D, forment ensemble un faisceau d'hélices antiparallèles et la cinquième hélice nommée l'hélice E est, quant à elle, plus courte que les autres (Figure 35). Les hélices B et D forment la surface intérieure de la nano-cage tandis que les hélices A et C forment l'extérieur de la cage protéique (Laghaei et al., 2013).

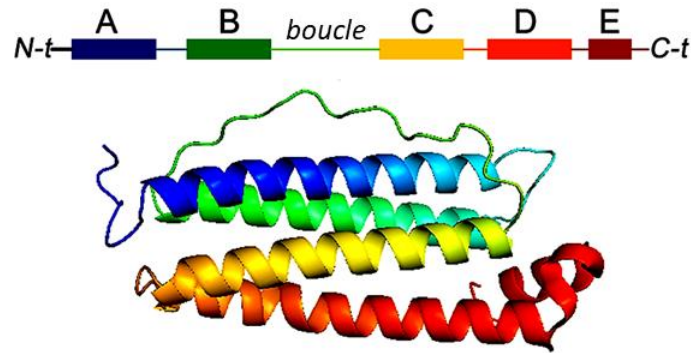


Figure 35 : Structure tertiaire d'une sous-unité de la ferritine faisant apparaître les quatre hélices α formant un faisceau et une courte hélice α C-terminale (Honarmand Ebrahimi et al., 2015)

Les sous-unités L et H ont chacune un rôle bien défini au sein de l'enveloppe protéique de la ferritine.

Les sous-unités H jouent un rôle clé dans la détoxification rapide du fer. Ces sous-unités contiennent une région hydrophile qui abrite des centres catalytiques di-nucléaires, appelés aussi centres de ferroxidase, permettant l'oxydation rapide du Fe(II) en Fe(III) pendant le stockage (Chasteen et Harrison, 1999).

Dans les sous-unités L, cette région hydrophile varie d'un type de ferritine à l'autre et est associée à une stabilité accrue de la sous-unité (Hempstead, 1997). Les groupements glutamates présents dans la structure de la sous-unité L sont associés à un centre de nucléation qui permet la minéralisation sur la surface interne de l'enveloppe protéique (Santambrogio, Levi, Cozzi, Corsi et Arosio, 1996).

Ces deux sous-unités étant iso-structurales, elles possèdent une similarité de séquence d'acides aminés qui est comprise entre 50 et 56%. De plus, une grande conservation de la séquence des sous-unités H et L est également observée entre les différents mammifères (Orino, Miura, Muto et Watanabe, 2005). D'après ces données, la sous unité H présente une similitude inter-espèces d'environ 90 % tandis que la sous unité L présente une similitude d'environ 80 % (S. C. Andrews et al., 1992; Orino et Watanabe, 2008).

La variation du rapport H/L affecte la quantité de fer incorporé et sa minéralisation dans le noyau. La ferritine atteint un maximum de saturation en fer avec seulement 18-30% de sous-unités H dans sa structure globale (Levi et al., 1994). Ces deux sous-unités coexistent donc dans la structure des ferritines et le rapport des sous-unités H/L varie grandement selon le tissu biologique considéré (Le Brun et al. 2010 ; Laghaei, Evans, et Coalson 2013). Les ferritines riches en sous-unités L prédominent dans les organes de stockage du fer tels que le foie et la rate, tandis que les ferritines riches en sous-unités H prédominent dans les organes à faible teneur en fer, comme le cœur ou le cerveau.

Du fait de la haute similitude séquentielle des deux types de sous-unités entre les mammifères, les données concernant l'étude des mécanismes d'interactions possibles entre les actinides (IV) et une sous-unité ou une ferritine complète de mammifère présente dans un organe donné peuvent être étendues à l'ensemble des mammifères.

3. Assemblage des sous-unités pour former la ferritine

Les études concernant l'assemblage de 24 sous-unités des ferritines ont été très limitées jusqu'à récemment. Au cours des dernières années, l'assemblage de ces protéines a suscité de l'intérêt pour diverses applications bio-technologiques. La structure de la coquille protéique des ferritines peut être utilisée dans des applications potentielles en nanotechnologie (Yamashita, Iwahori et Kumagai, 2010), en sciences des matériaux pour la synthèse de nouveaux matériaux ayant des applications dans l'administration de médicaments (Uchida, Kang, Reichhardt, Harlen et Douglas, 2010) et en biocatalyse (Thomas et Ward, 2005). Les propriétés de l'assemblage des ferritines ont été élucidées pour la première fois par Harrison et ses collaborateurs dans des études sur la ferritine naturelle de la rate de cheval (Banyard, Stammers et Harrison, 1978).

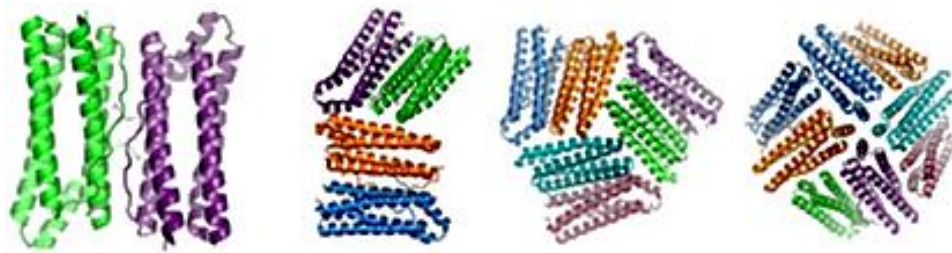


Figure 36 : Surface d'interaction de deux monomères qui forment un dimère, deux dimères, trois dimères et quatre dimères (Honarmand Ebrahimi et al., 2015).

Un travail de 2013, mené par Huard et ses collaborateurs a permis d'approfondir les mécanismes d'auto-assemblage de la ferritine (Huard, Kane et Tezcan, 2013). Cet assemblage débute par la formation de dimères via l'interaction de la boucle entre l'hélice B et l'hélice C de deux sous-unités (Figure 36). Ensuite, ces différentes structures s'associent entre elles pour former la coquille protéique et induisent des axes de symétrie distincts. Lors de l'assemblage, plusieurs types de canaux se forment selon l'interaction entre les dimères (Figure 36). Ces canaux sont étudiés comme possibles voies d'internalisation du Fe(II) au sein de la coquille protéique. La structure protéique de la ferritine contient six canaux quadruples (axe d'ordre 4 appelé C4), huit canaux triples (axe d'ordre 3 appelé C3), douze canaux doubles (axe d'ordre 2, appelé C2) et 24 canaux simple, un par sous-unité (Arosio, Carmona, Gozzelino, Maccarinelli et Poli, 2015; Theil, Tosha et Behera, 2016).

4. Internalisation du Fe(II) et structure du centre de ferroxidase

Le chemin exact emprunté par le Fe(II) pour atteindre les sites catalytiques de la ferroxidase de la ferritine est encore mal compris. Les études d'internalisation se sont essentiellement portées sur les canaux C3 et C4 de cette protéine (Figure 37).

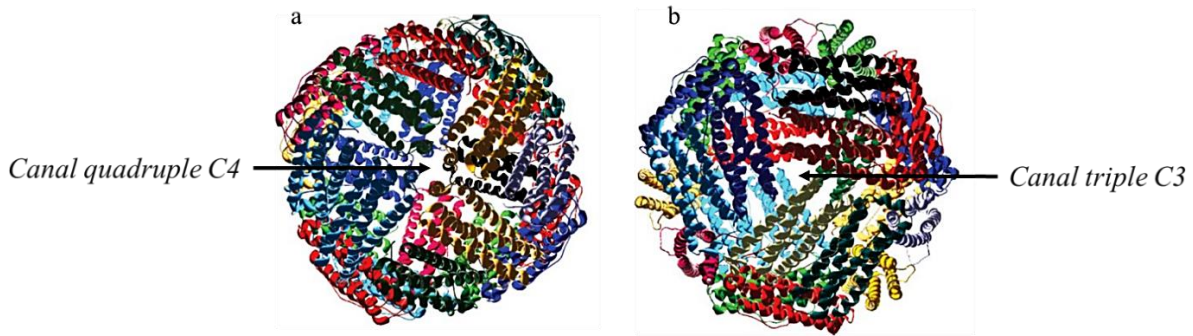


Figure 37 : Représentation du canal quadruple (à gauche) et le triple (à droite) contenus dans une même structure protéique (Laghaei et al., 2013)

Malgré de nombreuses similitudes entre les ferritines exprimées dans différentes espèces, la structure interne des canaux C3 et C4 est très variable, montrant des différences substantielles en terme d'hydrophobie/hydrophilie lorsqu'on compare les ferritines des vertébrés avec celles des plantes, des bactéries ou des archées (Bou-Abdallah, 2010; Honarmand Ebrahimi et al., 2015).

Chez la plupart des espèces, les 24 sous-unités assemblées de la ferritine sont étroitement serrées les unes contre les autres, laissant huit canaux triples C3 hydrophiles étroits et six canaux quadruple C4 hydrophobes, tous deux d'un diamètre d'environ 4 Å (Bou-Abdallah, 2010).

a) Interaction du Fe(II) dans le canal quadruple C4 et le canal triple C3

Les canaux C4 possèdent une longueur d'environ 12 Å et sont relativement étroits. Ces canaux sont principalement hydrophobes en raison des résidus Leu26, Ala30, Leu106 et Val110 (Ciacchi et Payne, 2004; Takahashi et Kuyucak, 2003). Du fait de leur nature chimique, ces canaux sont donc une voie d'incorporation du Fe(II) peu probable. En revanche, ces canaux quadruples sont suspectés d'être de possibles voies de diffusion du dioxygène vers l'intérieur de la protéine (Bou-Abdallah et al., 2008).

Plusieurs études ont proposé le canal triple C3 comme la voie de passage principale pour les ions Fe(II) (Liu, Patterson, Miller et Theil, 2007; Tosha, Ng, Bhattasali, Alber et Theil, 2010). Les canaux C3, d'environ 15 Å à 20 Å de longueur, sont formés par l'extrémité N-terminale des hélices D et l'extrémité

C-terminale des hélices C des sous-unités (Harrison et Arosio, 1996). Le canal triple forme un pore en forme d'entonnoir (Figure 38) qui est tapissé de chaînes latérales d'acides aminés chargés négativement de glutamate et d'aspartate, ce qui le rend hydrophile et propice à l'entrée des métaux (Masuda, Zang, Zhao et Mikami, 2018).

Mécaniquement, les atomes de Fe(II) libres à l'extérieur de la ferritine sont attirés par les résidus d'His118 et Cys 130, situés à l'entrée extérieure du canal triple qui guident les atomes de Fe(II) dans ce canal. Une fois dans le canal triple, les atomes de Fe(II) occupent deux sites de liaison composés de trois résidus Asp 131 et trois résidus Glu 134 (Toussaint, Bertrand, Hue, Crichton et Declercq, 2007; Treffry et al., 1993). L'atome de Fe(II) situé au plus profond du canal triple se déplace vers le centre de la ferroxidase dès qu'un nouvel atome s'insère à l'entrée du canal triple (Laghaei et al., 2013).

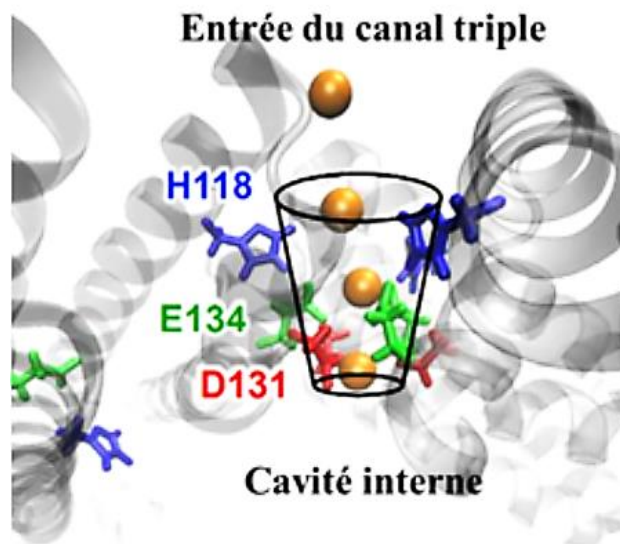


Figure 38 : Mécanisme d'internalisation des Fe(II) (sphères orange) par liaison avec les résidus acides situés au niveau du canal triple et leur entrée dans le site catalytique de la ferroxidase. Les résidus His sont représentés en bleu, Glu en vert et Asp en rouge ; PDB : 2FHA (Hempstead, 1997; Maity, Hishikawa, Lu et Ueno, 2019)

D'autres études ont détaillé les mécanismes de la translocation à travers le canal triple du Fe(II) en utilisant différents cations divalents comme le Mg(II), le Cu(II) et le Zn(II). Ces études révèlent que l'espèce métallique induit des propriétés mécanistiques différentes des résidus du canal triple pouvant ainsi agir comme une porte sélective des ions métalliques (Chandramouli, Del Galdo, Mancini et Barone, 2019; Honarmand Ebrahimi et al., 2015).

Il est important de noter que ces canaux triples hydrophiles sont hautement conservés entre les ferritines des vertébrés, des plantes et des algues (Masuda, Goto, Yoshihara et Mikami, 2010; Masuda, Morimoto, Mikami et Toyohara, 2012).

b) Interaction du Fe(II) dans les sites de ferroxidase et de nucléation et formation du cœur ferrique de ferrihydrite

La ferroxidation est le processus crucial d'incorporation du fer dans l'enveloppe de la ferritine. Lorsque le Fe(II) quitte l'entonnoir du canal triple, un résidu glutamate le dirige vers les sites de ferroxidase, situés à l'intérieur de l'enveloppe de la protéine, qui permettront l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) (Figure 40) (Douglas et Ripoll, 1998).

Les centres de ferroxidase des sous-unités H des ferritines ont été intensivement étudiés pendant plusieurs décennies, sans obtenir une structure définie du fer lié à ces centres. Néanmoins, les nombreuses études sur les interactions du site avec d'autres ions métalliques divalents plus stables, comme le Zn(II), le Mg(II), le Cu(II), le Mn(II), et le Co(II), ont permis de construire un modèle détaillé du centre (Bacelo et Binning, 2011; Banyard et al., 1978; Langlois d'Estaintot et al., 2004; Toussaint et al., 2007).

Le site ferroxidase, caractérisé par un potentiel très négatif, est de structure di-nucléaire comprenant deux sites de liaison du fer nommés Fe_A et Fe_B (Figure 39). Le site A est composé des résidus Glu27, His65 monodentes ainsi que d'une molécule d'eau en interaction directe avec le métal. Le fer dans le site B, quant à lui, semble être lié à des résidus Glu107 bidente et Glu61 monodente (Le Brun et al., 2010). En plus de ces résidus de coordination directe, les résidus Tyr34 et Gln141 forment des liaisons hydrogène avec Glu107 dans ce site. Enfin, un résidu de glutamate (Glu62) est pontant entre les deux atomes de fer (Jutz et al., 2015; Laghaei et al., 2013). La distance Fe_A et Fe_B varie entre 2,6 et 3,6 Å selon les sous-unités observées. De plus cette distance inter-métal varie en fonction des cations divalents (Bertini et al., 2012).

Un troisième site de liaison, appelé site C, est présent au sein du centre de ferroxidase bien que ce site ne soit pas tout le temps occupé par un atome de Fe(II). Le site de liaison A semble avoir une plus grande affinité que les sites B et C (Bertini et al., 2012).

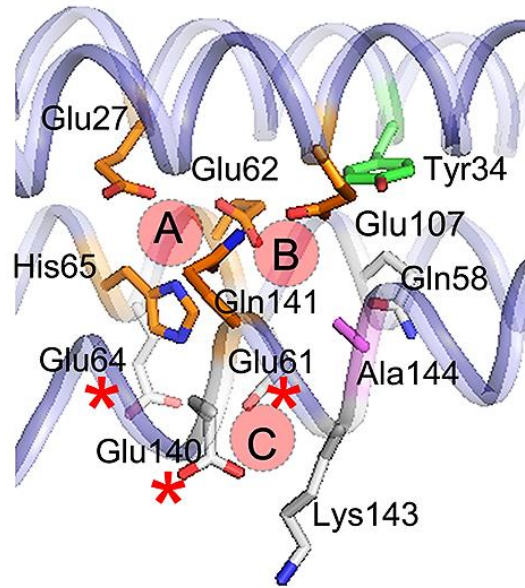
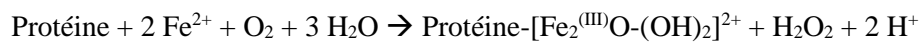


Figure 39 : Structure cristalline aux rayons X de la sous unité H de la ferritine humaine (HuHF) montrant la position possible des métaux dans les sites A et B du centre de la ferroxidase et le site C ; PDB : 2FHA (Hempstead, 1997; Honarmand Ebrahimi et al., 2015)

L'étape d'oxydation est contrôlée par la géométrie du ligand du centre de la ferroxidase. Le mécanisme d'oxydation du Fe(II) est illustrée en Figure 40. Lorsque la ferritine possède une faible charge en fer, inférieure ou égale à celle nécessaire pour remplir les centres de la ferroxidase, la réaction dominante est au niveau du centre ferroxidase. Cette réaction fait apparaître deux intermédiaires diferriques qui sont les précurseurs de la formation du cœur ferrique. Durant la réaction d'oxydation, deux intermédiaires se forment μ -1,2-peroxodiferrique, de formule $[\text{Fe}_2\text{O}_2]^{2+}$ (Figure 40 B), et le complexe μ -1,2-oxodiferrique, de formule $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{OH})_2]^{2+}$, qui est le produit de la désintégration du complexe hydroperoxo (Figure 40 C) (Bou-Abdallah, 2010; Bou-Abdallah, Zhao, Mayne, Arosio et Chasteen, 2005).

La réaction d'oxydation globale implique deux Fe(II) et du dioxygène et la libération de protons, de peroxyde d'hydrogène ainsi que la formation du complexe μ -1,2-oxodiferrique :



(Bou-Abdallah, 2010; Chasteen et Harrison, 1999)

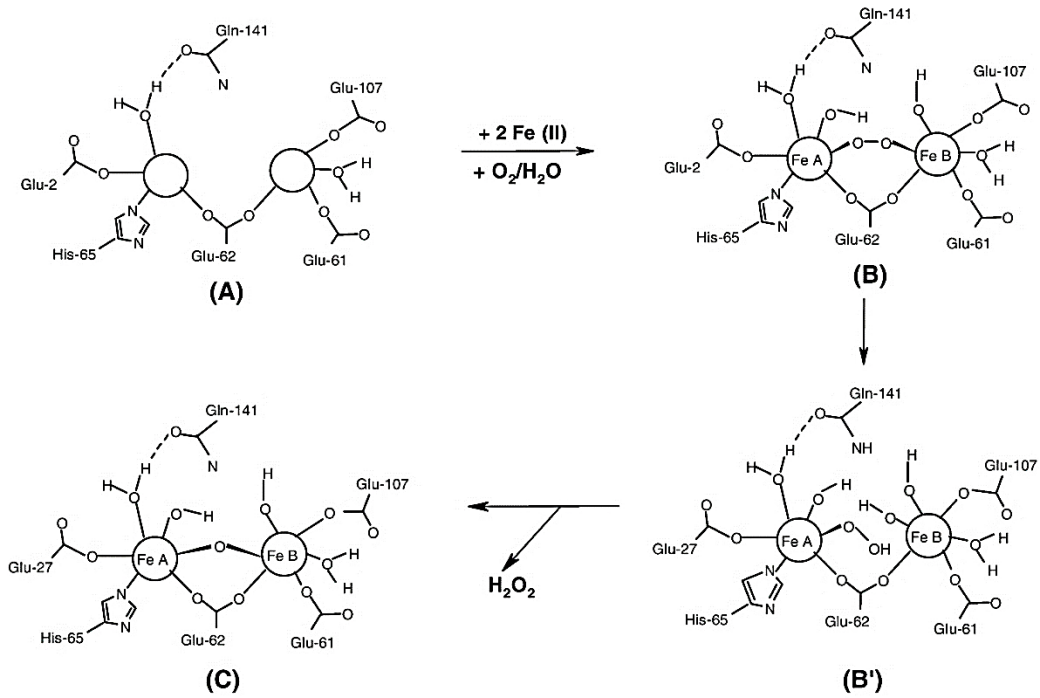


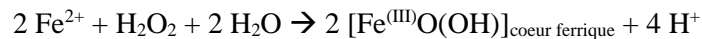
Figure 40 : Intermédiaires de réaction du centre de la ferroxidase dans la sous-unité H de la ferritine. (A) apoprotéine : sites de ferroxidase non occupés par le Fe(II), (B) oxydation des Fe(II) et formation d'un intermédiaire μ -peroxydiferrique, (B') formation d'un intermédiaire μ -hydroperoxydiferrique, et (C) formation d'un complexe μ -1,2-oxodiferrique.

Ces complexes sont ensuite dirigés vers les sites de nucléation où la phase cristalline de ferrihydrite du cœur ferrique se formera selon la réaction suivante :



(Bou-Abdallah, 2010; Chasteen et Harrison, 1999)

De plus, la présence de l'ordre de 100 à 500 atomes de Fe(II) par protéine entraîne la consommation d'une partie du peroxyde d'hydrogène produit au centre de ferroxidase dans la réaction d'oxydation du Fe(II) suivante :



(Bou-Abdallah, 2010; Zhao et al., 2003)

Enfin, lorsque la quantité de Fe(II) est supérieure à celle nécessaire pour remplir les centres de la ferroxidase (< 800 atomes de Fe(II) par protéine) une réaction d'auto-oxydation catalysée par la surface croissante du cœur ferrique devient le mécanisme dominant, selon la réaction suivante :



(Bou-Abdallah, 2010; Zhao et al., 2003)

La simulation par dynamique moléculaire du nanocluster d'oxohydroxodiferrique a confirmé que le cluster est en contact avec des résidus de Glu et Asp chargés négativement, mais aussi avec des groupements Lys et Arg chargés positivement et un groupement His électriquement neutre selon le type de ferritine ou de sous-unité (Lid, Carmona, Maas, Treccani et Colombi Ciacchi, 2018; Masuda et al., 2018), les sous-unités L étant plus efficaces pour promouvoir la nucléation que les sous unités H (Chasteen et Harrison, 1999).

La compréhension des processus par lesquels le noyau de fer minéral est déposé dans les ferritines a constitué un axe de recherche majeur au cours des quarante dernières années. La majorité des travaux ont porté sur les ferritines des eucaryotes. La nucléation de la ferrihydrite se produit sur la surface interne de la cavité protéique. Il a été montré que la minéralisation est catalysée par la surface disponible du noyau qui contrôle donc la cinétique de l'oxydation du Fe(II) dans les sites de ferroxidation (Le Brun et al., 2010). Cependant la naissance de ce cœur ferrique est encore inconnue bien que des propositions de mécanismes purement théoriques soient avancées (Le Brun et al., 2010; Lewin, Moore et Le Brun, 2005).

Ces données structurales sur les différentes étapes d'internalisation du Fe(II) par la ferritine jusqu'au stockage sous forme de phase cristalline de ferrihydrite sont importantes. Elles seront utiles pour mieux comprendre les mécanismes d'interactions des An(IV) avec la protéine.

II. Mise en évidence et caractérisation de l'interaction entre les An(IV) et la ferritine de la rate de cheval

1. Caractérisation de la ferritine utilisée

Pour notre travail, la protéine utilisée est la ferritine de rate de cheval. Cette ferritine est composée à 90% de la sous-unité L et à 10% de la sous-unité H. La séquence de chacune des deux sous-unités est en Annexe D. Cette protéine a été mise en solution dans un milieu tamponné composé d'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) et de NaCl de concentration 50mM – 150 mM respectivement, à un pH similaire au pH physiologique (~7,4). Après avoir subi une dialyse, qui consiste à éliminer les substances conservatrices, la protéine a pu être utilisée pour mener à bien les études d'interaction avec les actinides(IV).

Le fer contenu dans la ferritine a été dosé par Tandem Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS/MS). La quantité d'atomes de fer présents initialement dans la protéine est de 517 ± 26 ce qui représente environ 11% de sa capacité de stockage maximale. La ferritine utilisée étant composée à 90% de sous-unités L, ce fer serait donc contenu majoritairement dans le cœur ferrique, qui peut contenir jusqu'à environ 1800-2000 atomes de fer (Chasteen et Harrison, 1999; Jutz et al., 2015; Pan et al., 2009).

L'état d'oxydation du fer contenu dans la ferritine a été analysée par X-ray Absorption Near Edge Structure (XANES) au seuil K du fer. Cette étude nous a permis d'amener un premier élément de réponse quant à la localisation du fer. La Figure 41a illustre la comparaison des références de Fe(II), stabilisé dans l'acide ascorbique, et Fe(III), en conditions acides, avec la ferritine notée stock-F. Les dérivées de ces spectres, illustrées dans la Figure 41b, permettent une comparaison plus précise de leur forme.

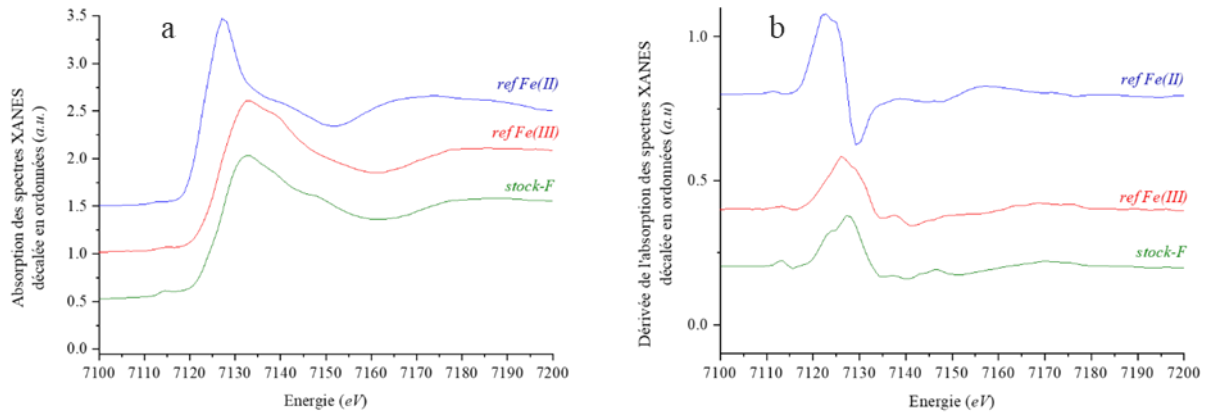


Figure 41ab : Comparaison des spectres XANES (a) et leurs dérivées (b) au seuil K du Fe (énergie du seuil K du Fe : 7112 eV). Les spectres XANES d'une référence Fe(II) (aquo Fe(II) stabilisé dans l'acide ascorbique ; ligne bleue) et d'une référence Fe(III) (aquo Fe(III) en conditions acides ; ligne rouge) sont comparés avec un spectre XANES de la ferritine, notée stock-F, en milieu tamponné et à pH physiologique (ligne verte).

Le spectre XANES de référence du Fe(II) présente un maximum du seuil à 7127 eV tandis que celui du Fe(III) est à 7133 eV et possède également un faible pré-seuil à 7115 eV. Le spectre de la ferritine présente également un maximum du seuil à 7133 eV et un pré-seuil similaire au Fe(III). De plus, leurs dérivées sont très semblables ce qui signifie que la protéine semble contenir majoritairement du Fe(III).

Pour aller plus loin dans l'interprétation de ces données, une combinaison linéaire a été réalisée en utilisant les dérivées des spectres XANES des références du Fe(II) et du Fe(III) pour ajuster la dérivée du spectre XANES de la ferritine (Figure 42). Pour ce faire, des poids x et y , compris entre 0 et 1 et de somme fixée à 1, ont été appliqués aux dérivées des spectres Fe(II) et Fe(III) respectivement lors de cette combinaison linéaire.

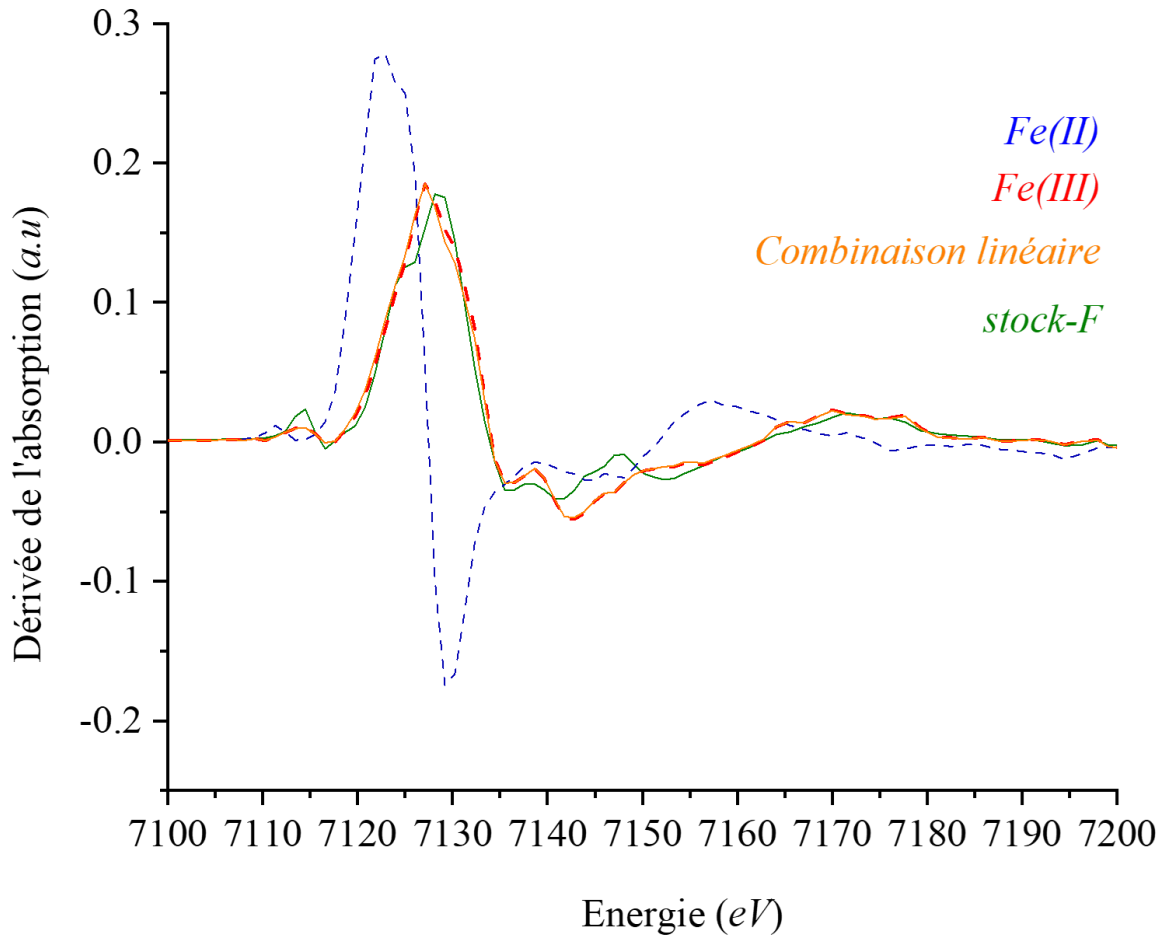


Figure 42 : Combinaison linéaire des dérivées des spectres de référence du Fe(II) et Fe(III) et comparaison avec la dérivée du spectre de la ferritine, nommé stock F

Le poids x associé à la dérivée du spectre du Fe (II) est de 0 tandis que le poids y associé à celle du Fe(III) est de 1. Ce résultat confirme que le fer contenu dans la ferritine commerciale est bien du Fe(III) et est donc principalement localisé au niveau du cœur ferrique.

Cette première approche a permis de quantifier, par ICP-MS/MS, le fer présent dans la protéine et de le localiser. Un schéma très simplifié de notre ferritine, notée stock-F, est donné en Figure 43 reprenant ces premiers résultats. Tout au long de ce chapitre, ce schéma sera complété par les différents résultats obtenus sur l'interaction de la protéine avec les An(IV).

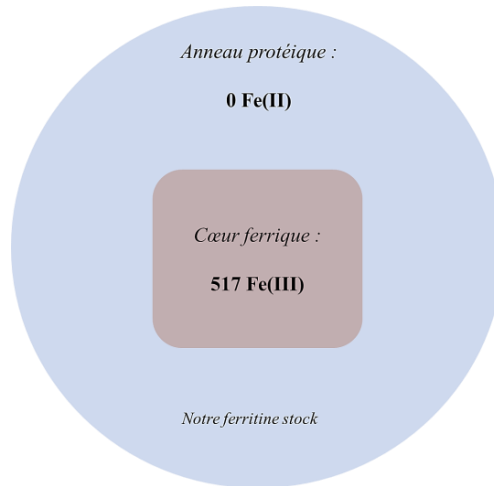


Figure 43 : Schéma simplifié de stock-F après quantification et localisation du fer

2. Interaction et localisation du Th(IV), approche macroscopique

Rappelons que la ferritine peut accumuler jusqu'à 4500 atomes de fer. Mais est-ce que cette protéine possède la même capacité d'accumulation avec des métaux plus exotiques comme les An(IV) ? Une première étude s'est portée sur la capacité maximale d'accumulation du Th(IV) par la protéine, en tenant compte de la charge en fer contenue initialement dans notre ferritine.

Du Th(IV) sous forme de solution de carbonate $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (décrit dans le chapitre précédent) a été utilisé pour l'élaboration de la courbe de charge de la ferritine. Le Pu(IV) n'a pas pu être utilisé du fait de la complexité technique (radioprotection) de ces mesures avec du Pu. La courbe de charge est un titrage de la protéine avec une quantité croissante de solution de carbonate de thorium (IV) dans un milieu tamponné avec un pH similaire au pH physiologique (~7,4). Les quantités de fer et de thorium ont été dosées par ICP-MS/MS au laboratoire appartenant au Service d'Etudes Analytiques et de Réactivité des Surfaces du CEA Saclay.

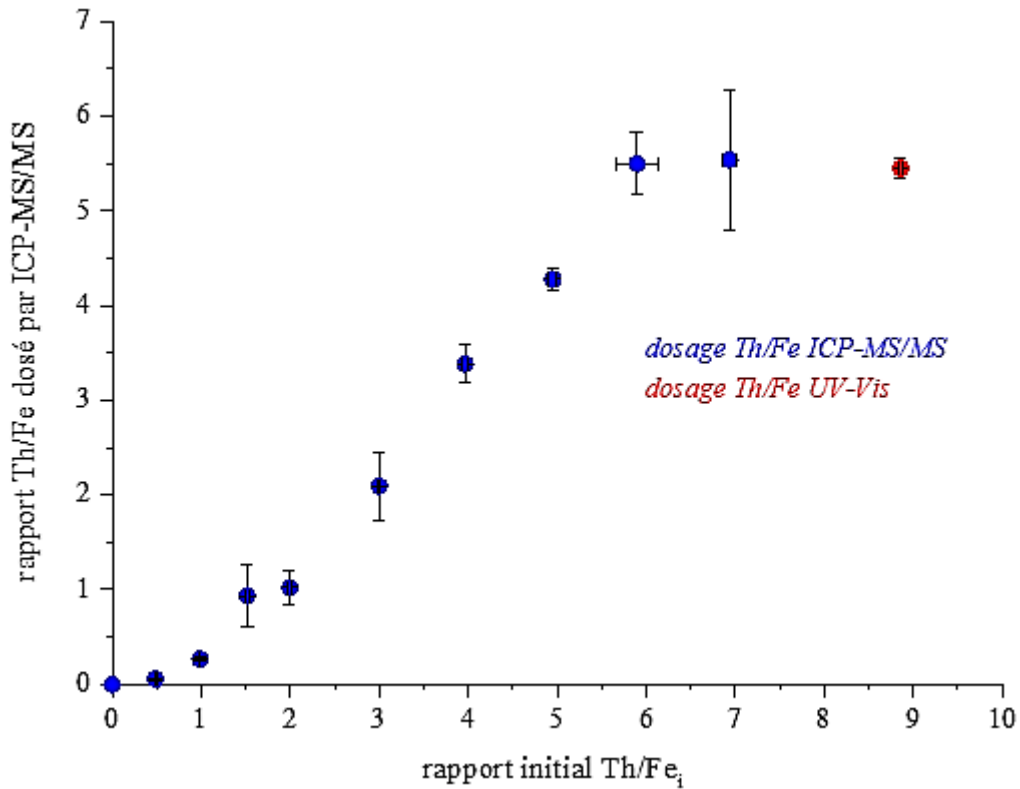


Figure 44 : Courbe de charge de la ferritine en présence d'une solution de carbonate de Th(IV) dans un milieu tampon à pH = 7,4. Les échantillons ont été préparés en triplicata. Valeurs moyennes du rapport Th/Fe obtenues par ICP-MS/MS (points bleus) et par UV-Vis (point rouge). Le dernier point (point rouge) permet de confirmer le plateau de la courbe. Les barres d'erreur en abscisse et en ordonnée correspondent à l'écart-type des valeurs des triplicatas.

La courbe de charge (Figure 44) est exprimée en rapport atomique Th/Fe_i (i = initial) sur l'axe des abscisses et en rapport atomique Th/Fe dosé par ICP-MS/MS sur l'axe des ordonnées. Cette courbe a été réalisée jusqu'à un rapport maximal de Th/Fe = 8,7 ce qui correspond à un rapport F/Th égal à 1/4500. Les précisions sur la préparation des différents échantillons ainsi que les conditions de dosage par ICP-MS/MS sont décrites en Annexe D.

Sur la Figure 44, les points en bleu sont obtenus après dosage par ICP-MS/MS alors que le point rouge est obtenu par un dosage spectrophotométrique UV-Vis. Ce dernier point a été mesuré afin de confirmer le plateau obtenu par le dosage ICP-MS/MS. Dans la première partie, pour un rapport Th/Fe_i compris entre 0 et 5,50, la capacité de la protéine à stocker du Th(IV) augmente quasi-linéairement. Lorsque ce rapport atteint 5,50, un plateau est observé ce qui signifie que les sites de la protéine pouvant interagir avec le Th(IV) sont saturés. Le plateau de cette courbe de charge est atteint avec un rapport Th/Fe = 5,50 ± 0,3.

En considérant la quantité de fer contenue dans la ferritine, après dialyse, soit 517 atomes et en faisant l'hypothèse qu'aucun atome de fer n'est libéré lors de la complexation du Th(IV), le plateau obtenu dans cette courbe de charge d'un rapport Th/Fe = 5,50 ± 0,3 correspond à environ 2840 ± 140 atomes de thorium (IV) liés à une ferritine.

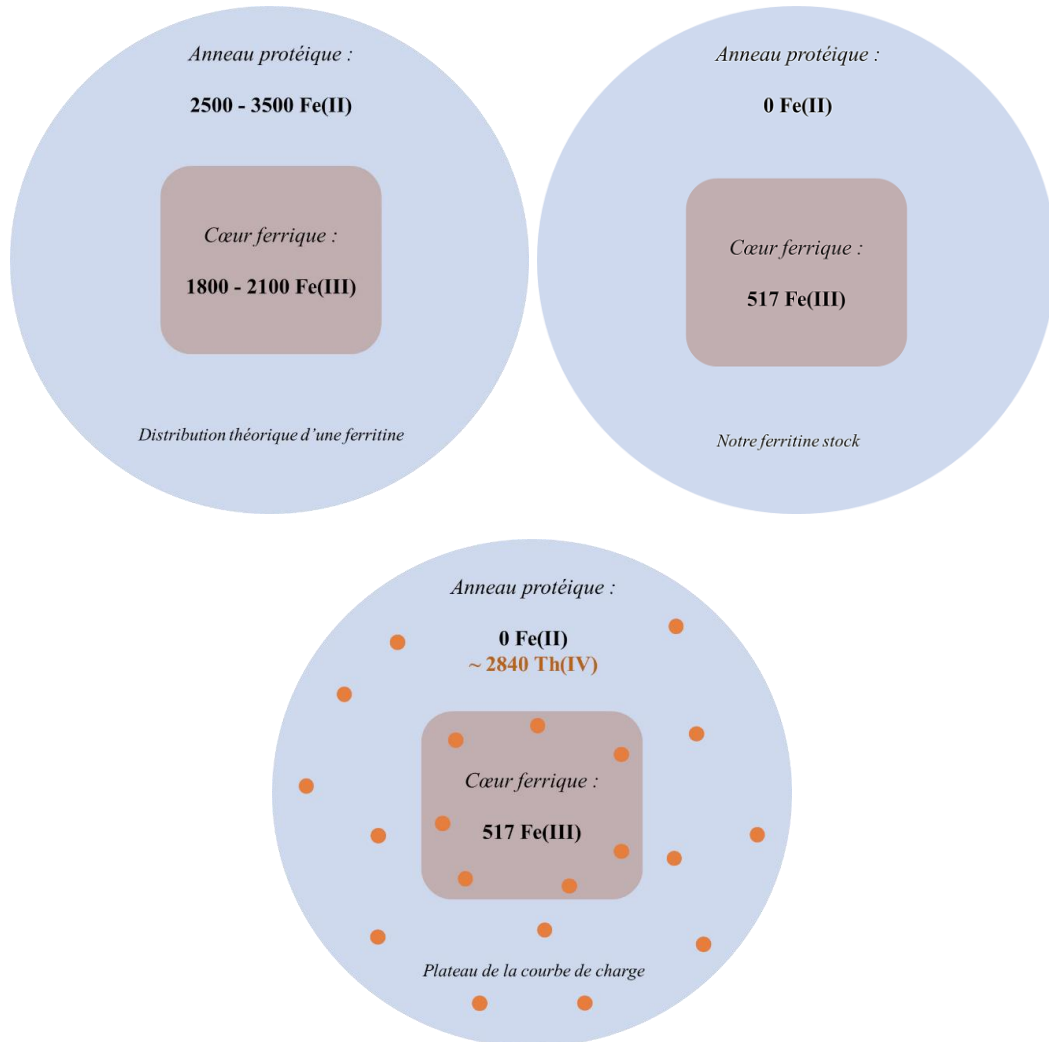


Figure 45 : Comparaison de la quantité théorique compartiments de la ferritine (en haut à gauche) avec la quantité de métal obtenue par dosage ICP-MS/MS dans notre ferritine commerciale avant accumulation (en haut à droite) et après accumulation du Th(IV) (en bas) (les points orange représentent le Th(IV))

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces résultats, cette valeur maximale estimée a été comparée à la proportion de fer contenue dans les différents compartiments de la protéine (Figure 45). Rappelons que la ferritine, dans nos conditions, ne contient que 517 atomes de fer répartis majoritairement au niveau du cœur ferrique alors que la capacité maximale moyenne d'accumulation de ce dernier est de 1500 ± 300 atomes de fer (Jutz et al., 2015; Pan et al., 2009). Par ailleurs, la coquille protéique de la ferritine peut stocker entre 2500-3500 atomes de fer (Pan et al., 2009). Dans ces conditions, notre hypothèse est que le thorium interagit uniquement avec la coquille de la protéine. En effet, si le thorium était en

interaction avec le cœur ferrique en plus de la coquille protéique, le plateau obtenu sur la courbe de charge (Figure 44) serait sans doute plus élevé.

Maity et ses collaborateurs ont étudié les interactions entre la ferritine de la rate de cheval avec du Pd(II) (Maity et al., 2019). L'auteur observe que les atomes de Pd(II) se lient majoritairement à la surface extérieure de la coquille protéique (Maity et al., 2019). Nos données appuient l'hypothèse selon laquelle le Th(IV), comme le Pd(II), interagirait préférentiellement avec la coquille protéique plutôt qu'avec le cœur ferrique.

Afin de confirmer la localisation du thorium dans la ferritine, des analyses par XANES au seuil K du fer ont été réalisées (Figure 46ab).

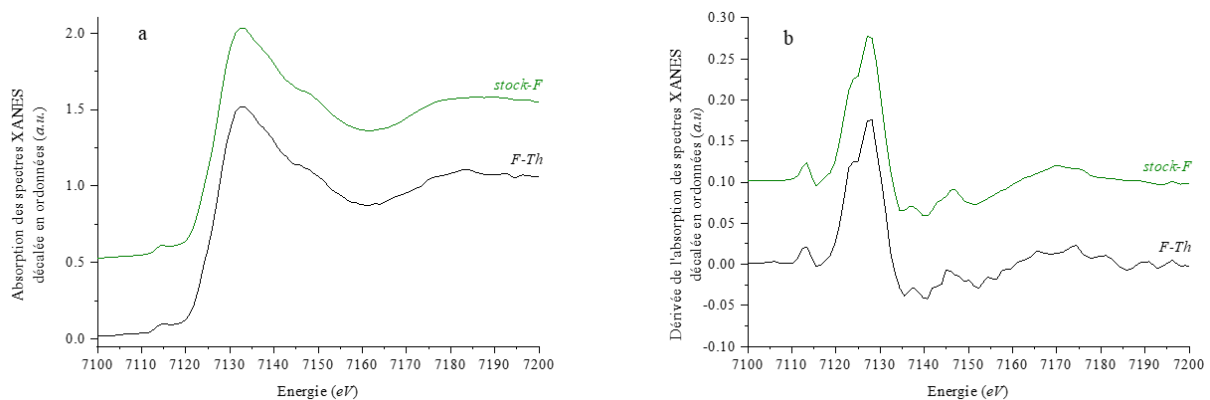


Figure 46ab : Comparaison des spectres XANES (a) et leurs dérivées (b) au seuil K du Fe (énergie du seuil K du Fe : 7112 eV) d'un spectre du complexe F-Th en milieu tamponné et à pH physiologique avec un rapport Th/Fe = 3,3 (ligne noire) et de notre ferritine stock (ligne verte)

La Figure 46a illustre la comparaison du spectre XANES d'une ferritine complexée avec le thorium avec un rapport Th/Fe = 3,3 (Figure 44), noté F-Th, avec le spectre XANES de notre ferritine stock avant complexation et la Figure 46b compare leurs dérivées. Les spectres de ces deux échantillons présentent une similarité qui suggère que le thorium n'interagit pas de façon significative avec le fer pour observer une modification du signal.

Une modification claire du XANES impliquerait que la plupart des environnements du fer seraient affectés par la densité électronique des atomes de Th(IV). Or, le rapport Th/Fe du complexe F-Th est de 3,3, ce qui signifie qu'il y a une quantité importante de Th complexé à la protéine. On peut donc penser que la majorité des atomes de Th sont situés loin du cœur ferrique (c'est-à-dire supérieur à 4-5 Å du point de vue XANES).

Cette donnée conforte donc notre hypothèse : le thorium semble être localisé exclusivement sur la coquille protéique (Figure 47).

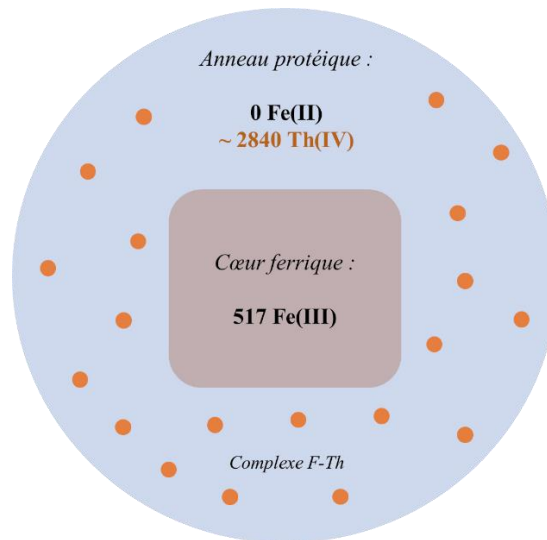


Figure 47 : Schéma simplifié de notre ferritine complexée par le Th(IV) après la quantification et hypothèse sur la localisation du Th(IV) (les boules orange représentent le Th(IV))

3. Première approche de l'interaction des An(IV) avec la ferritine par IRTF

Après avoir mis en évidence l'interaction entre le thorium (IV) et la ferritine probablement au niveau de la coquille protéique, une analyse du complexe par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) en mode réflexion totale atténuée a été menée afin de mieux définir la nature des groupements impliqués dans l'interaction avec le Th(IV) une fois ce dernier complexé à la protéine.

Les spectres infrarouges des protéines sont complexes et difficiles à interpréter. Dans la région située entre 1800 et 500 cm^{-1} , ils sont très largement dominés par les bandes de vibration associées au squelette de la protéine : la bande amide I centrée autour de 1650 cm^{-1} majoritairement associée à la vibration $\nu(\text{CO})$ et la bande amide II à 1550 cm^{-1} associée aux vibrations $\delta(\text{NH})$ et $\nu(\text{CN})$. Les bandes d'absorption des chaînes latérales des acides aminés sont beaucoup moins intenses et donc plus difficiles à exploiter. Toutefois, l'analyse des spectres des protéines peut apporter de précieuses informations concernant :

- la nature des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réactivité des protéines comme la complexation des cations métalliques (Barth et Zscherp, 2002).
- la nature de modifications structurales et plus particulièrement de la structure secondaire des protéines (confère Chapitre 1) en analysant la bande amide I (Duca, Anghel et Erhan, 2018).

Sur la Figure 48, le spectre noir correspond à la ferritine seule, noté stock-F, et le spectre rouge correspond au complexe F-Th obtenu avec un rapport Th/Fe de 5,9, soit quasiment à la saturation de la ferritine observée sur la courbe de charge de la protéine (Figure 44).

Les spectres IR stock-F et F-Th ont été analysés dans les mêmes conditions (pH, concentration, milieu tampon). Les spectres IR stock-F et F-Th présentent les bandes amides I et II centrées respectivement à 1651 cm^{-1} et 1549 cm^{-1} respectivement.

Ces spectres ont été normalisés sur la bande amide I à 1651 cm^{-1} (la structure de la ferritine n'étant pas affectée par la complexation avec les métaux) afin de calculer un spectre de différence (vert) qui permet de visualiser plus précisément les variations entre ces deux spectres. Les pointillés visibles sur le spectre de différence représentent une variation nulle. Enfin, le spectre de la solution de référence de carbonate de Th(IV), en bleu, a également été enregistré.

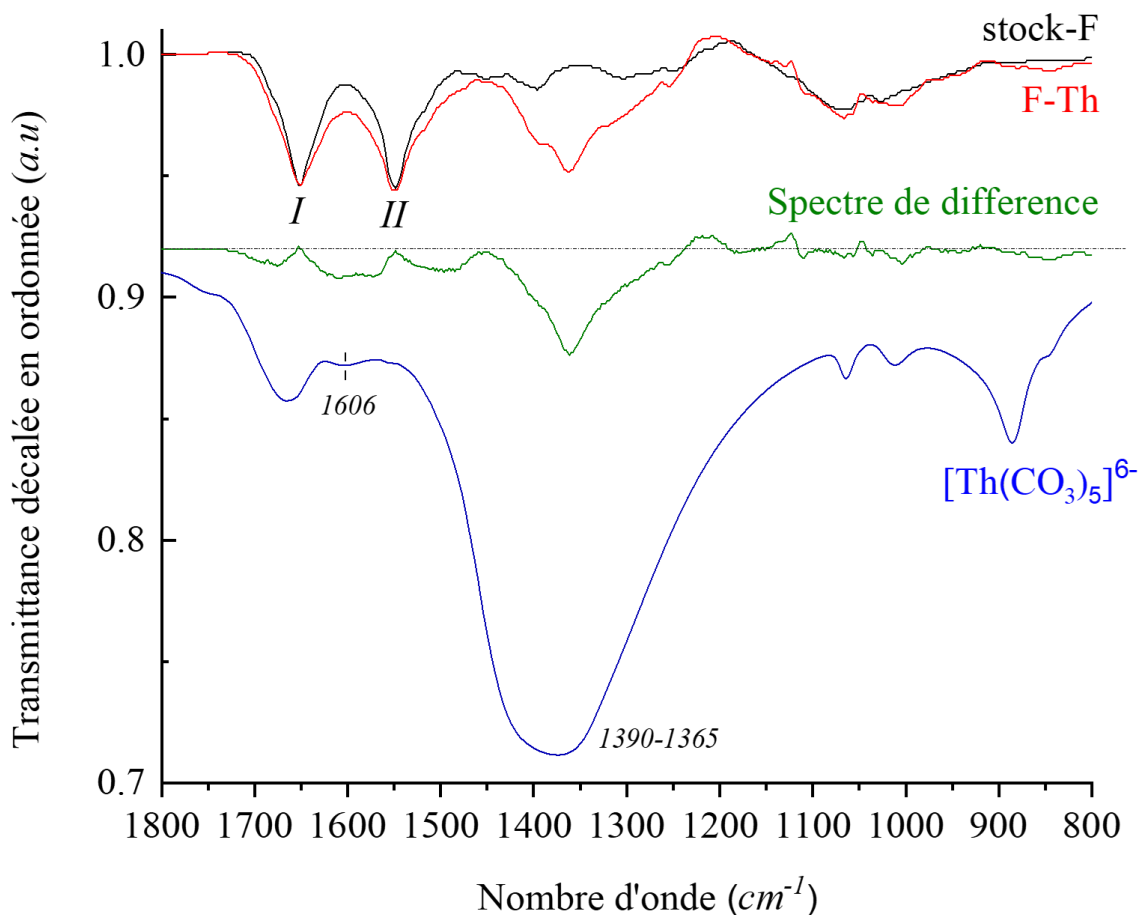


Figure 48 : Spectres infrarouges : spectre de référence de $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (ligne bleue) ; spectre de la ferritine stock (stock-F, ligne noire) et complexe F-Th avec rapport Th/Fe = 5,9/1 (ligne rouge). Les spectres de la ferritine stock-F et du complexe F-Th ont été normalisés en transmittance par rapport à la bande caractéristique de l'amide I (1650 cm^{-1}). Le spectre de différence = {stock-F - F-Th} est également représenté (ligne verte). Les pointillés correspondent à une différence nulle.

Le spectre de la solution de carbonate de Th(IV) présente des bandes symétriques et antisymétriques des carbonates ν_3 à 1606 cm^{-1} et 1390 cm^{-1} respectivement (Nakamoto, 2009) caractéristiques d'une interaction bidente des carbonates avec le thorium (Hiemstra, Rahnemaie et van Riemsdijk, 2004; Jolivet et Taravel, 1982). Ces données sont en accord avec la caractérisation par spectrophotométrie UV-visible des solutions de carbonate d'actinide (IV) présentée dans le chapitre précédent.

Le spectre F-Th présente une bande intense et large centrée à 1362 cm^{-1} que l'on retrouve clairement sur le spectre de différence. Cette bande est attribuable à la bande antisymétrique ν_3 du carbonate mais il est également possible de retrouver dans cette contribution les modes $\nu_3(\text{COO}^-)$ des fonctions carboxylates de certains acides aminés (aspartate et glutamate respectivement centrés à 1402 et 1404 cm^{-1} par exemple) qui pourraient être impliqués dans la coordination du thorium.

Il semble donc que l'environnement du thorium lié à la ferritine soit composé de carbonates provenant de solution de référence de carbonate mais également de fonctions carboxylate provenant des acides aminés qui composent la coquille protéique de la ferritine. On peut donc à nouveau supposer, comme illustré en Figure 47, que le Th(IV) est entouré de fonctions carboxylates et donc localisé majoritairement sur la coquille protéique.

4. Étude de l'interaction du Pu(IV) avec la ferritine par UV-Visible

L'évolution du complexe Pu(IV)-ferritine, noté F-Pu, en fonction du carbonate libre en solution a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible. Sur la Figure 49, les spectres UV-Visible du complexe carbonate de Pu(IV) et du complexe F-Pu sont comparés.

Le spectre de la référence de carbonate de plutonium présente une bande caractéristique à 486 nm , en accord avec la littérature, avec un coefficient d'extinction $\epsilon = 66\text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (Capdevila et al., 1996). Le spectre du complexe F-Pu (Pu/Fe = 5,4) a été enregistré 24 heures après la réalisation de l'échantillon dans un milieu tamponné à pH physiologique. Ce spectre présente une diminution drastique de l'absorbance entre 480 nm et 490 nm et une division de la bande centrée à 486 nm en deux bandes distinctes à 484 et 487 nm .

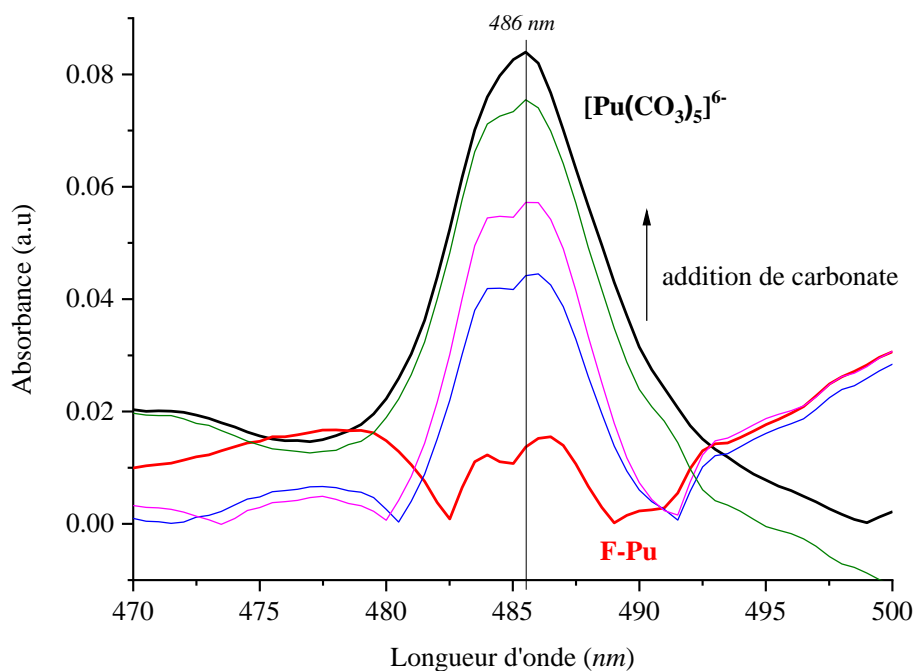


Figure 49 : Spectrophotométrie du complexe F-Pu et addition successive de carbonate. Spectre rouge : complexe F-Pu avec rapport Pu/Fe = 5,4 ; Spectre noir : $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$; Spectre bleu : après ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 30 minutes ; Spectre rose : après un autre ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 30 minutes ; Spectre vert : après un autre ajout de 50 μL de carbonate 3 M et un délai de 72 heures.

On effectue ensuite 3 ajouts successifs de faibles volumes d'une solution concentrée en carbonates dans la solution du complexe F-Pu, jusqu'à l'obtention d'un rapport $\text{Pu}/\text{CO}_3^{2-}$ de 1/3000. Chaque spectre UV est enregistré 30 min après l'ajout de la solution de carbonates dans le milieu. On observe alors une modification de la double bande à 484 et 487 nm qui évolue vers une bande unique attribuée au complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$. En présence d'un excès de carbonate, le complexe F-Pu conduit à la formation de l'espèce penta-carbonate de Pu(IV).

Dans la littérature, les constantes de formation des complexes Th(IV)-groupes carboxylates varient entre 4 et 12 ($\log\beta$) selon la structure du complexe (L. Rao, Zanonato et Di Bernardo, 2005) alors que pour Pu, les constantes varient entre 8 et 17 (Thakur, Pathak et Choppin, 2009). La constante de formation globale des complexes $[\text{An}^{\text{IV}}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ est de l'ordre de 35 selon le métal étudié ($\log\beta$) (Clark, Hobart et Neu, 1995; Neck et Kim, 2000).

Le rapport des constantes est donc :

$$\frac{\beta_5^0}{\beta_{\text{carbox}}} = \frac{10^{35}}{10^{12}} = 10^{23}$$

Le rapport des constantes indique que lors de l'ajout de carbonate dans le milieu, le Pu(IV) tend à interagir davantage avec ce ligand et donc une décomplexation de la ferritine peut être observée. Le titrage réalisé par spectroscopie UV-Visible (Figure 49) indique que pour un ajout total de carbonate correspondant à un rapport final Pu/CO₃²⁻ de 1/3000, l'équilibre semble tendre vers la formation du complexe [Pu(CO₃)₅]⁶⁻, ce qui est en accord avec le rapport des constantes précédent.

Si nous considérons que les 2840 sites d'interaction F-Th(IV) ne sont composés que d'un seul groupement carboxylate, il faudrait un rapport minimal CO₃²⁻/groupement carboxylate de 1,05/1 environ pour déplacer l'équilibre vers la formation du complexe [Pu(CO₃)₅]⁶⁻.

Il faut toutefois émettre une réserve car la structure des sites d'interaction, qui semble stabiliser fortement le Pu(IV), ne rentre pas dans la simple comparaison des constantes de complexation. De plus, si nous considérons la capacité d'accumulation de la ferritine pour le Pu(IV) identique à celle observée pour le Th(IV), la courbe de charge (Figure 44) indique environ 2840 sites de complexation par ferritine. Or ces sites sont composés par un ou plusieurs groupes carboxylates ce qui augmente leur force d'interaction avec le Pu.

5. Détermination de l'environnement local du Th(IV) et du Pu(IV) liés à la ferritine

a) Quels sont les ligands qui interagissent avec le Th(IV) et le Pu(IV) ?

Approche par modélisation

Les analyses par spectroscopies UV-Visible et Infrarouge ont permis d'identifier qualitativement l'environnement des actinides (IV) complexés à la ferritine.

Un modèle macromoléculaire a été établi par Dynamique Moléculaire (MD), par le Pr. Tsushima de l'Université de Technologie de Tokyo, afin d'identifier les acides aminés impliqués dans cette interaction. Les données issues du calcul moléculaire ont ensuite été associées aux données obtenues par XAS.

Pour établir ce modèle, la structure cristalline de la sous-unité L de la ferritine de la rate de cheval PDB 1 AEW a été utilisée (Hempstead, 1997). Au sein de cette structure, six atomes de cadmium (II) sont initialement présents et interagissent avec la protéine. De plus, des carbonates (CO₃²⁻) ainsi que du sodium (Na⁺) ont été ajoutés pour mimer les concentrations expérimentales en carbonate et pour neutraliser les charges.

Deux simulations A et B ont été effectuées. Dans la simulation A, qui est une simulation de référence, les six atomes de Cd(II) présents dans la structure de la sous-unité L ont été remplacés par six atomes de Pu(IV). Dans la simulation B, qui est la simulation la plus réaliste, les atomes de Cd(II) ont été retirés de la structure et une distribution aléatoire de six atomes de Pu(IV) a été réalisée. L'évolution dans le temps de l'écart quadratique moyen des positions atomiques des simulations A et B est représentée dans la Figure 50.

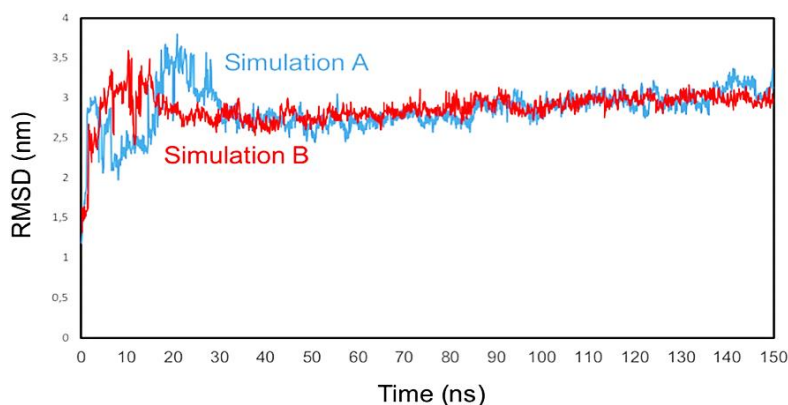


Figure 50 : Évolution dans le temps de l'écart quadratique moyen des positions atomiques RMSD (à l'exclusion des molécules d'eau, du carbonate et des ions sodium) des simulations A et B par calcul en dynamique moléculaire.

L'écart quadratique moyen, noté RMSD, est la mesure de la distance moyenne entre les atomes du squelette des protéines superposées. Dans notre cas, la superposition est réalisée entre notre simulation et le modèle de la PDB : 1AEW. Dès 150 ns, les deux simulations possèdent des stabilités identiques. Les deux structures A et B sont représentées sur la Figure 51.

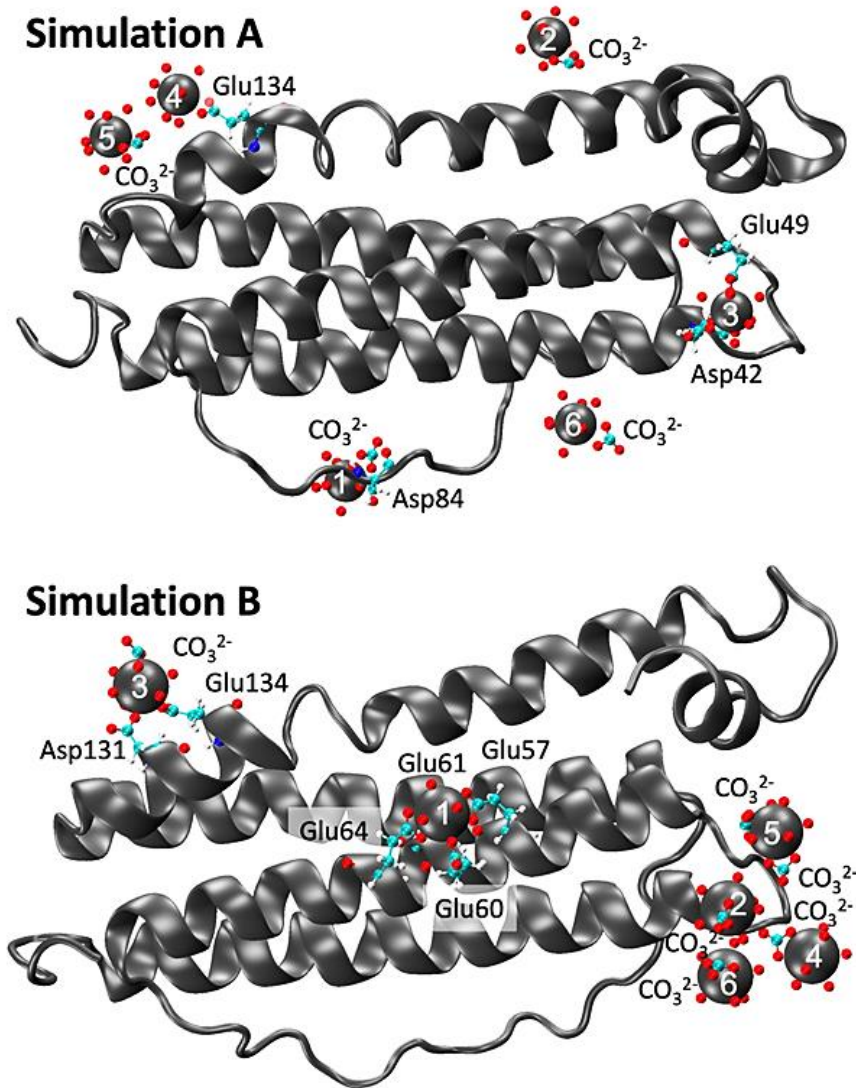


Figure 51 : Simulations par calcul en dynamique moléculaire du complexe F-Pu. Le ruban foncé et les boules foncées représentent les atomes de protéine et de Pu(IV), respectivement. Les résidus protéiques, les carbonates et les molécules d'eau associés aux atomes de plutonium sont représentés sous forme de boules et de bâtons. Les atomes d'hydrogène de l'eau ont été omis pour plus de clarté. Chaque site contenant un atome de Pu(IV) est numéroté dans chaque simulation.

Dans les deux simulations on observe une interaction du Pu(IV) avec les acides aminés de la sous-unité L. Des molécules d'eau et des groupes carbonate peuvent compléter la sphère de coordination. Il est intéressant de constater que dans les deux simulations, les groupements carboxylates des acides aminés en interaction avec le plutonium proviennent uniquement des aspartates ou des glutamates. Les atomes de plutonium qui ne sont pas en interaction avec la protéine forment des complexes aquo-carbonate. Les deux simulations A et B étant proches, la suite de notre discussion se concentrera sur la simulation B qui est plus représentative de nos conditions expérimentales.

La description de l'environnement local de chaque atome de Pu(IV) dans la simulation B est reportée dans le Tableau 12 ci-dessous. Les structures des différents sites de complexation du Pu sont répertoriées en Annexe D.

Tableau 12 : Environnement local (nombre, type de ligand ou acide aminé de la protéine) de chaque site de complexation du Pu(IV) de la simulation B calculée par MD. Les numéros font référence à la Figure 51.

Site du plutonium	Environnement local
<i>Pu1</i>	4 Glu, 3 Eau
<i>Pu2</i>	1 Carbonate, 8 Eau
<i>Pu3</i>	1 Asp, 1 Glu, 1 Carbonate, 6 Eau
<i>Pu4</i>	1 Carbonate, 8 Eau
<i>Pu5</i>	2 Carbonate, 6 Eau
<i>Pu6</i>	1 Carbonate, 8 Eau

Seuls les atomes de Pu 1 et 3, notés Pu1 et Pu3 respectivement, interagissent avec les acides aminés de la protéine. Le Pu1 est en interaction avec les acides aminés Glu64, Glu61, Glu60 et Glu57 qui interviennent également dans le site de nucléation du Fe(III) naturel (Maity et al., 2019; Pozzi et al., 2017). La distribution des distances pour chaque type de voisin (eau, carbonate, acides aminés) par rapport à l'atome de Pu ont été représentées sur la Figure 52.

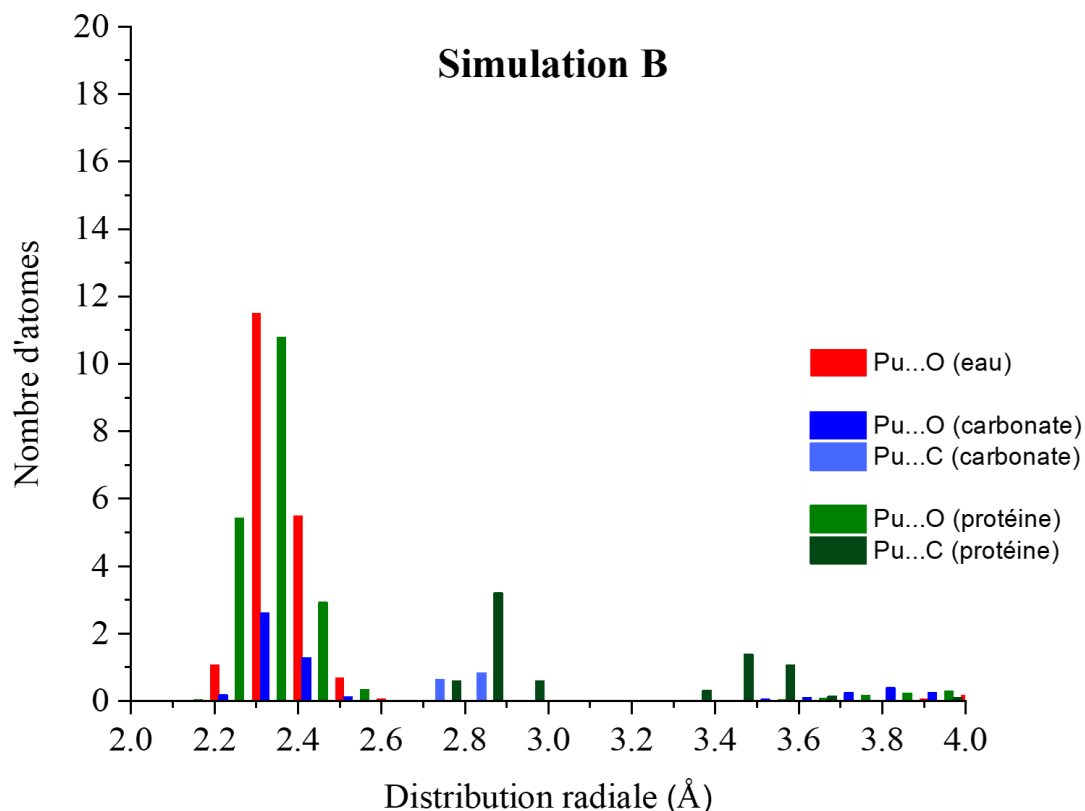


Figure 52 : Somme des distributions radiales pour chaque type de voisin pour les six atomes de plutonium de la simulation B. Chaque barre verticale correspond au nombre de voisins situés à la même distance avec un incrément de 0,05 Å.

La fonction de distribution radiale discrète présente des distances moyennées par type d'interaction pour les six sites de Pu. La Figure 52 indique par exemple que le nombre d'oxygènes des molécules d'eau en interaction avec le Pu est similaire au nombre d'oxygènes des acides aminés. De plus, les atomes de carbone des acides aminés possèdent deux distances Pu...C distinctes centrées à 2,9 Å et 3,5 Å. La distance Pu...C des atomes de carbone des carbonates est légèrement plus courte à environ 2,7 Å. Chaque sphère de coordination de chaque Pu a été isolée et représentée en Annexe D.

Les distances Pu...X de chaque Pu sont regroupés dans le Tableau 13. Les distances sont comparées aux distances du complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ décrites dans le Chapitre 2 et également reportées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Distances Pu-O et Pu-C obtenues par dynamique moléculaire pour le complexe F-Pu pour la simulation B. Les données EXAFS des distances du complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ sont comparées aux données des sites d'interaction.

	Distance des couches Pu...O (Å)				Distance des couches Pu...C (Å)		
	<i>Pu...O</i> (eau)	<i>Pu...O</i> (acide aminé) <i>monodente / bidente</i>	<i>Pu...O</i> (carbonate)	<i>Pu...O</i> moyenne	<i>Pu...C</i> (acide aminé) <i>monodente / bidente</i>	<i>Pu...C</i> (carbonate)	<i>Pu...C</i> moyenne
EXAFS							
$[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$	2,44(2)						2,88(1)
Site d'interaction							
<i>Pu1</i>	2,31	2,28 / 2,34	-	2,33	3,50 / 2,84	-	3,01
<i>Pu2</i>	2,40	-	2,37	2,40	-	2,80	2,80
<i>Pu3</i>	2,39	- / 2,38	2,31	2,37	3,57 / -	2,76	3,30
<i>Pu4</i>	2,40	-	2,38	2,40	-	2,82	2,82
<i>Pu5</i>	2,40	-	2,35	2,38	-	2,76	2,76
<i>Pu6</i>	2,40	-	2,38	2,40	-	2,79	2,79
<i>Sim</i> <i>moyennne</i>	2,38				2,81/ 3,48		

Pour chaque site, les carbonates sont en interaction bidente et les acides aminés présentent quant à eux, les deux types de coordination, monodente et bidente. Des molécules d'eau complètent la sphère de coordination des Pu.

Les complexes aquo-carbonates des sites Pu2, Pu4, Pu5 et Pu6 présentent des distances Pu...O comprises entre 2,38 Å et 2,40 Å et des distances Pu...C comprises entre 2,76 Å et 2,82 Å. Ces distances sont plus courtes que les distances pour le complexe $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ obtenues par EXAFS. Ce rapprochement peut être induit par la présence des acides aminés de la protéine, à partir de 4,2 Å, occasionnant une gêne stérique qui entraîne cette diminution et qui maintient le Pu proche de la protéine.

Pour les sites Pu1 et Pu3, une différence notable est observée au niveau des distances Pu...O et Pu...C des groupements carboxylates des acides aminés. Bien qu'une discrimination soit difficile en comparant les distances Pu...O des acides aminés, elle devient possible lorsqu'on compare la distance Pu...C. Lors d'une interaction monodente, la distance mesurée est d'environ 3,53 Å alors que dans le cas d'une interaction bidente, la distance n'est que de 2,84 Å.

Enfin, les distances des oxygènes provenant des molécules d'eau dans tous les sites d'interaction sont comprises entre 2,31 Å et 2,40 Å.

Des calculs utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont été réalisés, par le Pr. Tsushima de l'Université de Technologie de Tokyo, sur les complexes Th(IV)-aspartate et Th(IV)-glutamate. Les distances Th...X obtenues sont regroupées dans le Tableau 14. Les structures de ces modèles sont répertoriées en Annexe D.

Tableau 14 : Distances obtenues par les calculs DFT sur les complexes de Th(IV) avec les acides aminés Asp et Glu (les modèles incluent également des molécules d'eau afin de compléter les sphères de coordination du métal).

Modèles	Distance des couches Th...O (Å)				Distance des couches Th...C (Å)		
	<i>Th...O</i> (eau)	<i>Th...O</i> (acide aminé)	<i>Th-O</i> (carbonate)	<i>Th-O</i> moyenne	<i>Th...C</i> (acide aminé)	<i>Th...C</i> (carbonate)	<i>Th...C</i> moyenne
Th1 Asp bidente	2,56	2,62	-	2,57	3,03	-	3,03
Th2 Asp monodente	2,55	2,28	-	2,52	3,56	-	3,56
Th3 Glu bidente)	2,54	2,61	-	2,56	3,06	-	3,06
Th4 Glu monodente	2,57	2,38	-	2,56	3,56	-	3,56

Les distances calculées par DFT confirment les observations obtenues par MD avec le Pu(IV) dans le paragraphe précédent. Les distances Th...X sont distinctes entre les modes d'interaction des acides aminés. Pour une interaction monodente homogène (Th2 et Th4), les distances moyennes Th...O et

Th...C de l'acide aminé sont d'environ 2,33 Å et 3,56 Å respectivement. Pour une interaction bidente (Th1 et Th3), les distances moyennes Th...O et Th...C sont d'environ 2,61 Å et 3,05 Å respectivement. Enfin, la distance Th...O des atomes d'oxygène des molécules d'eau est constante.

Les distances An(IV)...X, (An = Th, Pu), obtenues par MD et par DFT permettent donc de préciser le mode d'interaction des groupements carboxylates des acides aminés de la protéine. La distance An(IV)...O est plus courte dans une interaction monodente et est associée à une plus grande distance An(IV)...C que pour une interaction bidente. Ces données seront, dans la partie suivante, confrontées aux résultats obtenus en EXAFS.

b) Étude de l'environnement proche du Pu(IV) complexé à la ferritine dans la simulation B - Approche par spectroscopie EXAFS

L'environnement local du Pu(IV) complexé à la protéine, noté F-Pu, a été sondé par spectroscopie EXAFS au seuil L_{III} du plutonium (18 057eV). L'objectif de ces mesures est de préciser l'environnement local du Pu dans la protéine et de préciser la nature des sites de complexation en combinant notamment les mesures EXAFS avec les modèles de MD.

Il est important de noter que les spectres EXAFS expérimentaux mesurés sont une moyenne de tous les environnements des Pu(IV) présents dans l'échantillon. Afin de mieux comprendre la répartition des environnements, il est donc crucial de comparer le spectre EXAFS calculé de chaque site de Pu(IV) issu de la modélisation avec le signal EXAFS expérimental.

Le spectre EXAFS a été calculé pour chaque site et représenté dans la Figure 53. Ces spectres théoriques ont été calculés avec le code Feff9. La moyenne des six spectres EXAFS calculés de la simulation B, noté F-Pu $simB$ a également été effectuée. Ils sont comparés au spectre EXAFS expérimental du complexe F-Pu.

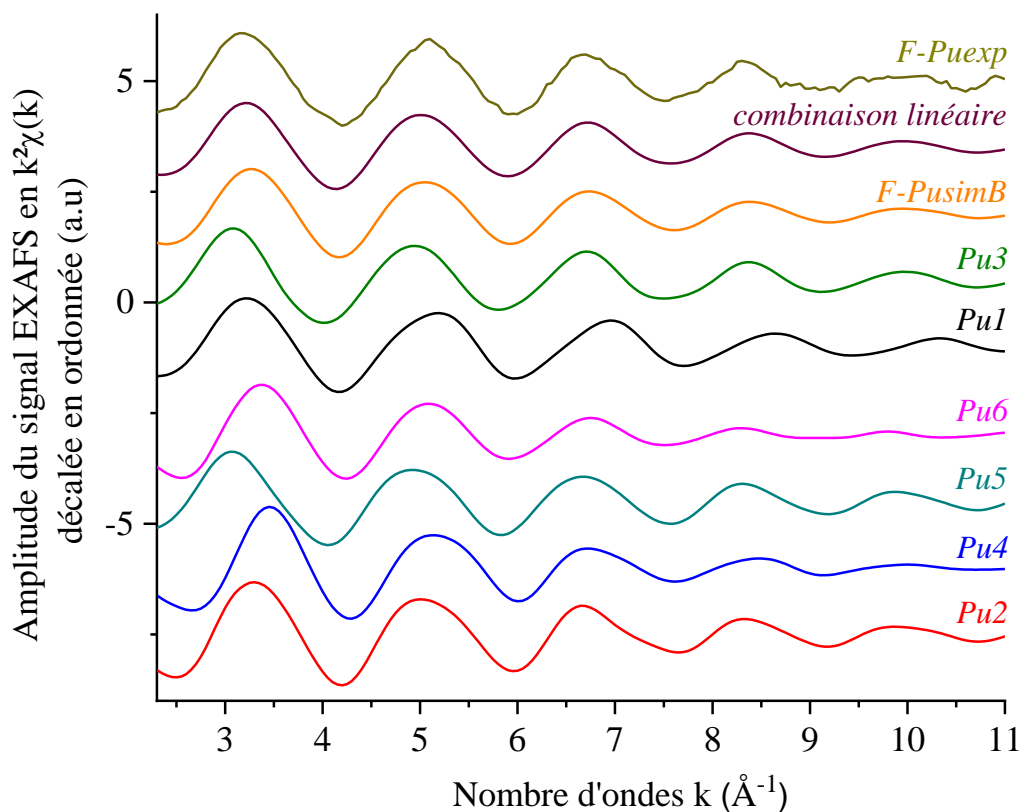


Figure 53 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des 6 sites Pu(1 à 6) contenus dans la simulation B ainsi que du spectre moyen de la simulation B, noté F-PusimB, ainsi qu'une combinaison linéaire des 6 sites Pu(IV).
 Comparaison des spectres EXAFS calculés avec et le spectre expérimental du complexe F-Pu.

Les sites d'interaction ne comportant pas de résidus d'acides aminés en interaction avec le Pu(IV) soit Pu2, Pu4, Pu5 et Pu6 sont représentés en bas de la Figure 53 alors que les sites d'interaction contenant au moins un acide aminé, Pu1 et Pu3, sont représentés en haut de la Figure 53. Le spectre moyen de la simulation B est une moyenne non pondérée des six spectres théoriques des sites de Pu(IV). D'un point de vue qualitatif, le spectre moyen de la simulation B est proche du spectre EXAFS expérimental.

Afin de pouvoir identifier des sites éventuellement préférentiels, une combinaison linéaire a également été calculée. Contrairement au spectre F-PusimB, le spectre de la combinaison linéaire a été calculé avec une variable d'ajustement comprise entre 0 et 1 pour pondérer chaque site de Pu.

La combinaison linéaire est composée de 6,3% de Pu1, 12,7% de Pu2, 52,9% de Pu3, 13,5% de Pu4, 0,8% de Pu5 et de 13,8% de Pu6. Il en ressort que le site Pu3 semble être le plus représentatif du spectre EXAFS expérimental. Ce site est d'autant plus intéressant qu'il contient plusieurs types d'interaction : deux résidus d'acide aminés monodente, un carbonate et des molécules d'eau.

Pour aller plus loin dans le choix du modèle du site de complexation, les spectres calculés pour chaque site ont été soustraits au spectre expérimental du complexe F-Pu et les résidus de ces différences sont représentés dans la Figure 54. Ces spectres de différence permettent d'établir un examen plus attentif à chaque site simulé.

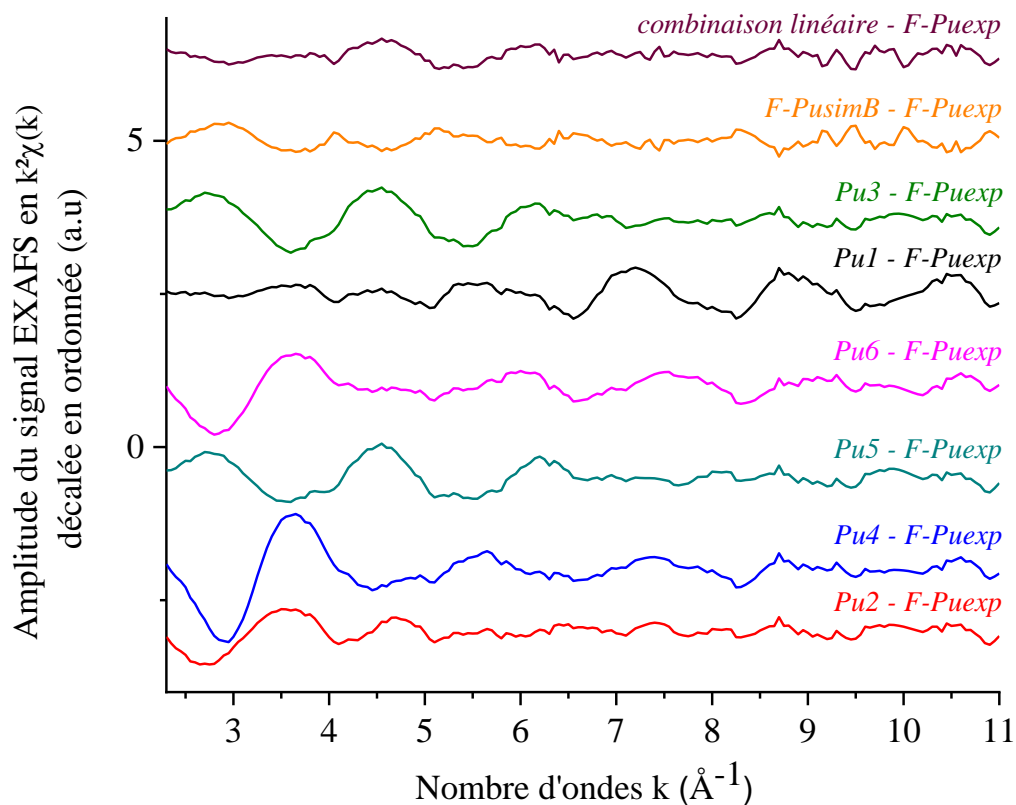


Figure 54 : Résidus des spectres EXAFS de différence en $k^2\chi(k)$ des sites du Pu(IV) de la simulation B selon la formule : $\text{dif}(\text{moyenne}) = \{F\text{-Pu-sim}(B) - F\text{-Pu-exp}\}$, $\text{dif}(\text{Pu}) = \{\text{Pu-i}(B) - F\text{-Pu-exp}\}$.

Comparons plus précisément les spectres de différence calculés des deux sites les plus représentatifs Pu1 et Pu3 qui peuvent être utilisés comme modèle de référence pour l'ajustement des spectres EXAFS expérimentaux. Le spectre $\{\text{Pu3} - F\text{-Puexp}\}$ montre de grandes amplitudes avant $k = 5 \text{ \AA}^{-1}$ mais qui s'atténuent vite avec des amplitudes faibles après $k = 5 \text{ \AA}^{-1}$. En revanche, pour le spectre $\{\text{Pu1} - F\text{-Puexp}\}$, de légères amplitudes sont visibles avant $k = 5 \text{ \AA}^{-1}$ qui s'intensifient après $k = 5 \text{ \AA}^{-1}$. Nous avons donc choisi d'utiliser comme modèle le site Pu3 pour l'ajustement du spectre EXAFS conformément à l'analyse par combinaison linéaire.

Le modèle du site de complexation Pu3 de la simulation B, est illustré dans la Figure 55. Ce site d'interaction a également été utilisé en remplaçant le Pu par le Th afin de pouvoir ajuster les données du spectre expérimental du complexe F-Th.

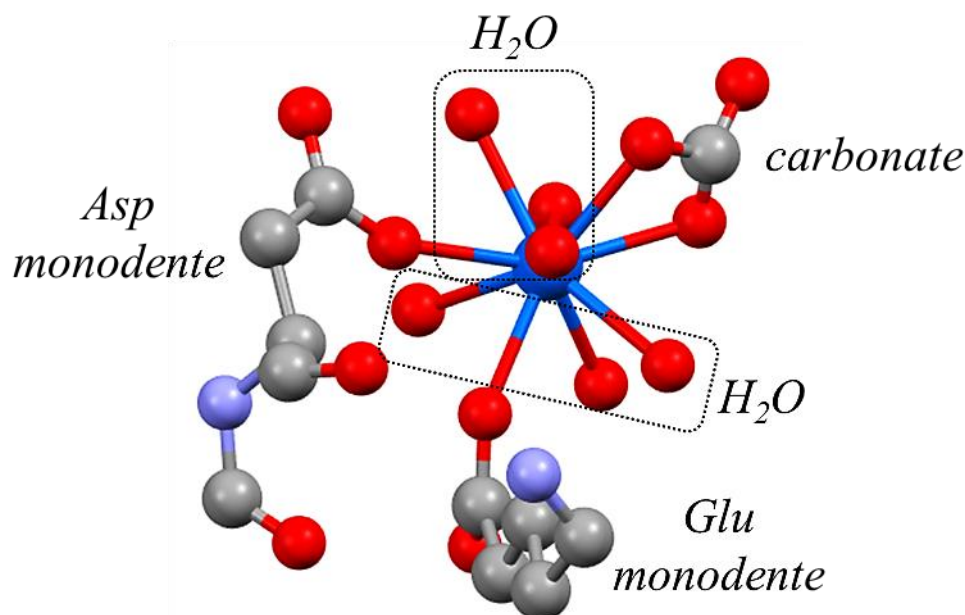


Figure 55 : Environnement local du site Pu3 de la simulation B. Les billes bleues, rouges, grises et violettes correspondent à l'An(IV), à l'oxygène, au carbone et l'azote respectivement.

6. Ajustement des données EXAFS des complexes F-Pu et F-Th

Les spectres des complexes Pu-F et Th-F ont été enregistrés au seuil L_{III} du plutonium (18 057eV) pour le complexe F-Pu et au seuil L_{III} du thorium (16 300 eV) pour le complexe F-Th. Le signal EXAFS a été ajusté en k^2 dans l'espace R entre 1 Å et 6 Å sans aucun filtrage supplémentaire après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning dans l'intervalle k (2,7-10,8 Å⁻¹).

Les spectres EXAFS expérimentaux des complexes F-Th (ligne violette) et F-Pu (ligne bleue) sont illustrés Figure 56 et sont comparés au spectre théorique du site Pu3 (ligne orange) mais également aux références de carbonate de thorium (IV) (ligne verte) et au carbonate de plutonium (IV) (ligne noire).

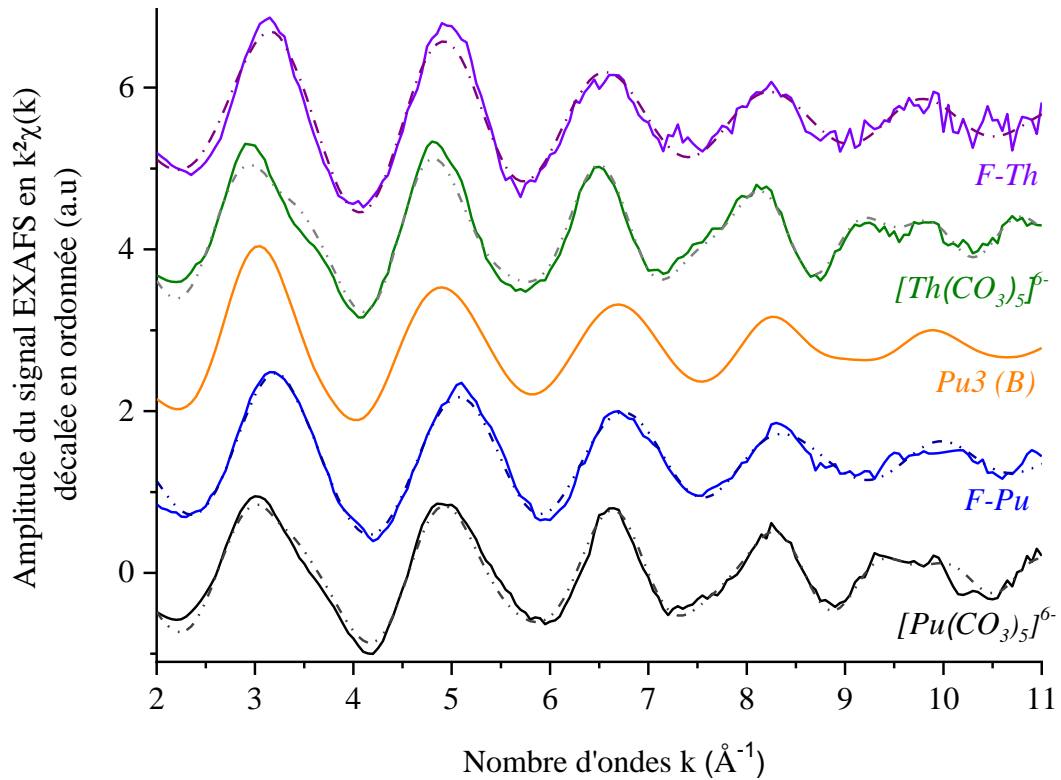


Figure 56 : Spectres EXAFS expérimentaux au seuil L_{III} Th/Pu de F-Th (violet), [Th(CO₃)₅]⁶⁻ (vert), F-Pu (bleu) et [Pu(CO₃)₅]⁶⁻ (noir). Les ajustements sont indiqués en pointillés. La ligne orange (Pu3) correspond à la simulation du site de Pu(IV) représentant le complexe ternaire (protéine, carbonate, eau).

En comparant les spectres EXAFS de [Th(CO₃)₅]⁶⁻ et de F-Th d'une part et de [Pu(CO₃)₅]⁶⁻ et de F-Pu d'autre part, des différences significatives apparaissent. En effet, un décalage du signal EXAFS des faibles valeurs de k et une modification de la forme de l'onde est visible entre 2 et 4 Å⁻¹. Une dérivée est appliquée à tous les spectres entre 2 et 4 Å⁻¹ k afin de rendre plus visible ce décalage (Figure 57).

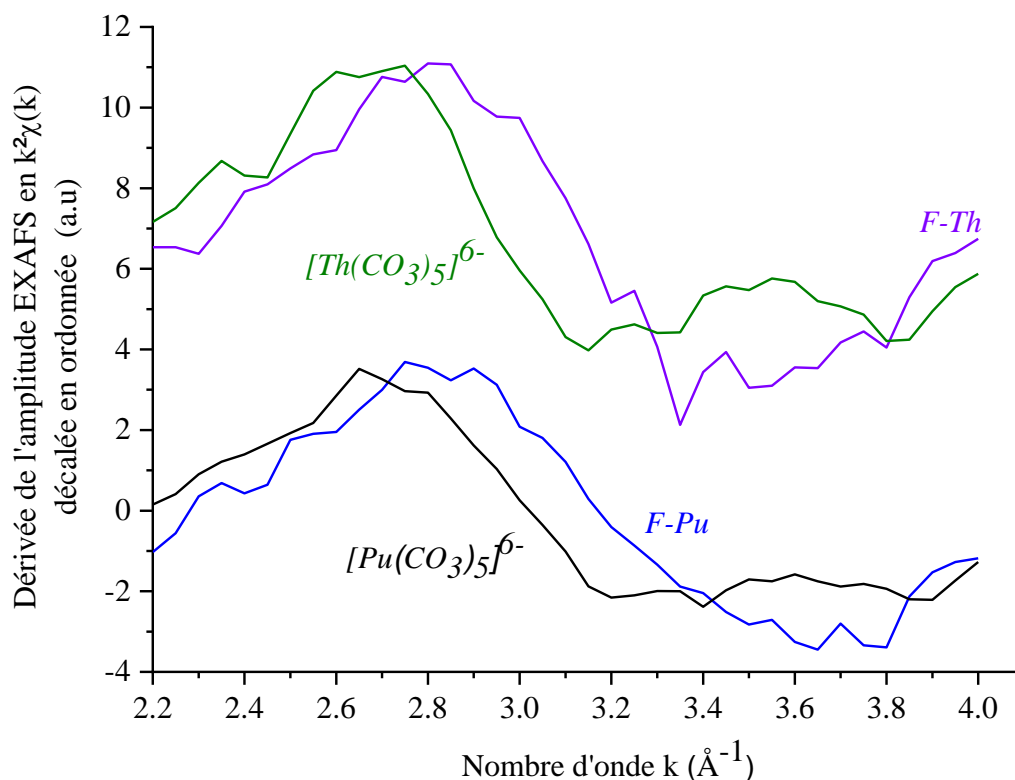


Figure 57 : Dérivée des spectres dans la gamme de k comprise entre 2,0 à 4,0 \AA^{-1} du signal EXAFS en $k^2\chi(k)$ de F-Th (violet), $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (vert), F-Pu (bleu) et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (noir).

Les dérivées présentent un décalage entre les complexes carbonate et les complexes ferritine. Cette donnée est une indication qualitative sur la différence d'environnement de Th et Pu dans leurs complexes respectifs.

Les paramètres des meilleurs ajustements des spectres EXAFS des complexes F-Th et F-Pu avec le modèle Pu3 sont rapportés dans le Tableau 15. Ces données sont comparées avec les paramètres de meilleur ajustement des complexes $[\text{An}^{\text{IV}}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ présentés dans le Chapitre 2.

Tableau 15 : Paramètres structuraux obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS. Pour F-Pu et F-Th, les chiffres en italique ont été fixés. σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre. Les chiffres indiqués en italiques sont des paramètres fixés.

Echantillon	Première couche : O	Deuxième couche : C	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Facteur-Q Facteur-R
<i>[Pu(CO₃)₅]⁶⁻</i>	10,2(4) O à 2,44(2) Å $\sigma^2 = 0,006$ Å ²	5,1(4) C à 2,88(1) Å $\sigma^2 = 0,008$ Å ²	1,0 6,54	38 3,1%
<i>F-Pu</i>	10 O à 2,39(5) Å $\sigma^2 = 0,007$ Å ²	5,2(20) C à 3,34(4) Å $\sigma^2 = 0,007$ Å ²	1,0 6,26	32 2,2%
<i>[Th(CO₃)₅]⁶⁻</i>	10,8(4) O à 2,50(8) Å $\sigma^2 = 0,007$ Å ²	5,4(4) C à 2,96(9) Å $\sigma^2 = 0,014$ Å ²	1,0 4,21	39 2,9%
<i>F-Th</i>	10 O à 2,44(6) Å $\sigma^2 = 0,007$ Å ²	5,1(22) C à 3,56(26) Å $\sigma^2 = 0,005$ Å ²	1,0 6,52	14 2,1%

Le nombre total d'atomes d'O dans la première sphère de coordination de An (An = Th, Pu) a été arbitrairement fixé à 10, car il est difficile d'obtenir une incertitude inférieure à 20% sans fonction d'amplitude modèle. Les données d'ajustement des complexes F-Th sont similaires à celles du complexe F-Pu modulo la contraction actinidique de Th à Pu. Nous pouvons donc en déduire que Pu et Th interagissent avec la ferritine de manière similaire.

Les données EXAFS des complexes $[An^{IV}(CO_3)_5]^{6-}$ montrent clairement une différence avec les complexes F-Pu et F-Th. Leurs distances An(IV)...O sont plus courtes que celles dans les complexes $[An^{IV}(CO_3)_5]^{6-}$. En revanche, les distances An(IV)...C sont plus éloignées que celles dans les complexes $[An^{IV}(CO_3)_5]^{6-}$. Ces différences mettent en avant une modification de l'environnement local du Th(IV) et du Pu(IV) après complexation à la ferritine comme nous l'avons déjà souligné.

Pour le complexe F-Pu, la première sphère Pu...O est située à 2,39(5) Å, la deuxième sphère est composée de 5,2(20) C avec une distance de 3,34(4) Å. Pour le complexe F-Th, la première sphère Th...O est située à 2,44(6) Å, la deuxième sphère est composée de 5,1(22) C avec une distance de 3,56(26) Å. Notons cependant que les distances An(IV)...C ont des incertitudes assez grandes.

Les distances de la simulation B regroupées dans le Tableau 13 peuvent être comparées avec les données expérimentales obtenues pour F-Pu et F-Th. La distance Pu...O obtenue par EXAFS est en bon accord

avec la simulation B (moyenne de 2,38 Å). La distance Pu...C obtenue par EXAFS est également en bon accord avec la contribution Pu...C observée dans la distribution radiale Figure 52 située entre 3,3 Å et 3,5 Å avec une distance moyenne de 3,48 Å (Tableau 13). Par ailleurs, l'ajout d'un trajet de diffusion triple correspondant à l'atome d'oxygène distal d'un anion carbonate (décrit dans le chapitre 2) n'a pas amélioré l'ajustement de manière significative (facteur Q = 31 ; facteur R = 2,1% avec le triple trajet de diffusion de l'O distal ; facteur Q = 32 ; facteur R = 2,2% sans cette contribution, dans le cas de l'ajustement du spectre F-Pu). Ce chemin de diffusion est une empreinte de l'interaction bidente du carbonate, car il présente la plus grande amplitude. En conséquence, les données EXAFS ne permettent pas d'affirmer si un anion carbonate est présent ou non dans la sphère de coordination du Pu(IV) (et du Th(IV)).

En revanche, l'ajustement des données EXAFS n'a pas suggéré de distance Pu...C autour de 2,8 Å, ce qui laisse penser qu'il n'y a pas de contribution Pu...C comprise entre 2,7 Å et 3,0 Å contrairement à ce qu'indique les calculs. Le spectre étant une moyenne de tous les environnements du Pu(IV) lié à la ferritine, il est probable que ces contributions existent mais sont minoritaires par rapport aux contributions de la deuxième couche de carbone. Cette observation est valable également pour l'ajustement du complexe de F-Th.

Une comparaison supplémentaire entre des données structurales d'oxalate de plutonium en interaction monodente (Runde, Brodnax, Goff, Bean et Scott, 2009) et les données du complexe F-Pu est également possible, bien que la liaison oxalate soit très différente de celle des carboxylates. Dans la structure de l'oxalate de plutonium, les distances Pu...O sont comprises entre 2,45 Å et 2,51 Å et les distances Pu...C sont comprises entre 3,25 Å et 3,46 Å. Or, l'ajustement EXAFS du complexe F-Pu révèle des distances moyennes Pu...O et Pu...C de 2,39 Å et 3,42 Å respectivement qui semblent être en accord avec les données des oxalates de plutonium(IV). Bien que la comparaison ne soit qu'indicative car les ligands oxalates sont très différents des fonctions carboxylate des protéines, une interaction monodente des groupements carboxylate est très probable mais n'exclut pas pour autant une part d'interaction bidente qui, dans notre cas, n'est pas observée.

III. Conclusion sur l'interaction des An(IV) avec la ferritine

L'ensemble des études sur la description de l'interaction entre des actinides (IV) et la ferritine de la rate de cheval a permis de confirmer la complexation du Th(IV) et du Pu(IV) par les acides aminés carboxylés de la coquille protéique.

Les investigations par des analyses spectroscopiques Infrarouge ont permis l'identification, dans nos conditions d'analyses, d'une interaction entre le Th(IV) et les groupements carboxylates des acides

aminés issus de la ferritine tout en suggérant également la présence d'anion(s) carbonate(s). Le même résultat a été obtenu par spectrophotométrie avec le Pu(IV).

Une courbe de charge de la ferritine par Th(IV) a permis de quantifier la répartition du métal qui semble saturer l'anneau protéique de la ferritine. Son accumulation est d'environ 2840 ± 140 atomes de Th(IV) par ferritine, ce qui est comparable à la capacité d'accumulation du fer dans ce même compartiment. De plus, le XANES, au seuil du fer, du complexe F-Th et de la ferritine seule, ne semble pas être modifié par la présence de la densité électronique du Th(IV). En admettant que si le Th était suffisamment proche il influencerait le signal XANES du Fe, nos données nous indiquent donc que la majorité du Th(IV) semble se situer dans la coquille protéique et le Fe(III) dans le cœur ferrique.

Une approche par MD visant à modéliser les interactions entre le Pu et la sous-unité L de la ferritine a permis d'identifier des sites de complexation composés de molécules d'eau, de carbonate et des résidus aspartate et glutamate. Dans cette simulation, les atomes de Pu se partagent entre des sites constitués d'acides aminés de la protéine et des sites formés d'eau et de carbonate libres dans lesquels des acides aminés sont présents en deuxième sphère.

Les ajustements EXAFS ont permis d'identifier que l'interaction du Pu et du Th avec la protéine semble identique. Nous pouvons donc conclure que les analyses réalisées sur les complexes F-Th et F-Pu sont transposables. Enfin, un schéma global de l'interaction F- An(IV), dans nos conditions, est illustré en Figure 58.

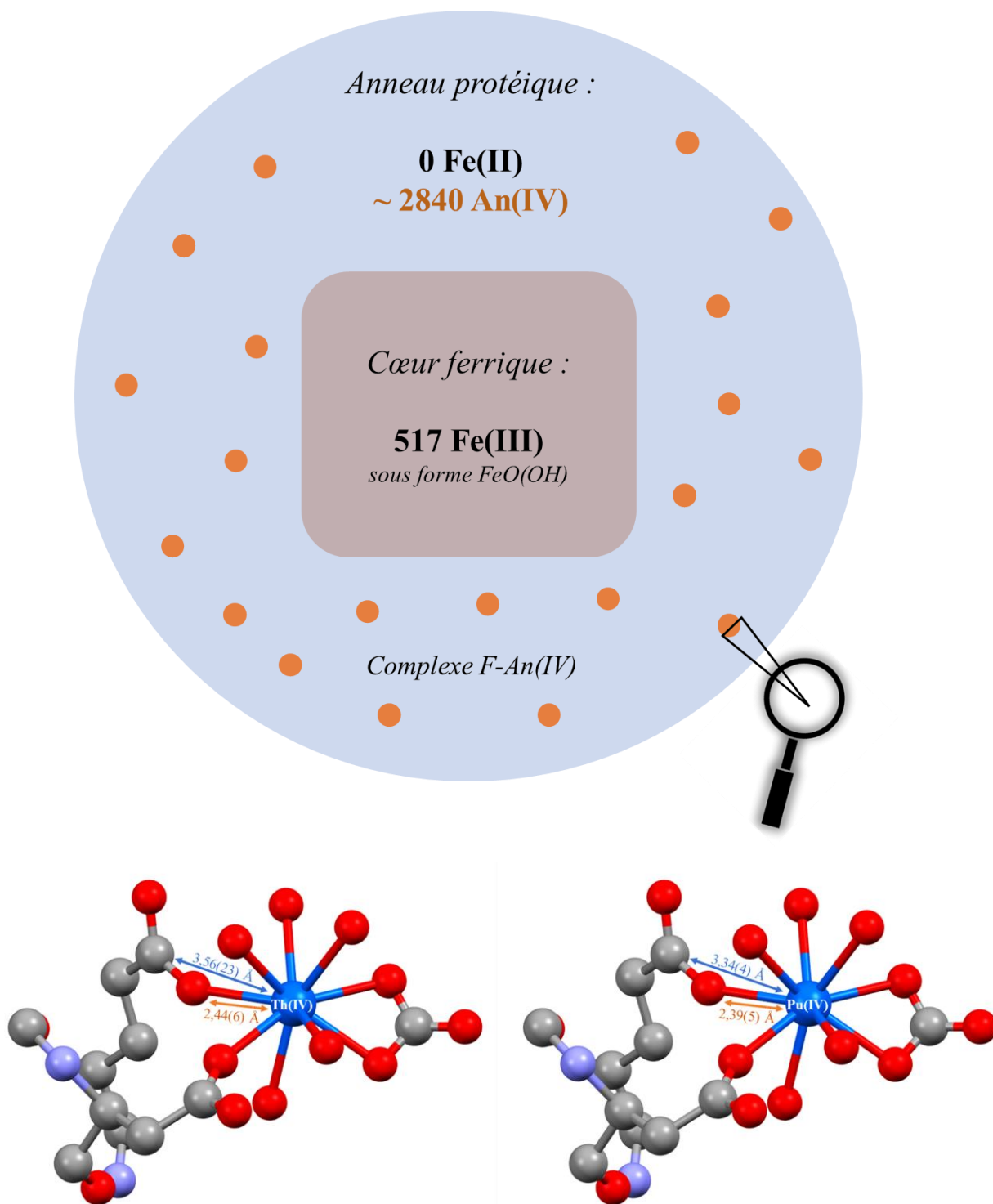


Figure 58 : Schéma simplifié global de l'interaction probable des An(IV) (An = Th, Pu) avec la ferritine

Chapitre IV :

La transferrine

Le chapitre précédent a décrit les interactions du Th(IV) et du Pu(IV) avec la ferritine de la rate de cheval. Ces données ont confirmé que cette protéine, connue pour son rôle dans l'homéostasie du fer, est capable d'accumuler les actinides (IV) sur la coquille protéique. Ce chapitre traite de la transferrine, connue pour transporter naturellement le Fe(III) du compartiment sanguin jusque dans les cellules.

I. La transferrine, une protéine très étudiée

1. Description de la transferrine et de ses fonctions biologiques

La transferrine est une glycoprotéine possédant un poids moléculaire d'environ 76 kDa. Il existe trois types de transferrine. La **lactoferrine**, se retrouve dans les sécrétions telles que le lait chez les mammifères. L'**ovotransferrine**, quant à elle, est présente dans le blanc d'œuf. La troisième famille est la **transferrine sérique** qui est synthétisée principalement par le foie et représente, chez les mammifères, environ 3 % des protéines du plasma (Cattan, 2004).

Le rôle principal de la transferrine est le transport du fer chez les vertébrés et quelques invertébrés tels que les insectes. La quasi-totalité du fer (95%) capté par la transferrine provient du recyclage des globules rouges sénescents tandis que les 5% restant sont issus de l'absorption alimentaire par les entérocytes (Wémeau, Vialettes et Schlienger, 2014). Dans notre organisme, la transferrine sérique solubilise le fer sous sa forme Fe(III) dans le compartiment sanguin, et assure en permanence la distribution du fer, qui sera capté par les cellules de différents organes, avec notamment les cellules érythropoïétiques de la moelle osseuse pour la synthèse de l'hémoglobine et les hépatocytes (E.N. Baker, 1994).

L'affinité de cette protéine pour le Fe(III) lui confère également d'autres rôles secondaires comme dans le fonctionnement du système immunitaire. En effet, en complexant le fer, ces protéines présentes dans les muqueuses créent des environnements pauvres en fer libre, rendant difficile la survie des bactéries.

La transferrine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 670-700 acides aminés (Figure 59). La chaîne polypeptidique est repliée en deux lobes, l'un étant la partie N-terminale de la protéine, l'autre la partie C-terminale. Ces deux lobes d'environ 330 acides aminés chacun sont connectés par une séquence polypeptidique d'une dizaine d'acides aminés (Wally et al., 2006). Chacun de ces lobes est constitué de deux domaines distincts, C1 et C2 pour le lobe C et N1 et N2 pour le lobe N. Chaque lobe de la transferrine possède un site de complexation du Fe(III) qui est localisé au niveau de l'articulation des deux domaines des deux lobes.

Lorsqu'il n'y a pas de complexation, ces deux domaines s'éloignent. La protéine est appelée alors *apotransferrine*, notée apoTf, et adopte une conformation dite « ouverte ». (Cheng et al., 2004). Lors de la complexation avec le Fe(III), les deux domaines se rapprochent de sorte à emprisonner l'atome métallique. Conventionnellement, la transferrine complexée avec deux atomes de Fe(III), notée Fe₂Tf, est appelée *holotransferrine* et adopte une conformation dite « fermée ». Ces deux lobes ont une haute affinité, similaire mais non identique, pour le fer ferrique (E.N. Baker, 1994). Ces centres d'interactions seront décrits en détails dans la partie suivante.

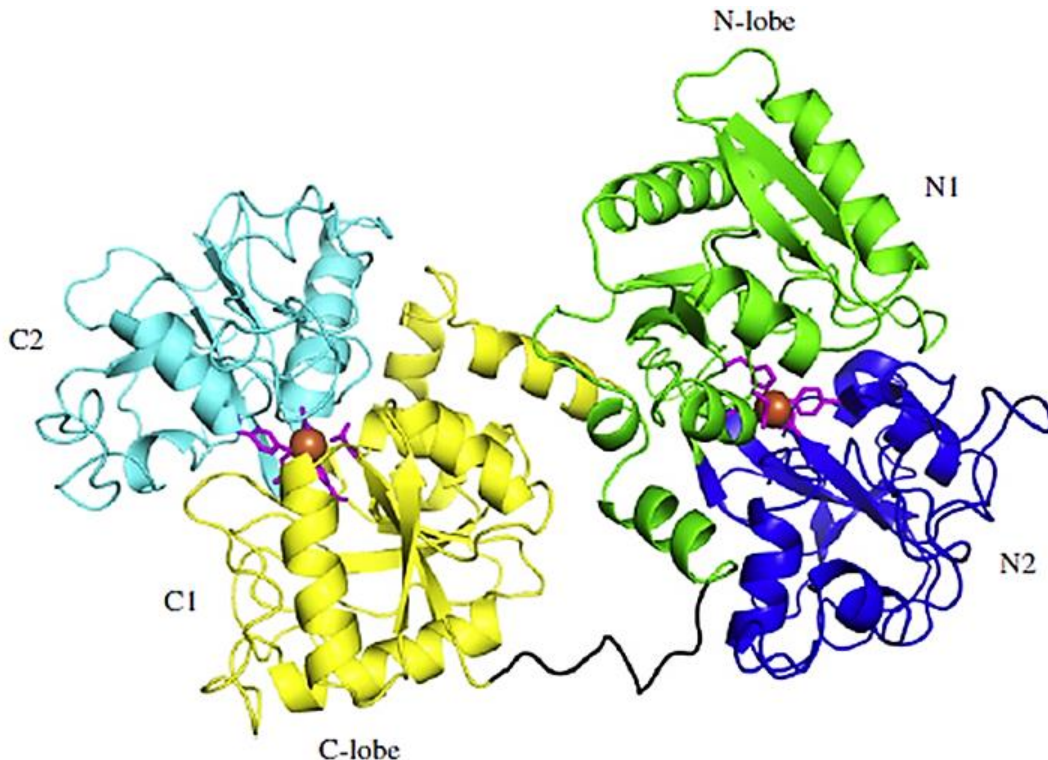


Figure 59 : Structure de la transferrine liée à deux atomes de Fe(III) (billes rouges)

En milieu physiologique, la bio-distribution, dans le compartiment sanguin, de la transferrine sérique, notée Tf, est de 27% de Fe₂Tf, 23% de Fe_NTf, 10% de Fe_CTf et 40% de transferrine non complexée (Williams et Moreton, 1980). Les valeurs normales du coefficient de saturation de la transferrine dans le compartiment sanguin sont comprises entre 20 et 40 % (Delaby, Deybach et Beaumont, 2007). Une carence en fer est détectée pour un coefficient de saturation inférieur à 20 %, alors qu'une saturation de la transferrine supérieure à 45 % est en faveur d'un début d'une surcharge en fer (Delaby et al., 2007).

Lorsque la transferrine atteint la saturation, le fer en excès se retrouve dans le plasma à l'état libre. Ce fer peut alors pénétrer facilement dans les cellules, en particulier celles du foie et du cœur, par une autre voie que celle du récepteur, et contribuer à l'altération des tissus par la génération de radicaux libres (Loréal, Ropert, et al., 2012). La saturation de la transferrine est donc un paramètre biologique important à contrôler afin de s'assurer que les apports en fer pour l'érythropoïèse (processus de formation des

globules rouges dans la moelle osseuse) sont suffisants et pour éviter un dépôt excessif de fer dans les tissus (Loréal, Bardou-Jacquet, et al., 2012; Loréal, Ropert, et al., 2012).

Les différentes transferrines présentent une même structure tertiaire, en plus de posséder une similarité dans leur séquence d'acides aminés (E.N. Baker, 1994). La structure de cette protéine a largement été étudiée notamment par diffraction des rayons X (Dewan, Mikami, Hirose et Sacchettini, 1993; Hall et al., 2002; Kuser et al., 2002; MacGillivray et al., 1998). En 1980, Martel et ses collaborateurs ont déterminé par diffusion des neutrons aux petits angles que la holotransferrine pouvait être décrite par une sphéroïde de révolution aplatie aux pôles de volume $(144 \pm 45) \cdot 10^3 \text{ \AA}^3$ (Martel, Kim et Powell, 1980). De plus, des études par diffusion de neutrons aux petits angles, menées par Yajima et ses collaborateurs, ont permis de distinguer les conformations ouvertes et fermées. En effet, le rayon de giration de l'apotransferrine observé au cours de cette étude est de 30,3 Å puis diminue à 29,3 Å pour la holotransferrine (Yajima et al., 1998).

2. Cycle de l'internalisation cellulaire de la transferrine sérique

Les cellules cibles du fer permettent l'incorporation de la holotransferrine grâce à un récepteur spécifique, appelés récepteurs de la transferrine (noté TfR1), exprimé à la surface de presque toutes les cellules de l'organisme. Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 2 sous-unités identiques de poids moléculaire de 95 kDa et reliées par deux ponts disulfures. Après la complexation de deux holotransferrines avec ce récepteur, le complexe, illustré par la Figure 60, est internalisé par la cellule par un phénomène d'endocytose (Cheng et al., 2004).

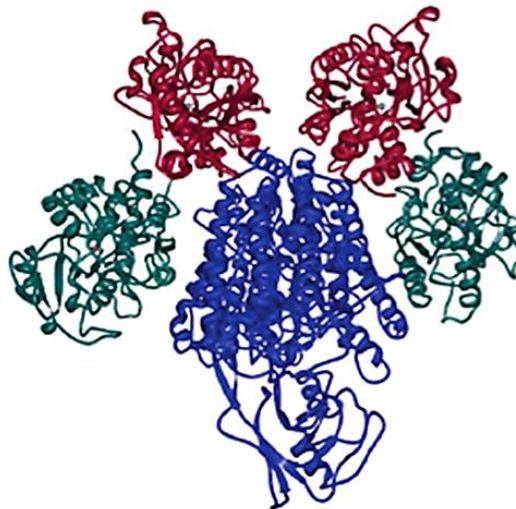


Figure 60 : Structure du complexe formé par le récepteur transmembranaire (en bleu) et deux transferrines (les lobes N sont en rouge et les lobes C en vert) ; PDB : 1SUV (Cheng et al., 2004)

Le cycle de la transferrine qui induit l'internalisation du fer dans les cellules est illustré dans Figure 61. L'endosome formé, contenant le complexe de la holotransferrine et de son récepteur transmembranaire subit ensuite une étape de maturation grâce à l'action d'une ATPase (ou pompe à protons) qui acidifie progressivement le milieu permettant la libération du fer ferrique. Le fer ferrique insoluble libéré est réduit en fer ferreux Fe(II) soluble par l'action d'une ferriréductase endosomale (Loréal, Ropert, et al., 2012). Ensuite, le Fe(II) est exporté à travers la membrane de l'endosome dans le cytoplasme de la cellule (Loréal, Ropert, et al., 2012). Le complexe TfR₁-Tf est recyclé lorsque l'endosome se lie à la membrane cellulaire et se dissocie au pH physiologique.

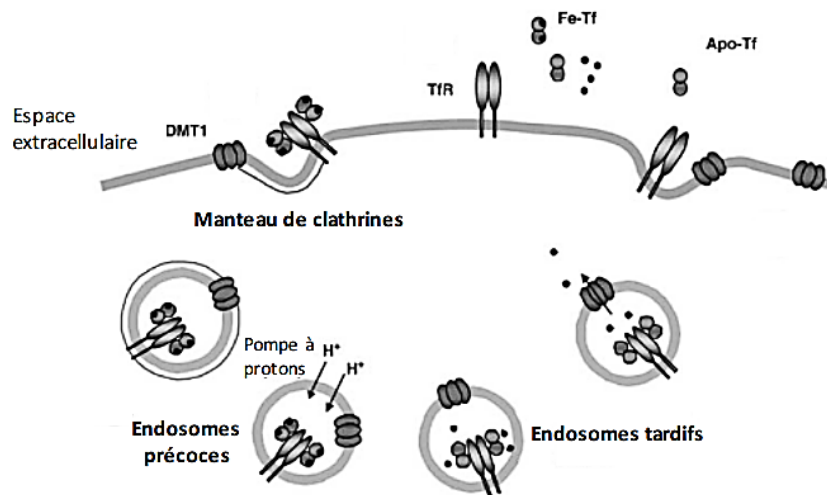


Figure 61 : Internalisation de la transferrine dans la cellule (N. C. Andrews, 1999)

Au sein de la cellule, le fer peut être dirigé vers 3 sites cellulaires : le pool de fer labile, le pool fonctionnel, et le pool de stockage (Loréal, Ropert, et al., 2012). Dans le pool de fer labile, le fer se trouve dans le cytosol cellulaire et correspond au fer de transit entre le compartiment de stockage et le pool fonctionnel (Loréal, Bardou-Jacquet, et al., 2012). Dans le pool fonctionnel, le fer s'associe à différentes protéines ferro-dépendantes pour qu'elles puissent assurer leur fonction biologique. Dans le pool de stockage, le fer est associé à la ferritine, principale protéine de mise en réserve du fer (Loréal, Bardou-Jacquet, et al., 2012; Loréal, Ropert, et al., 2012) comme nous l'avons vu.

3. Environnement local du Fe(III) lié à la transferrine

La transferrine a une très forte affinité pour le fer ($\log K \sim 20$). Les sous-domaines forment deux sites de liaison au Fe(III) impliquant des fragments de coordination identiques (Figure 62). Les sites de complexation des Fe(III) sont constitués de deux tyrosines, d'une histidine et un acide aspartique en plus d'un ion carbonate dans chacun des deux lobes, qui est connu comme l'anion synergique (Shongwe, Smith, Marques et van Wyk, 2004). Du point de vue mécanique, l'anion synergique se lie tout d'abord

au site de la protéine par des liaisons hydrogènes avec des résidus arginine et thréonine. Le carbonate rend ces sites plus électrodonneurs et donc plus apte à complexer le cation Fe(III), qui est un acide dur au sens de Pearson (Edward N. Baker et Lindley, 1992). Le fer vient ensuite se lier à l'anion carbonate ainsi qu'à deux résidus tyrosines contenus dans un des deux domaines qui composent chacun des lobes et aux résidus aspartate et histidine, situés sur l'autre domaine du lobe, ce qui conduit à sa fermeture.

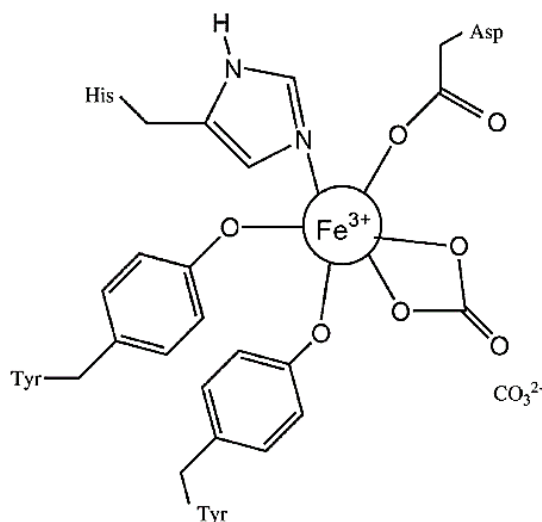


Figure 62 : Coordination du Fe(III) dans les lobes de la transferrine sérique humaine (Shongwe et al., 2004)

Il est à noter que malgré la similitude structurale des deux lobes, les deux sites de complexation de la transferrine ne sont pas équivalents vis-à-vis du fer. En effet, leurs cinétiques de fixation et de libération du fer sont différentes (E.N. Baker, 1994; Kretchmar et Raymond, 1986). En 1999, Sun et ses collaborateurs ont défini les constantes de complexation des deux sites, évaluées *in vitro* à pH physiologique : 21,4 (lobe C) et 20,3 (lobe N) (Sun, Li et Sadler, 1999).

De nombreuses études sur les constantes de formation des complexes métaux-transferrine (Figure 63) ont été menées avec divers métaux de transitions à l'état d'oxydation +II ou +III. Le complexe le plus stable observé est le Fe(III), le cation naturel de la transferrine (Chikh, Ha-Duong, Miquel et El Hage Chahine, 2006; Ha-Duong, Hémadi, Chikh et Chahine, 2008; Miquel, Nekaa, Kahn, Hémadi et El Hage Chahine, 2004; Sun et al., 1999).

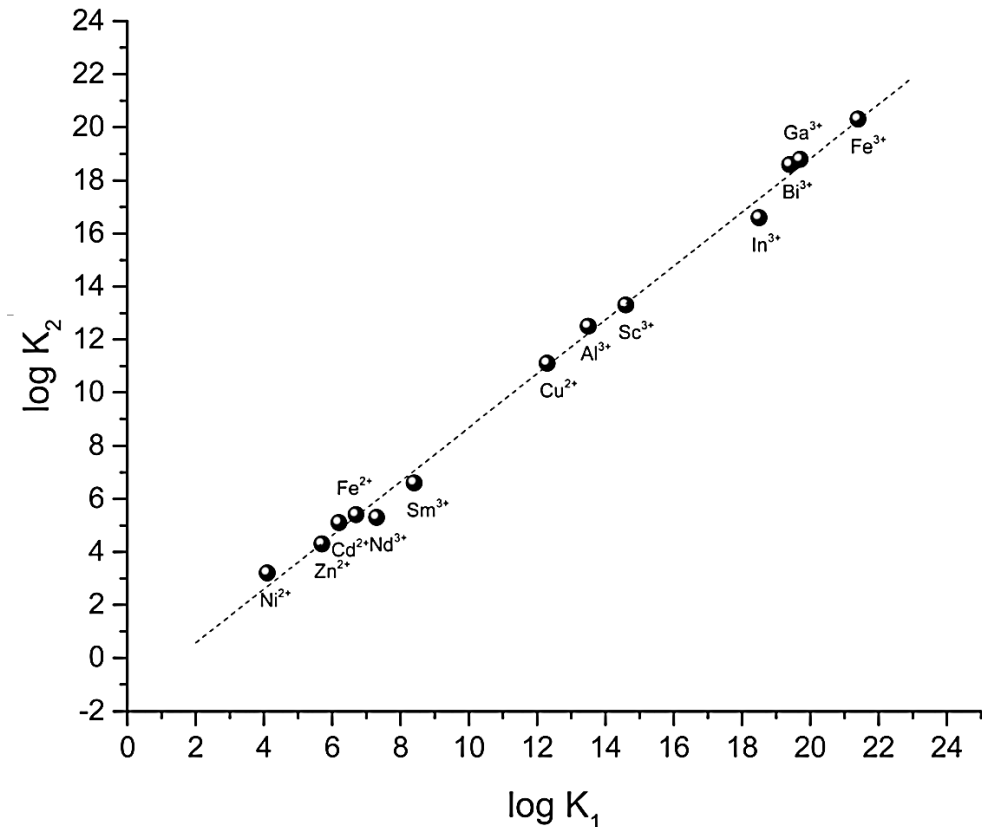


Figure 63 : Corrélation entre les constantes de liaison K_1 (ou K_C) et K_2 (ou K_N) pour divers métaux et la transferrine humaine (Sun et al., 1999).

Les actinides comme l'U(VI), le Th(IV) et le Pu(IV) ont également été étudiés par des mesures cinétiques ou des essais biologiques qui sont décrits dans la partie suivante (Brulfert et Aupiais, 2018; Hémadi, Ha-Duong, Plantevin, Vidaud et El Hage Chahine, 2010; M. P. Jensen et al., 2011; Sauge-Merle, Lemaire, Evans, Berthomieu et Aupiais, 2017).

4. Interactions du Th(IV) et du Pu(IV) avec la transferrine, que sait-on ?

Des similitudes dans le comportement chimique entre le Pu(IV) et le Fe(III) ont été observées dans des systèmes protéiques tels que celui de la transferrine. En effet, il a été rapporté que Pu(IV) se lie à la transferrine à l'emplacement des sites de Fe(III) (Harris, Cafferty, Abdollahi et Trankler, 1998; H. Li, Sadler et Sun, 1996). Une homologie est également à prévoir pour le Th(IV) qui est chimiquement relativement similaire au Pu(IV). Selon Vincent, différents actinides étudiés, au degré d'oxydation +IV, forment des complexes variablement stables avec la transferrine plasmatique (Vincent et Love, 2012). Néanmoins les complexes formés avec les actinides (IV) sont moins stables que celui de la

holotransferrine (Fe₂-Tf) car, lors de l'ajout de Fe(III) dans le milieu réactionnel, le Fe(III) se substitue aux An(IV) (Morss et al., 2006).

D'un point de vue thermodynamique, les constantes de complexation du Pu(IV) et Th(IV) avec la transferrine ont été définies grâce à une approche originale utilisant l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à plasma inductif (CE-ICP-MS). En utilisant l'acide nitrilotriacétique (NTA) comme anion synergique et dans des conditions physiologiques, la constante d'affinité globale (logK) est de $24,89 \pm 0,26$ pour le Pu(IV) et $18,65 \pm 0,19$ pour le Th(IV) (Brulfert et Aupiais, 2018; Sauge-Merle et al., 2017). Malgré le rayon ionique plus important du Th⁴⁺ par rapport à celui du Fe³⁺, les résultats révèlent que la transferrine possède une forte affinité pour Pu et Th suivant l'ordre Pu > Fe > Th (Tableau 16).

Tableau 16 : Comparaison des constantes globales logK des complexes M₂Tf (M = Fe, Th, Pu)

Complexe	Constante globale (logK)	Anion synergique
<i>Fe₂Tf</i>	~ 20	CO ₃ ²⁻
<i>Th₂Tf</i>	~ 18,65	NTA
<i>Pu₂Tf</i>	~ 24,89	NTA

Harris et ses collaborateurs rapportent qu'à pH physiologique, la transferrine peut lier deux atomes de Th(IV) sur des sites non équivalents (Harris et al., 1981). Dans cette hypothèse, le site de liaison C-terminal se coordonne par deux résidus tyrosine et le site N-terminal par un seul. La complexation du Pu(IV) avec la transferrine a également été confirmée (Grossmann et al., 1992; Harris et al., 1998; H. Li et al., 1996). En effet, Duffield et ses collaborateurs, ont observé que la complexation avec le Pu(IV) semble impliquer les mêmes sites de liaison que ceux utilisés pour le Fe(III) (Grossmann et al., 1992).

Par ailleurs, des premières études *in vitro* ont montré que le Pu(IV) n'induit apparemment pas la fermeture des lobes de la transferrine (Duffield, Taylor et Proctor, 1986). Plus récemment, Jensen et ses collaborateurs ont approfondi ces premiers résultats en comparant, par analyses SAXS, la conformation des complexes Pu₂Tf, Pu_CFe_NTf et Fe_CPu_NTf avec celle du complexe naturel Fe₂Tf (Figure 64) (M. P. Jensen et al., 2011).

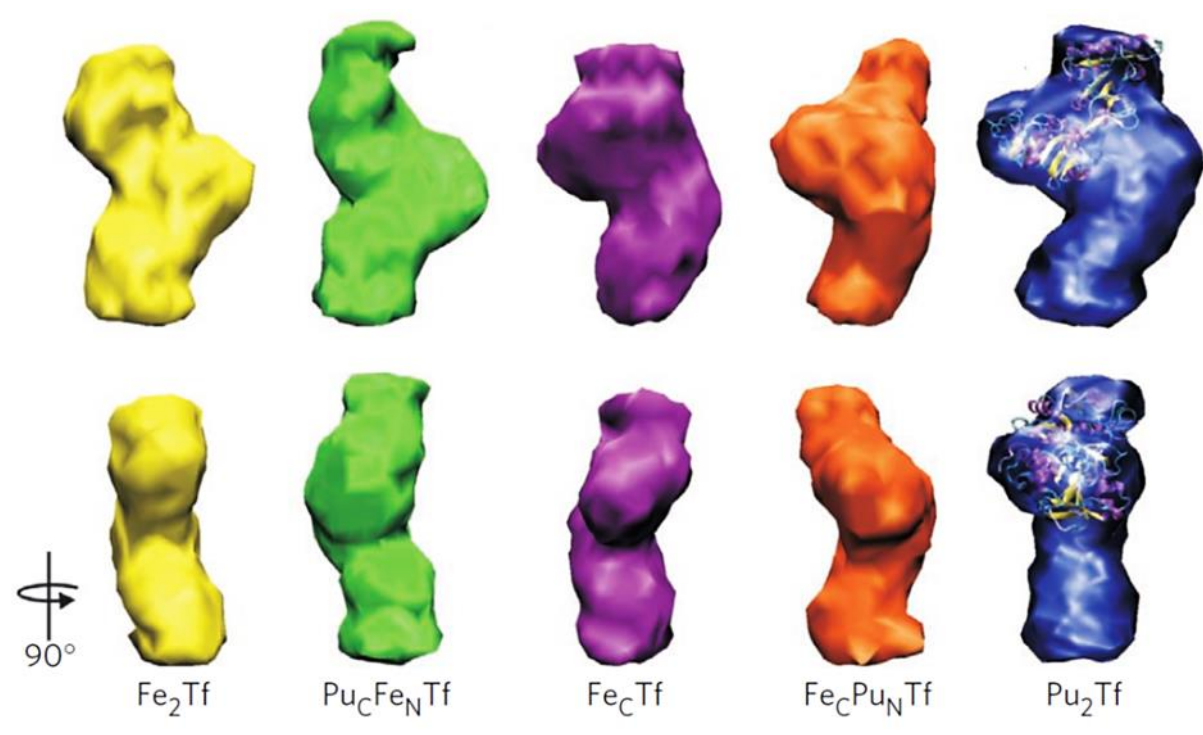


Figure 64 : Modèles structuraux des transferrines de sérum issues des analyses par SAXS (M. P. Jensen et al., 2011).

Jensen, notamment, a montré que le complexe Pu_2Tf n'a pas la même conformation que Fe_2Tf . De plus, ces observations ont démontré que le complexe $\text{Pu}_C\text{Fe}_N\text{Tf}$ semble avoir une conformation similaire au complexe naturel. L'internalisation de ce complexe mixte dans des cellules de la glande surrénale, PC12 en combinant le SAXS et la microscopie à fluorescence X a été montrée. Cette étude met en avant que la transferrine ne semble pas bloquer complètement l'internalisation cellulaire du plutonium mais son accès y est restreint par la conformation de la protéine. (M. P. Jensen et al., 2011).

Enfin, Deblonde et ses collaborateurs, ont également mis en évidence les constantes des complexes formés par le récepteur de la transferrine avec des complexes Pu_2Tf et Th_2Tf en comparaison avec celle du complexe naturel Fe_2Tf . Ces études mettent en avant que le complexe Th_2Tf se lie plus fortement que le complexe Pu_2Tf mais néanmoins moins fortement que le complexe Fe_2Tf avec son récepteur (Deblonde, Sturzbecher-Hoehne, Mason et Abergel, 2013).

Ces derniers travaux sur l'interaction de la transferrine avec les An(IV) semblent indiquer que si la conformation de la protéine est modifiée par ces métaux, elle n'empêche pas complètement l'interaction avec le récepteur de la transferrine et donc l'internalisation dans la cellule. Mais existe-t-il un moyen de diminuer la toxicité des An(IV) au niveau des cellules ? Est-il possible de contrôler l'internalisation dans ces dernières en utilisant un compétiteur efficace de la transferrine capable de la décomplexer ou de

modifier suffisamment sa structure pour empêcher sa reconnaissance par le récepteur de la transferrine ? Parmi les candidats envisagés, la famille des sidérophores apparaît particulièrement intéressante.

5. Les sidérophores, des ligands d'intérêt, impliqués dans les mécanismes de détoxification du fer

Naturellement, les sidérophores ont pour fonction biologique de séquestrer le Fe(III), qui n'est disponible en solution aqueuse, dans des conditions aérobies et à pH neutre, qu'à une très faible concentration (Kiss et Farkas, 1998). Ces molécules constituent un groupe de composés chimiquement diversifiés, contenant de nombreuses combinaisons de groupements hydroxamate, carboxylate et catécolate dans leur structure (Winkelmann, 2002). De nos jours, environ 500 structures moléculaires différentes sont classées comme sidérophores (Kraemer, 2005). La spécificité des sidérophores pour différents cations métalliques, ainsi que la stabilité des complexes qui en résultent, sont étroitement liées à leurs structures.

Parmi les nombreux sidérophores, la déféroxamine B a été choisie pour ce travail. La déféroxamine B, notée DFOB, est un sidérophore tri-hydroxamate naturel, initialement découvert dans une bactérie du sol, *Streptomyces pilosus*, mais également produit par plusieurs espèces d'actinomycètes terrestres (Duckworth, Bargar et Sposito, 2009) et marins (Codd, Richardson-Sanchez, Telfer et Gotsbacher, 2018). La chélation du Fe(III) par la déféroxamine, illustrée Figure 65, entraîne la délocalisation des électrons des groupes C=O et N-O⁻ des fonctions hydroxamates qui se lieent directement à l'ion métallique central, stabilisant ainsi le complexe (Edwards et Myneni, 2006; Edwards, Nielsen, Jarzęcki, Spiro et Myneni, 2005).

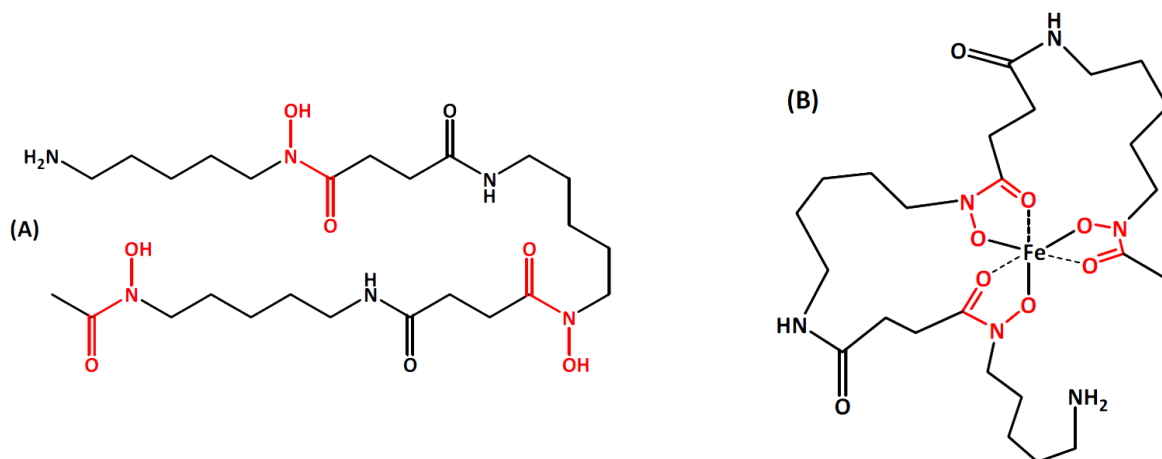


Figure 65 : Structure chimique de la déféroxamine B (DFOB) (A) et de la féroxamine B (FOB) (B). Les groupements hydroxamiques responsables de la chélation des métaux, sont mis en évidence en rouge (Bellotti et Remelli, 2021).

L'affinité très élevée de la déféroxamine pour le Fe(III) et pour les cations métalliques durs en général provient du fait que sa structure linéaire contient trois groupes fonctionnels hydroxamiques bidentés qui s'enroulent autour de l'ion ferrique pour former un complexe octaédrique neutre et très stable, la féroxamine B, notée FOB (Figure 65) (Bellotti et Remelli, 2021).

Inter

De plus, le corps humain ne dispose pas d'un mécanisme d'élimination naturel de l'excès de fer qui s'accumule dans les organes, en particulier dans le cœur et le foie, avec des effets toxiques délétères (Bellotti et Remelli, 2021). La déféroxamine peut éliminer le fer des protéines de stockage comme la ferritine mais pas des protéines sériques telle que l'hémoglobine et la transferrine, ce qui permet d'éviter les effets indésirables.

La DFOB contient un groupement amine primaire qui peut se protoner et trois groupements hydroxamiques qui se comportent comme des acides très faibles. Les constantes de protonation de la DFOB sont indiquées dans le Tableau 17. A pH neutre, la DFOB est encore totalement protonée et, lorsque le pH augmente, les protons hydroxamiques sont libérés, puis le proton lié à l'amine, qui est le groupe le plus basique de la molécule.

Tableau 17 : Constantes de protonation du DFOB à 25°C ; I = 0,1 mol.L⁻¹ NaNO₃ (Boukhalfa, Reilly et Neu, 2007)

logK₁	logK₂	logK₃	logK₄
11,0	9,71 ± 0,16	8,97 ± 0.16	8,35 ± 0.10
-	DFOB ²⁻	HDFOB ⁻	H ₂ DFOB

De nombreuses études sur la complexation de la DFOB avec différents métaux ont permis de comparer les stabilités des complexes métal-(DFOB) formés. La Figure 66 montre la corrélation entre la constante de formation des complexes, de stœchiométrie 1 : 1, et les constantes de formation des complexes hydroxyle MOHⁿ⁺. Cette corrélation suggère le même mode de coordination pour tous les complexes métal/DFOB et des interactions à caractère dur.

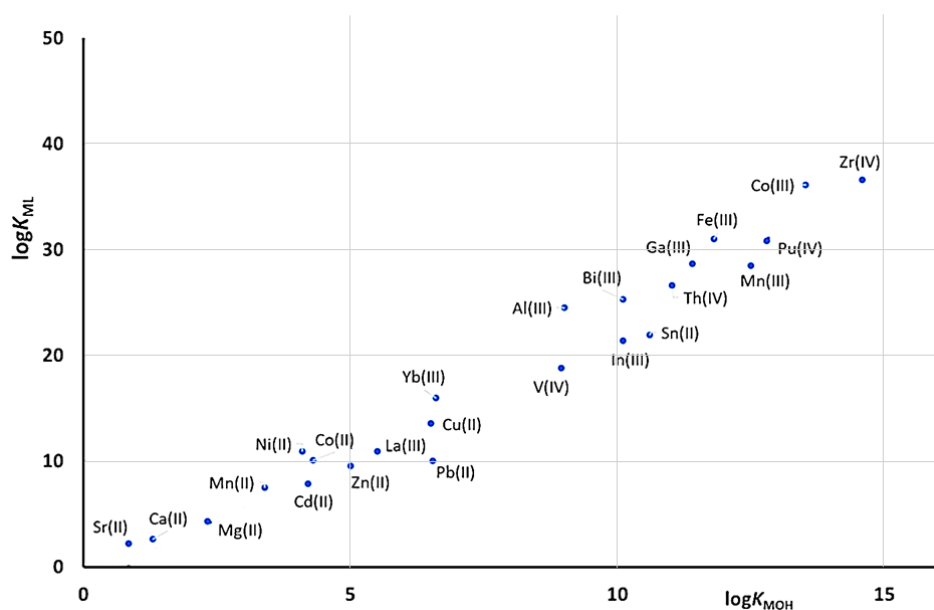


Figure 66 : Corrélation entre les valeurs de logK_{ML} pour les complexes DFOB en fonction de la première constante d'hydrolyse correspondante (logK_{MOH}) (Bellotti et Remelli, 2021).

Les constantes thermodynamiques de l'interaction du Pu(IV) avec la DFOB sont regroupées dans le Tableau 18 et traduisent la très grande stabilité des complexes Pu-DFOB. De façon générale, elles sont plus importantes que celle du Fe, comme indiqué Figure 66.

Tableau 18 : Constantes thermodynamiques de l'interaction du Pu(IV) avec la DFOB
(25°C; I = 0,1 mol.L⁻¹ NaNO₃)

Espèces	logβ	Référence
$\text{Pu}^{4+} + \text{DFOB}^{2-} + 2\text{H}^+ = [\text{PuH}_2\text{DFOB}]^{4+}$	35,5 ± 0,5	(Boukhalfa et al., 2007)
$\text{Pu}^{4+} + \text{DFOB}^{2-} + \text{H}^+ = [\text{PuHDFOB}]^{3+}$	34,9 ± 0,3	
$\text{Pu}^{4+} + \text{DFOB}^{2-} = [\text{PuDFOB}]^{2+}$	35,8 ± 0,9	
$\text{Pu}^{4+} + \text{DFOB}^{2-} + \text{H}_2\text{O} = \text{PuDFOB}(\text{OH})^+ + \text{H}^+$	27,3 ± 0,1	
$\text{Pu}^{4+} + 2\text{DFOB}^{2-} + 2\text{H}^+ = [\text{PuH}_2(\text{DFOB})_2]^{2+}$	62,3 ± 0,2	
$\text{Fe}^{3+} + \text{DFOB}^{2-} = [\text{FeDFOB}]^+$	30,99	(Evers, Hancock, Martell et Motekaitis, 1989) (0,1 M KCl)

Le complexe $[\text{FeDFOB}]^+$ est stable en solution quel que soit le pH, tandis que pour le Pu(IV) plusieurs complexes sont possibles (cités dans le Tableau 18 ci-dessus) et dépendent du pH et des conditions du milieu d'étude (Boukhalfa et al., 2007).

Les constantes de complexation de la transferrine, par le Fe et le Pu, sont comparés, dans le Tableau 19, aux constantes de formation de ces mêmes métaux avec la DFOB pour une complexation 1 : 1.

Tableau 19 : Comparaison des constantes de la Tf et de la DFOB avec le Pu(IV) et le Fe(III) (Boukhalfa et al., 2007; Brulfert et Aupiais, 2018; Evers et al., 1989; Sun et al., 1999)

	Constante logK (Tf)	Constante β _{1,1} (DFOB)
Pu(IV)	~ 24,89	35,8 ± 0,9
Fe(III)	~ 20	30,99

Les différentes constantes de la transferrine d'une part et de la DFOB d'autre part, complexées au Pu(IV) et au Fe(III), sont similaires. De plus, les complexes avec la DFOB présentent des constantes plus importantes que celle de la transferrine. Ces données appuient les hypothèses sur la possible décomplexation de la transferrine liée aux Pu(IV) mais le sidérophore peut aussi former un complexe ternaire avec la transferrine et le Pu. Pour réaliser cette étude, nous avons analysé les différents complexes de transferrine, avec et sans la présence de la DFOB, par SAXS.

Dans ce chapitre, nous allons tenter de décrire plus précisément l'environnement local du Pu(IV) et Th(IV) liés à la transferrine. Ces études ont été réalisées en présence de carbonate, anion synergique naturel dans la complexation du métal avec la transferrine, contrairement aux études décrites précédemment qui utilisaient du NTA. Nous nous sommes également intéressés à la structure tertiaire de la protéine en présence de Pu(IV) et Th(IV) et de l'influence de la DFOB sur cette structure.

II. Interaction locale du Th(IV) et du Pu(IV) avec la transferrine

Les protéines utilisées dans ce travail sont de l'apotransferrine et de l'holotransferrine humaine. Ces protéines, après dialyse, ont été conditionnées dans un milieu tamponné composé d'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) et de NaCl à 50mM et 150 mM respectivement, à un pH similaire au pH physiologique (~7,4).

Dans un premier temps, des mesures spectroscopiques ont permis de définir l'interaction du métal avec la protéine. Dans un deuxième temps, l'environnement local du Th(IV) et du Pu(IV) a été décrit par XAS et la structure globale des protéines a été analysée par SAXS.

1. Première approche de l'interaction du Pu(IV) et du Th(IV) avec la transferrine

a) Analyse des complexes An_2Tf par spectrophotométrie UV-Visible et comparaison avec la holotransferrine

La complexation de la transferrine, à pH physiologique, a été analysée par spectrophotométrie UV-Visible. Les spectres d'absorption sont représentés sur la Figure 67. Les solutions de références de carbonates de thorium (IV) et de carbonate de plutonium (IV), décrites dans le Chapitre 2, ont été utilisées afin de réaliser les complexes Pu_2Tf (ligne orange) et Th_2Tf (ligne rouge). L'holotransferrine humaine Fe_2Tf (ligne bleue) et l'apotransferrine humaine (ligne noire) sont également comparées. Pour chaque complexe, la transferrine a été complexée avec une stœchiométrie métal : protéine de 2 :1. Le détail des préparations de ces différents complexes est donné en Annexe A. Tous les spectres sont

normalisés par rapport à la bande d'absorption intense à 278nm ($\epsilon_{278} \sim 85\,000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Cette bande est attribuée aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, et principalement dues aux groupements chromophores tyrosine et tryptophane de la protéine (Bali et Harris, 1990; Cai, Cai et Yang, 2009; Shongwe et al., 2004; Tang, MacColl et Parsons, 1995).

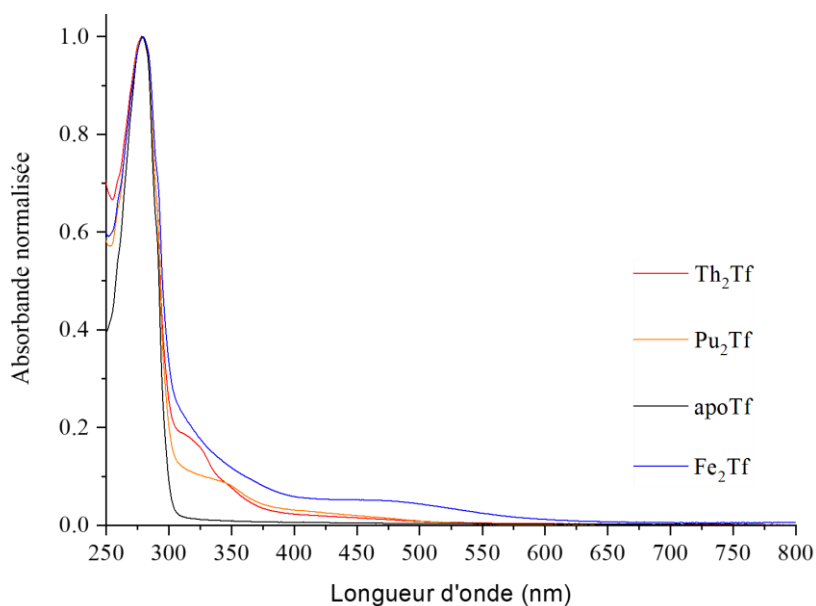


Figure 67 : Comparaison par spectroscopie UV-Visible des complexes Th₂Tf (ligne rouge), Pu₂Tf (ligne orange), Fe₂Tf (ligne bleue) et apotransferrine (ligne noire).

Le spectre du complexe Fe₂Tf montre une bande d'absorbance dans la gamme 463-472 nm associée à un transfert de charge du tyrosyl phénolate ($p\pi \rightarrow Fe(III) (d\pi^*)$) (Shongwe et al., 2004). Cette bande est caractéristique de la complexation du Fe(III) par la protéine.

Les spectres des complexes Th₂Tf et Pu₂Tf, possèdent une bande large dans la gamme 310-350 nm, non observée dans les spectres de l'apotransferrine et de la holotransferrine. Ces spectres sont distincts du spectre de l'apotransferrine et semblent donc bien indiquer la complexation conformément à la littérature (Duffield, 1987; Harris et al., 1981).

Ces premières indications, bien que qualitatives attestent de la complexation de la transferrine par le Th(IV), le Fe(III) et le Pu(IV) dans nos conditions expérimentales. De plus, chaque complexe semble avoir sa propre signature spectrale en UV-Visible.

b) Analyse des complexes An_2Tf par spectroscopie IRTF et comparaison avec la holotransferrine

Ces mêmes complexes ont été analysés, à pH physiologique, par spectroscopie infrarouge afin d'obtenir une première description des groupements impliqués dans la complexation du métal. Les spectres de l'apotransferrine (ligne noire), de la holotransferrine Fe_2Tf (ligne bleue), du complexe Th_2Tf (ligne rouge) et du complexe Pu_2Tf (ligne orange) ont été représentés sur la Figure 68. Les spectres ont été normalisés par rapport à la bande amide II centrée à 1550 cm^{-1} car cette bande est moins fortement influencée par la complexation avec les métaux que la bande amide I (Vidaud et al., 2007). Comme mentionné dans le Chapitre 3, la bande amide I, centrée à 1651 cm^{-1} , est également influencée par les modifications des structures secondaire des protéines (Duca et al., 2018).

Les spectres ont été analysés dans le domaine situé entre 1100 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} où l'on retrouve les bandes d'absorption caractéristiques des groupements carboxylates et carbonates.

En comparant les différents spectres, il apparaît que le spectre de l'apotransferrine est très similaire à celui de la holotransferrine commerciale. En revanche, le spectre du complexe Th_2Tf possède une allure nettement différente. Le spectre du complexe Pu_2Tf est enregistré en utilisant un module spécifique qui rend les conditions d'acquisition différentes des trois autres spectres. Néanmoins, ce spectre semble avoir une allure similaire au spectre du complexe Th_2Tf .

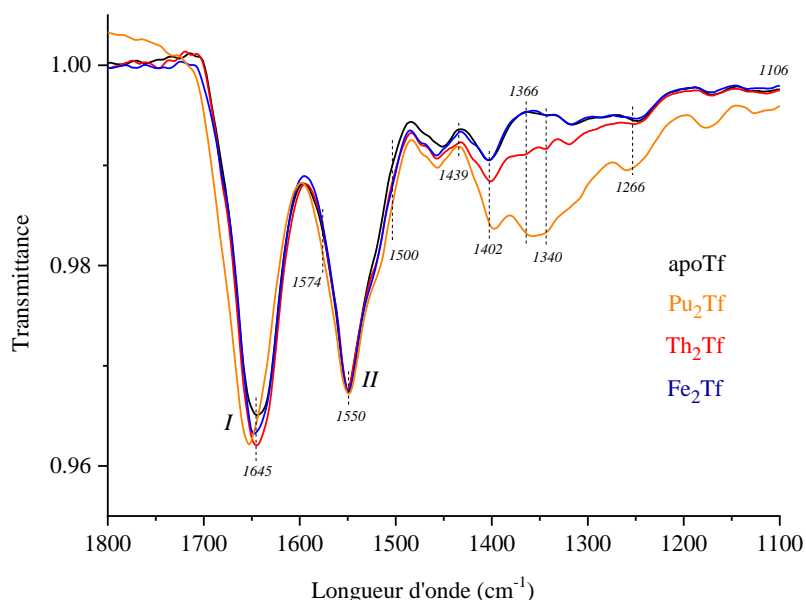


Figure 68 : Comparaison des spectres infrarouges des complexes Fe_2Tf (ligne bleue), Th_2Tf (ligne rouge), Pu_2Tf (ligne orange) avec le spectre de l'apotransferrine (ligne noire). Les différents complexes sont normalisés en transmittance par rapport à la bande caractéristique de l'amide I (1650 cm^{-1}).

Afin d'essayer de définir la nature des fonctions et donc des ligands impliqués dans la complexation du cation métallique, des spectres de différence sont calculés et représentés en Figure 69. Ces spectres sont le résultat de la soustraction du signal Th_2Tf et Fe_2Tf par le signal de l'apoTf (ligne rouge et bleue respectivement). Le spectre de différence $\{\text{Pu}_2\text{Tf} - \text{apoTf}\}$ n'a pu être réalisé car les conditions d'acquisition entre le spectre de l'apoTf et Pu_2Tf sont trop différentes.

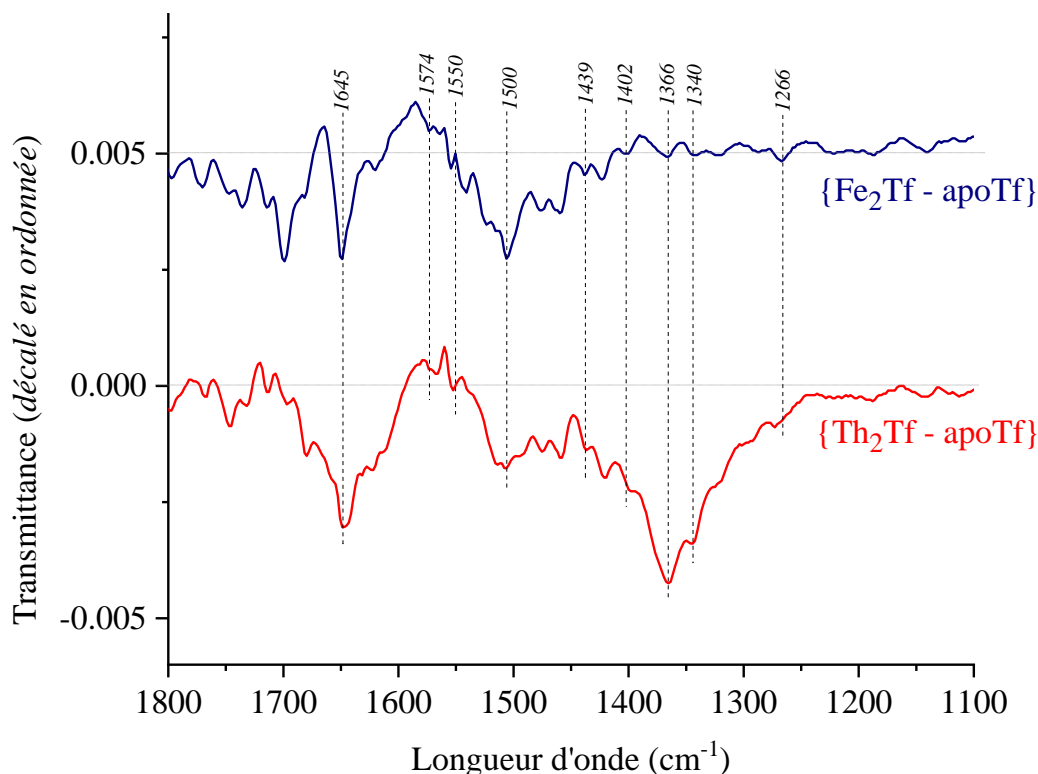


Figure 69 : Le spectre de différence du complexe $\{\text{Fe}_2\text{Tf} - \text{apoTf}\}$ est représenté en bleu et le spectre de différence du complexe $\{\text{Th}_2\text{Tf} - \text{apoTf}\}$ est représenté en rouge.

Rappelons que l'environnement local du fer (Figure 62) est composé de deux résidus tyrosines, d'un résidu aspartate et d'un résidu histidine et d'un anion carbonate. Les variations observées des spectres de différence ont été discutées en considérant l'environnement local du fer et en le comparant avec celui du thorium.

Le spectre de la solution de carbonate de thorium (IV) présente les bandes caractéristiques symétriques et antisymétriques des carbonates $\nu_3(\text{C}=\text{O})$ autour de 1650 cm^{-1} et entre $1360 \text{ cm}^{-1} - 1390 \text{ cm}^{-1}$ respectivement, pour une interaction bidente (Hiemstra et al., 2004; Stevens, Siriwardane et Logan, 2008). Pour les complexes Th_2Tf et Pu_2Tf , la bande symétrique du carbonate autour de 1650 cm^{-1} est confondue dans la bande amide I de la protéine.

La bande centrée à 1366 cm^{-1} sur le spectre de différence {Th₂Tf — apoTf} est caractéristique de la bande $\nu_3(\text{C}=\text{O})$ antisymétrique des carbonates attestant de la présence de ces groupements dans l'environnement proche du métal.

Les spectres des complexes Th₂Tf, Pu₂Tf présentent une bande à 1402 cm^{-1} qui peut être attribuée à la vibration $\nu_s(\text{COO}^-)$ symétrique du groupement carboxylate de l'aspartate. De plus, la bande de vibration antisymétrique $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ du groupement carboxylate de l'aspartate autour de 1574 cm^{-1} est également présente sur ces spectres. Ces bandes peuvent se déplacer de $+60/-90\text{ cm}^{-1}$ en fonction de la nature de du cation métallique en interaction avec ce résidu. Dans notre analyse, cette bande semble être proche de la valeur rapportée dans la littérature (Barth, 2007; Barth et Zscherp, 2002). Ces observations suggèrent l'implication du résidu d'aspartate dans l'environnement proche du Fe(III) et Th(IV).

La tyrosine présente deux bandes caractéristiques sur le spectre de la holotransferrine, à 1500 cm^{-1} associée à la vibration $\nu(\text{CC})$ et à la déformation $\delta(\text{CH})$ et à 1266 cm^{-1} associée aux vibrations $\nu(\text{C}-\text{O})$ et $\nu(\text{CC})$ (Barth, 2007; Barth et Zscherp, 2002). Sur le spectre de différence du complexe étudié {Th₂Tf — apoTf}, ces bandes sont légèrement décalées ce qui semble indiquer que les groupements tyrosine sont sensibles à la nature du cation métallique.

La vibration $\nu_s(\text{C}=\text{C})$ de l'histidine est associée à une bande d'absorption centrée à 1550 cm^{-1} et est confondue dans la bande d'absorption de l'amide II de la protéine (Barth, 2007; Barth et Zscherp, 2002). La faible variation observée autour de 1550 cm^{-1} sur les spectres de différence peut donc être attribuée, soit à des modifications structurales de la protéine, soit à des modifications locales du résidu d'histidine en présence de Fe(III) et de Th(IV).

La bande d'absorption centrée à 1645 cm^{-1} sur les spectres de différence peut être attribuée à la vibration amide I qui est nettement influencée par les modifications structurales de la protéine complexée. Il est également important de noter que la bande ν_3 symétrique des carbonates se situe autour de 1650 cm^{-1} et peut donc également contribuer à cette bande d'absorption.

Ces données infrarouges, bien que qualitatives, donnent un premier aperçu des fonctions impliquées dans la coordination des An(IV) complexés par la transferrine. Celui-ci semble être similaire à celui du Fe(III). De plus, cette complexation semble modifier la structure globale de la protéine (Duca et al., 2018).

2. Réalisation de plusieurs modèles Pu₂Tf par calcul de dynamique moléculaire

Un modèle macromoléculaire a été réalisé par dynamique moléculaire par le Pr. Tsushima de l'Université de Technologie de Tokyo. Une analyse de l'environnement local du métal dans chaque lobe est proposée. Plusieurs modèles ont été testés avec une variation du nombre de groupements carbonates en interaction avec le métal lors de sa complexation. Ces modèles ont été comparés sur la base de leur stabilité.

Pour réaliser ces modèles, une structure de transferrine liée au Ce(IV) (PDB : 1FCK) dans les deux lobes a été utilisée (H. M. Baker, Baker, Smith et Baker, 2000). Le Ce(IV) est un élément intéressant puisqu'il peut être considéré comme l'analogue non radioactif des actinides (IV). Lors de ces calculs, le Ce(IV) est substitué par le Pu(IV) tout en faisant varier le nombre de groupements carbonates en interaction avec le métal (de 0 à 3 carbonates par lobe). Ces calculs ont été réalisés pendant 100 ns en mimant le pH physiologique (pH 7,4) en ajustant les états de protonation. La Figure 70 représente la stabilité des différents modèles au cours du temps.

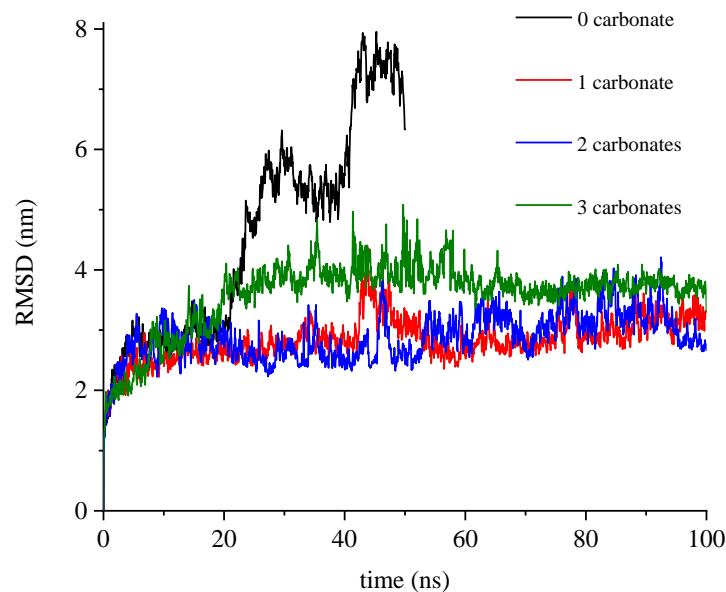


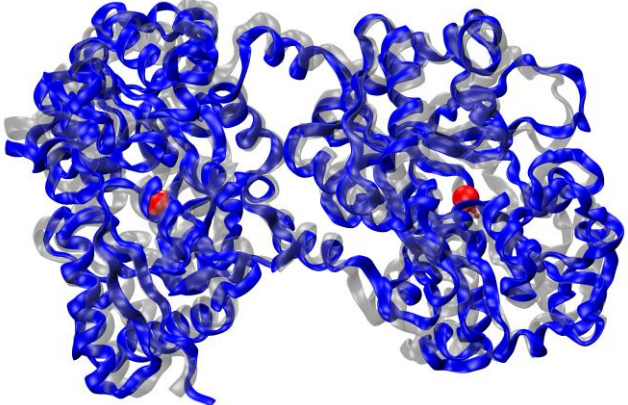
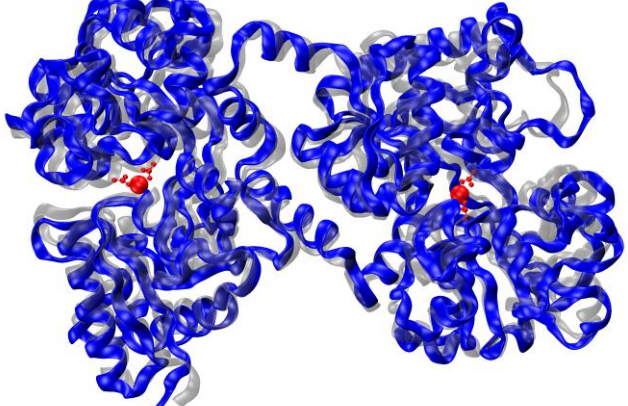
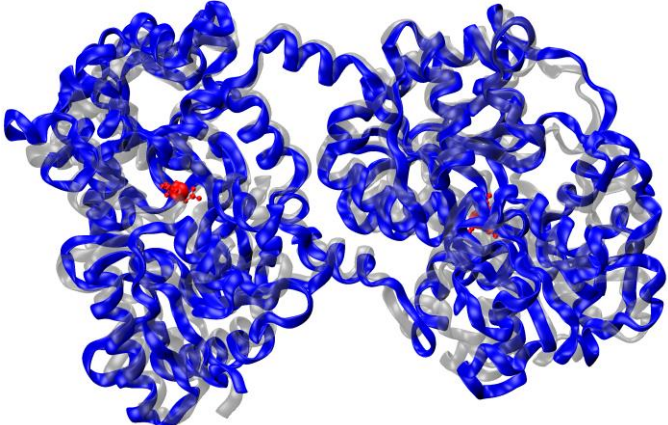
Figure 70 : Évolution dans le temps de l'écart quadratique moyen des positions atomiques RMSD (à l'exclusion des molécules d'eau, des groupements carbonates et des ions sodium) des simulations du complexe Pu₂Tf avec une stœchiométrie variable du carbonate par calcul en dynamique moléculaire.

Le modèle comprenant 0 carbonate en interaction avec le Pu(IV) lié à la transferrine n'est pas stable au cours du temps. La présence d'au moins un carbonate est nécessaire pour stabiliser le métal dans les

lobes. Le modèle comprenant 3 carbonates présente une instabilité légèrement plus importante que les modèles avec 1 et 2 carbonates par lobe.

Les structures des trois modèles (avec 1,2 et 3 carbonates par lobe) sont illustrées dans le Tableau 20. De plus, les 3 modèles calculés sont comparés à la structure initiale issue de la PDB : 1FCK contenant le Ce(IV) dans les sites d'interaction de la protéine (H. M. Baker et al., 2000).

Tableau 20 : Superposition de la structure de la PDB : 1FCK (en gris) avec les trois modèles Pu₂Tf (en bleu) calculés par dynamique moléculaire.

<i>Modélisation</i>	Structure
<i>Pu₂Tf (1carb)</i>	 A 3D ribbon diagram of the Pu ₂ Tf (1carb) model. The protein structure is shown in blue, with two red spheres representing Pu atoms. The structure is a dimeric protein with two lobes, each containing one Pu atom. The protein backbone is shown as a blue ribbon, and the Pu atoms are shown as red spheres.
<i>Pu₂Tf (2carb)</i>	 A 3D ribbon diagram of the Pu ₂ Tf (2carb) model. The protein structure is shown in blue, with two red spheres representing Pu atoms. The structure is a dimeric protein with two lobes, each containing one Pu atom. The protein backbone is shown as a blue ribbon, and the Pu atoms are shown as red spheres.
<i>Pu₂Tf (3carb)</i>	 A 3D ribbon diagram of the Pu ₂ Tf (3carb) model. The protein structure is shown in blue, with two red spheres representing Pu atoms. The structure is a dimeric protein with two lobes, each containing one Pu atom. The protein backbone is shown as a blue ribbon, and the Pu atoms are shown as red spheres.

L'observation qualitative de ces modèles, en comparaison avec le modèle initial 1FCK, ne nous permet pas de mettre en évidence de différence significatives. L'ajout de carbonate en interaction avec les atomes de Pu(IV), ne semble pas modifier la structure globale de la protéine. Pour approfondir la description de la coordination des atomes de Pu(IV) dans les différentes simulations, leur environnement local dans chaque lobe est précisé dans le Tableau 21 ci-dessous.

Tableau 21 : Environnement local (nombre, type de ligand et acide aminé de la protéine) du Pu(IV) dans les lobes N et C des simulations calculées par dynamique moléculaire représentées dans le Tableau 20. (bi = interaction bidente ; mono = interaction monodente ; a.a = acide aminé)

Modélisation	Lobe N	Lobe C	Nombre de coordination
<i>Pu₂Tf (1carb)</i>	1 Asp (bi) 1 Carbonate (bi) 1 Glu (mono) 1 Ser (mono) 4 Eau	1 Asp (bi) 1 Carbonate (bi) 1 Ala (mono) 1 Pro (mono) 4 Eau	Lobe N : 10 (3 a.a) Lobe C : 10 (3 a.a)
<i>Pu₂Tf (2carb)</i>	2 Carbonates (bi) 1 Asp (mono) 4 Eau	2 Carbonates (bi) 1 Asp (bi) 1 Thr (mono) 1 Eau	Lobe N : 9 (1 a.a) Lobe C : 10 (2 a.a)
<i>Pu₂Tf (3carb)</i>	3 Carbonates (bi) 1 Asp (mono) 2 Eau	3 Carbonates (bi) 1 Asp (bi) 2 Eau	Lobe N : 9 (1 a.a) Lobe C : 9 (1 a.a)

Dans le modèle Pu₂Tf (1carb), bien que les acides aminés en interaction avec le métal soient différents, le mode d'interaction reste identique entre les deux lobes. Dans les modèles Pu₂Tf (2carb) et Pu₂Tf (3carb), une légère divergence dans le mode de coordination des acides aminés liés au métal est visible entre les deux lobes. Une augmentation du nombre de carbonate peut induire une répulsion des acides aminés de la protéine rendant donc cette interaction avec le Pu(IV) plus difficile.

De plus, les modèles moléculaires révèlent des environnements locaux autour du plutonium peu identique à celui du fer naturel. En effet, nous constatons, dans les différents modèles, la présence de résidus de glutamate (Glu), de serine (Ser), d'alanine (Ala), de proline (Pro) ou de thréonine (Thr) qui n'interviennent pas dans la complexation du Fe(III) dans les lobes de la transferrine. A contrario les résidus de tyrosine et d'histidine, présents dans le cas du Fe(III), ne sont pas dans l'environnement proche des atomes de Pu(IV). Cependant, la présence du même résidu aspartate (Asp), dans chacun de ces lobes, indique que le Pu(IV) est bien en interaction dans le même site que celui du Fe(III). La

différence du rayon ionique entre le Pu(IV) et le Fe(III), 0,960 Å contre 0,645 Å respectivement (Shannon, 1976) peut supposer une déformation locale de la géométrie des lobes et par conséquent, une interaction légèrement différente que celle observée dans le cas du Fe(III).

Les distances de chaque type de voisin (eau, carbonate, acides aminés) des différents sites d'interaction du Pu(IV) sont regroupées Figure 71 à 73 afin de représenter les contributions radiales pour chaque simulation : Figure 71 pour le modèle Pu₂Tf (1carb), Figure 72 pour le modèle Pu₂Tf (2carb) et Figure 73 pour le modèle Pu₂Tf (3carb). Dans ces contributions radiales, la somme des deux lobes N et C du même modèle a été présentée.

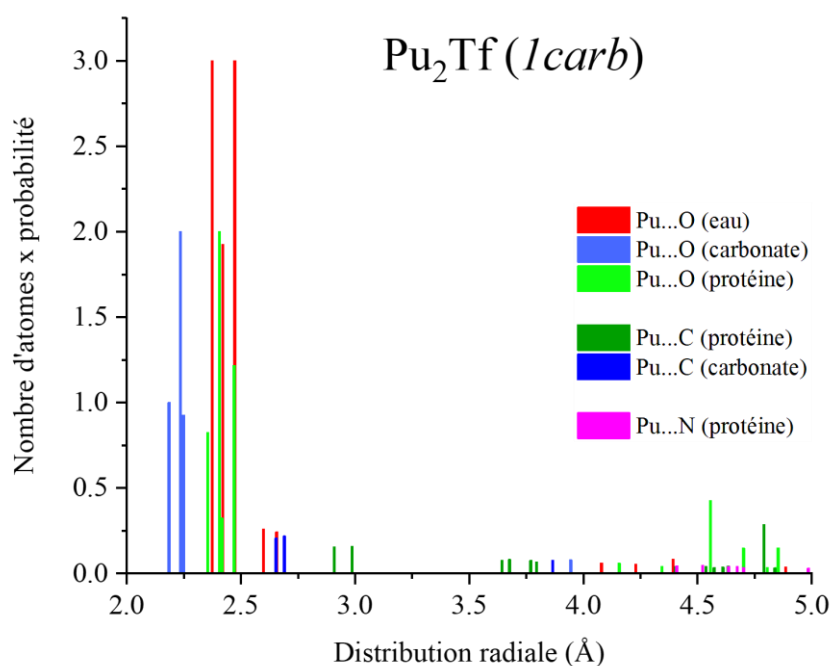


Figure 71 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu₂Tf (1 carb) calculé par dynamique moléculaire.

Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).

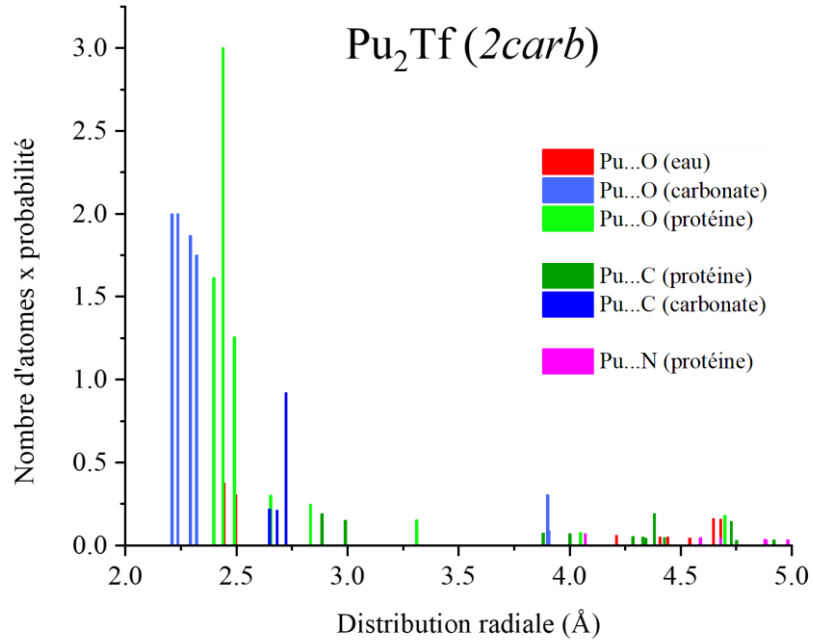


Figure 72 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu_2Tf (*2 carb*) calculé par dynamique moléculaire.

Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).

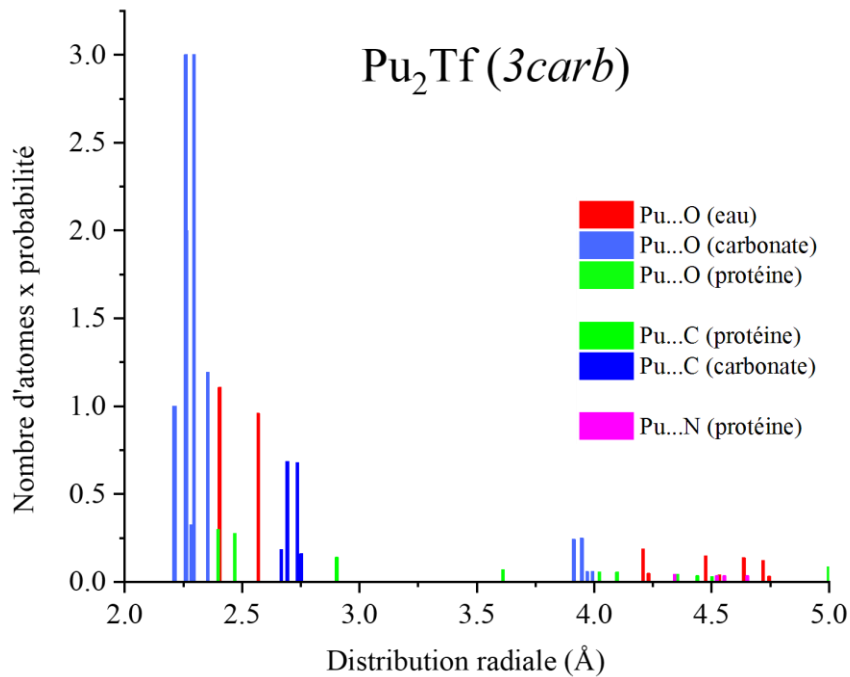


Figure 73 : Fonction de distribution radiale pour le modèle Pu_2Tf (*3 carb*) calculé par dynamique moléculaire.

Chaque barre verticale correspond à un nombre d'atome (donné par leur multiplicité) multipliée par leur probabilité, calculée par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).

Ces fonctions de distribution radiale sont construites en considérant un nombre d'atome X (X = O, C), données par leur multiplicité, multipliés leur probabilité. La probabilité et la multiplicité sont déterminés par le programme Artemis© (Ravel et Newville, 2005).

Les distributions radiales des trois modèles montrent que la distance Pu...O des carbonates (moyenne 2,28 Å) est légèrement plus courte que la distance Pu...O de l'eau et des acides aminés (moyenne 2,50 Å et 2,44 Å respectivement). Ceci semble indiquer deux couches d'oxygène, en première sphère de coordination, autour du Pu(IV). De même, la distance Pu...C des carbonates a également une distance plus courte que la distance Pu...C des acides aminés.

Dans ces modèles, il est également possible de distinguer le mode d'interaction monodente et bidente des acides aminés. En effet la distance Pu...C d'un acide aminé monodente varie de 3,6 Å à 3,95 Å suivant le modèle alors qu'une interaction bidente varie de 2,9 Å à 2,94(4) Å.

3. Étude de l'environnement proche du Pu(IV) et du Th(IV) dans les complexes de transferrine par spectroscopie EXAFS

L'environnement local de Th(IV) et Pu(IV) complexés à la transferrine a été sondé par spectroscopie EXAFS. Les spectres ont été enregistrés au seuil L_{III} du Pu (18 057 eV) pour le complexe Pu₂Tf et au seuil L_{III} du Th (16 300 eV) pour le complexe Th₂Tf. Il est important de noter, à nouveau, que les spectres EXAFS mesurés sont une moyenne de tous les environnements du métal.

a) Détermination de l'environnement proche du Pu(IV) dans la transferrine par dynamique moléculaire

Préalablement à l'ajustement des spectres EXAFS expérimentaux des complexes Pu₂Tf et Th₂Tf les spectres théoriques construits à partir des trois modèles calculés par dynamique moléculaires ont été comparés.

Chaque environnement de Pu(IV) a été isolé jusqu'à 10 Å. Pour chaque modèle, un spectre EXAFS a été calculé par atome de Pu(IV), puis la moyenne des spectres des deux lobes a été réalisée (confère schéma simplifié Figure 74). Ces simulations théoriques ont été réalisées avec le code Feff9 (Ravel et Newville, 2005). Le résultat de ces différentes simulations est présenté sur la Figure 75 avec le spectre expérimental Pu₂Tf.

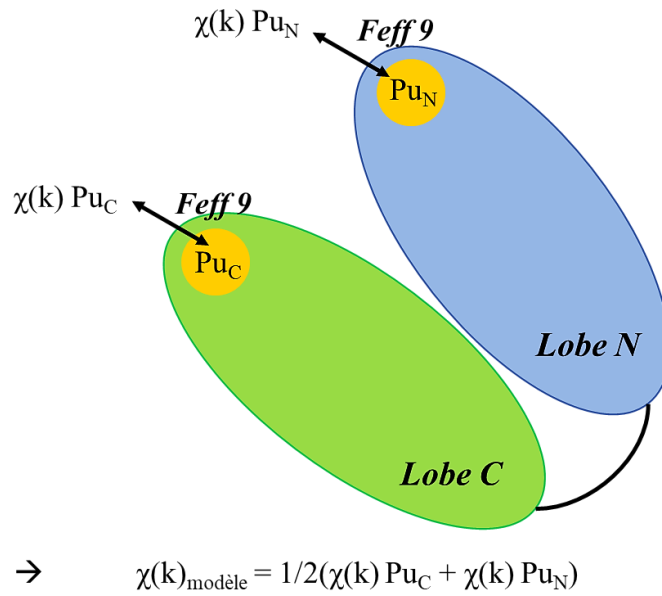


Figure 74 : Schéma simplifié du calcul du spectre EXAFS sur la base des modèles de dynamique moléculaire

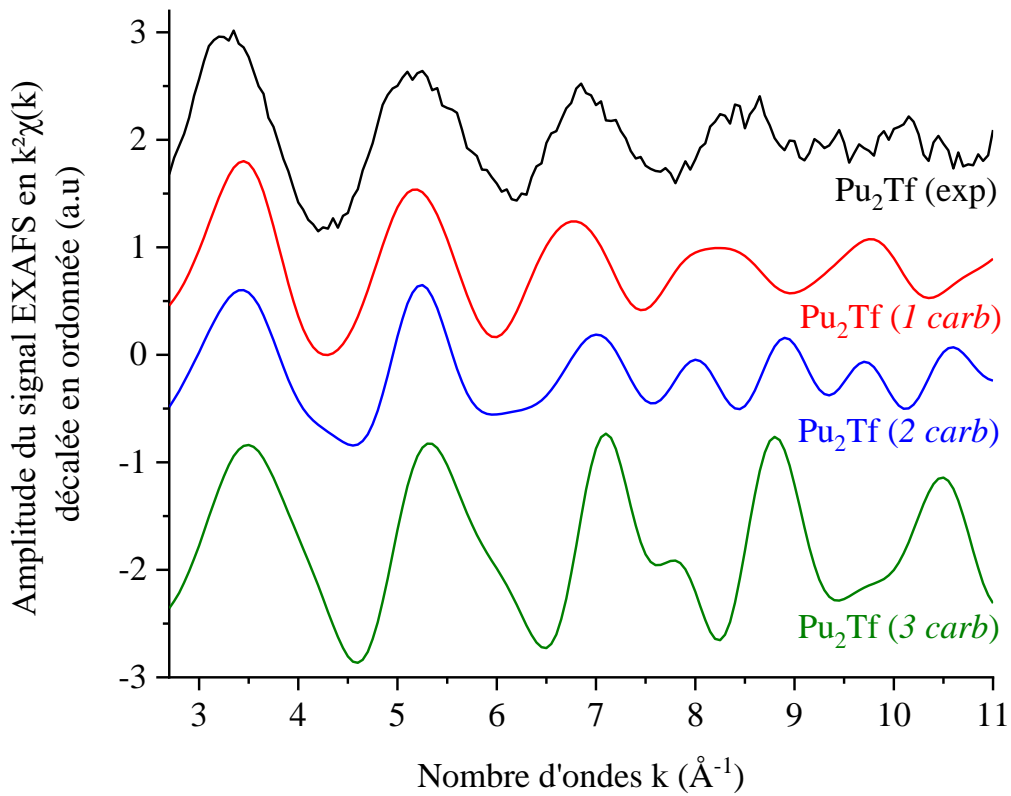


Figure 75 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des trois modèles Pu_2Tf obtenus par moyenne des spectres EXAFS des deux lobes N et C correspondant. Comparaison des spectres EXAFS calculés avec le spectre expérimental du complexe Pu_2Tf (ligne noire).

Les spectres modèles calculés $\text{Pu}_2\text{Tf} (1 \text{ carb})$, $\text{Pu}_2\text{Tf} (2 \text{ carb})$ et $\text{Pu}_2\text{Tf} (3 \text{ carb})$ ont ensuite été comparés au spectre expérimental du complexe $\text{Pu}_2\text{Tf} (\text{exp})$ afin de déterminer quel modèle est le plus similaire au signal expérimental, selon la formule suivante :

$$\Delta\chi = \chi(k) \text{Pu}_2\text{Tf} (n \text{ carb}) - \chi(k) \text{Pu}_2\text{Tf} (\text{exp})$$

La moyenne de cette différence a été calculée point par point. Ainsi, pour les modèles $\text{Pu}_2\text{Tf} (1 \text{ carb})$, $\text{Pu}_2\text{Tf} (2 \text{ carb})$ et $\text{Pu}_2\text{Tf} (3 \text{ carb})$, la moyenne est de 0,21 %, 0,83 % et 1,50 % respectivement. En utilisant cette approche, le signal théorique du modèle $\text{Pu}_2\text{Tf} (1 \text{ carb})$ semble le plus proche du signal expérimental.

Les spectres des deux lobes C et N du modèle $\text{Pu}_2\text{Tf} (1 \text{ carb})$ ainsi que le spectre moyen sont ensuite comparés au spectre expérimental du complexe Pu_2Tf , sur la Figure 76. Cette comparaison permet de sélectionner le lobe du modèle calculé ayant l'environnement local du Pu(IV) le plus proche de celui du complexe analysé. Précisons qu'il n'y a aucun ajustement de paramètres dans le calcul de ces spectres.

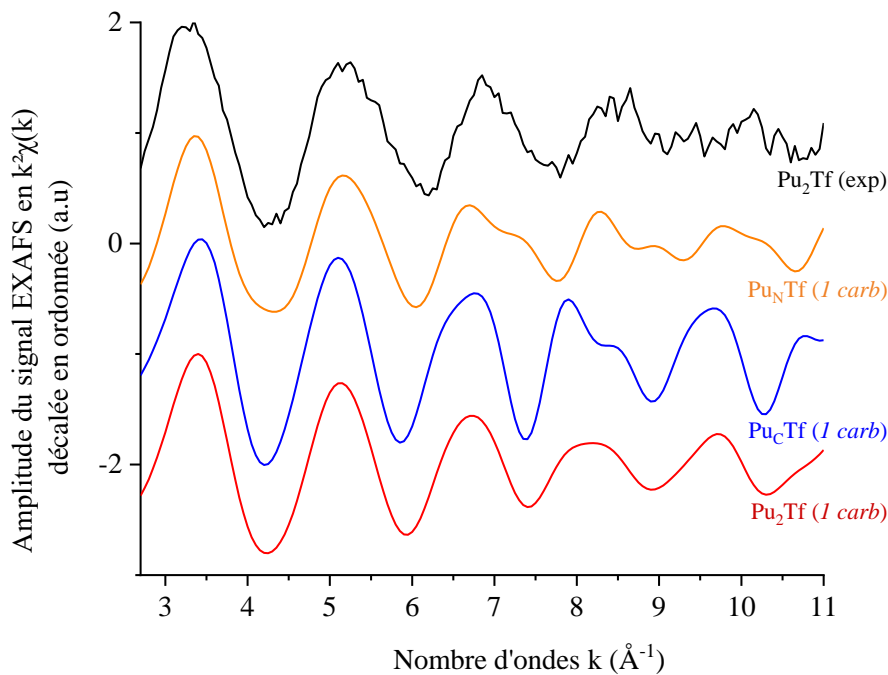


Figure 76 : Spectres EXAFS calculés en $k^2\chi(k)$ des deux lobes N et C (ligne orange et bleue respectivement) du modèle du complexe $\text{Pu}_2\text{Tf} (1 \text{ carb})$. Comparaison des spectres EXAFS calculés avec le spectre expérimental du complexe Pu_2Tf (ligne noire).

En se basant sur une observation purement qualitative, il apparaît que le spectre de $\text{Pu}_N\text{Tf} (1 \text{ carb})$ semble être plus proche du signal expérimental. Le modèle $\text{Pu}_N\text{Tf} (1 \text{ carb})$, représenté sur la Figure 77, a donc été utilisé pour l'ajustement des données EXAFS.

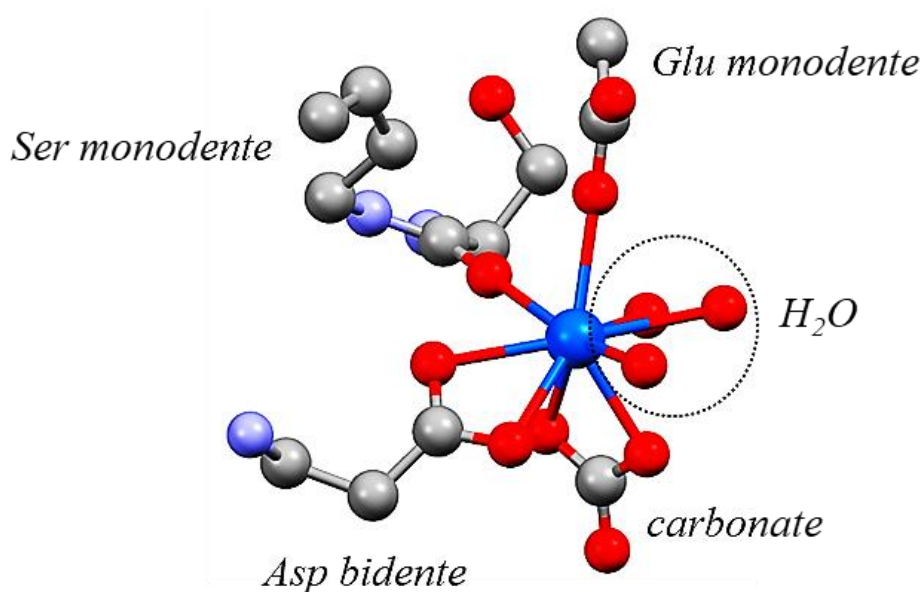


Figure 77 : Modèle Pu_NTf (1 carb). Les billes bleues, rouges, grises et violettes correspondent au Pu(IV), à l'oxygène, au carbone et l'azote respectivement.

Ce modèle est intéressant car il contient différents types d'interactions : carbonate bidente, molécules d'eau, acides aminés bidente et monodente.

b) Ajustement des données EXAFS du complexe Pu_2Tf

La comparaison des spectres EXAFS (Figure 78) des complexes Th_2Tf et Pu_2Tf avec les spectres de référence $[\text{Th}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ et $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ montre des différences significatives. La fréquence et la forme des oscillations sont modifiées dans les valeurs de k comprises entre 6 et 10 \AA^{-1} . De plus, aux grandes valeurs de k , à partir de 8 \AA^{-1} , une plus grande atténuation est observée pour les complexes Th_2Tf et Pu_2Tf par rapport aux spectres de référence.

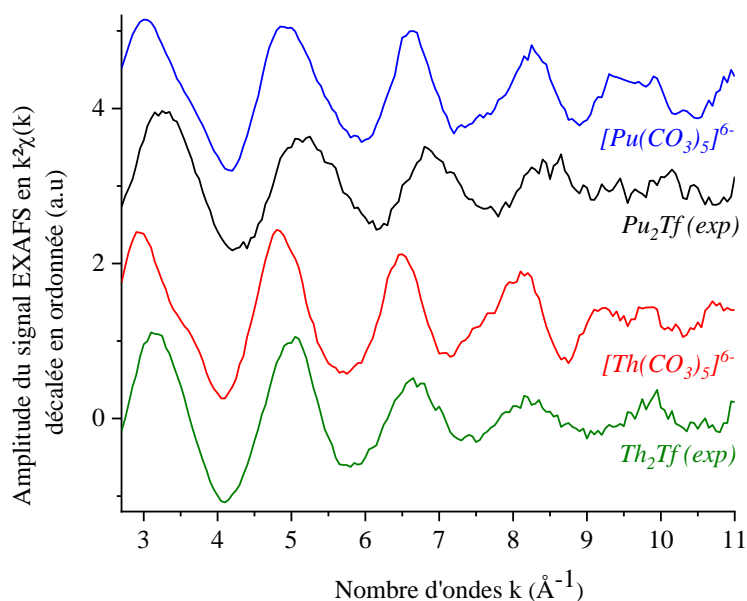


Figure 78 : Comparaison des spectres EXAFS expérimentaux au seuil L_{III} Th/Pu de Th_2Tf (ligne verte), $[Th(CO_3)_5]^{6-}$ (ligne rouge), Pu_2Tf (ligne noire) et $[Pu(CO_3)_5]^{6-}$ (ligne bleue).

La fréquence des oscillations plus élevée pour $[M(CO_3)_5]^{6-}$ par rapport à M_2Tf ($M = Th, Pu$) suggère des distances plus courtes pour ces derniers. Ceci reste purement comparatif. La modification de la forme des oscillations entre $[M(CO_3)_5]^{6-}$ et M_2Tf suggère également une modification significative des sphères de coordination.

Puis le spectre du complexe Pu_2Tf (exp) a été ajusté avec le modèle défini ci-avant. Son ajustement est illustré Figure 79 dans l'espace des k et après une transformée de Fourier dans l'espace des R . Les paramètres de cet ajustement sont répertoriés dans le Tableau 22.

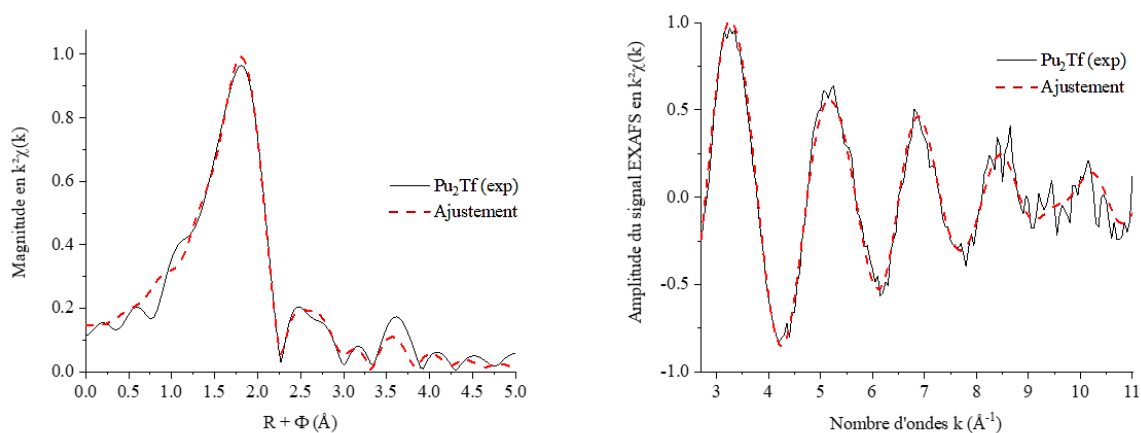


Figure 79 : Spectre EXAFS expérimental du complexe Pu_2Tf (exp) (trait plein) et son ajustement avec le modèle Pu_NTf (1 carb) (pointillés) (à droite) et transformées de Fourier correspondantes (à gauche)

Tableau 22 : Ajustement du spectre Pu₂Tf (exp) avec le modèle illustré en Figure 77. σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.

Modèle :	Première sphère	Deuxième sphère	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Facteur - Q Facteur - R
Pu_NTf (1carb)				
	2,4(2) O à 2,19(6) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	1 (<i>fixe</i>) C à 2,82(18) Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$		
<i>Ajustement avec 1 carbonate</i>	8,3(2) O à 2,35(7) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	4,3 (7) C à 3,23(32) Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$	1,0 3,05	3,9 1,1 %

L'ajustement des données EXAFS, avec un facteur d'accord de 1,1%, est relativement satisfaisant. Cependant, on observe, une contribution autour de $R+\Phi = 3,8 \text{ \AA}$ n'est pas reproduite correctement. Dans cet ajustement, la contribution de l'oxygène distal du carbonate a pourtant prise en compte. Cette contribution affecte normalement cette région du spectre expérimental. De plus, le nombre de carbonate a été ajusté entre 1 et 3 sans parvenir à reproduire correctement cette contribution. Cette observation laisse penser qu'une interaction Pu...Pu est possible et apparaît à environ $3,8 \text{ \AA}$ dans l'espace des R selon la littérature (Ekberg, Larsson, Skarnemark, Ödegaard-Jensen et Persson, 2013).

Cette contribution a également été rapportée dans les travaux de Jeanson et ses collaborateurs sans qu'elle ne soit ajustée. Par conséquent, le modèle sélectionné a été modifié afin de placer arbitrairement un deuxième atome de Pu(IV) à environ $3,85 \text{ \AA}$ de l'atome central. Ce modèle est représenté Figure 80.

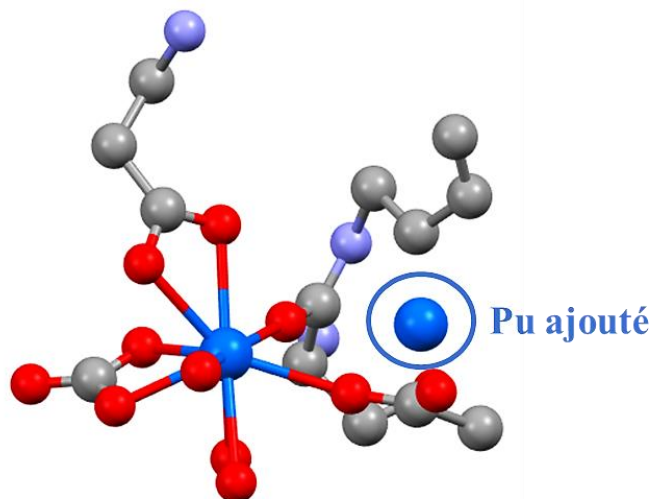


Figure 80 : Modèle Pu_NTf (*1 carb*) avec l'ajout d'un atome de Pu (entouré en bleu), à environ 3,85 Å, dans l'environnement proche. Les atomes de plutonium, carbone, oxygène et azote sont représentés en bleue, gris, rouge et violet respectivement.

L'ajustement du même spectre a donc été réalisé avec ce modèle. Il est présenté Figure 81 et les paramètres obtenus sont donnés dans le Tableau 24.

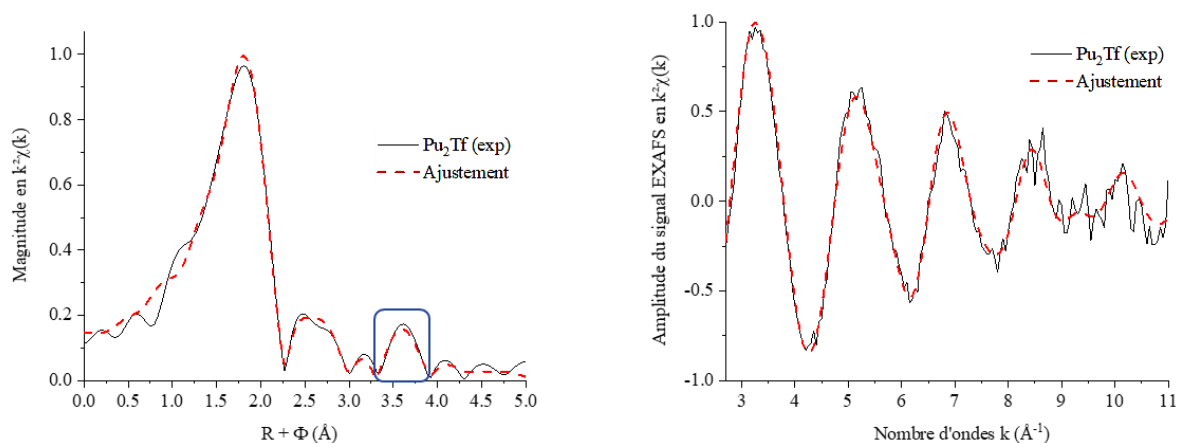
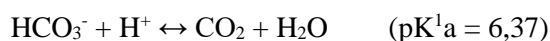


Figure 81 : Spectre EXAFS expérimental du complexe Pu_2Tf (exp) (trait plein) et son ajustement avec le modèle Pu_NTf (*1 carb*) avec l'ajout d'un atome de Pu (pointillés) (à droite) et transformées de Fourier correspondantes (à gauche)

Cette amélioration de l'ajustement est visible à partir de 6,5 Å⁻¹ jusqu'à la fin du spectre à 11 Å⁻¹. Les paramètres d'ajustement indiquent que le facteur de concordance est de 0,7 % et le facteur de qualité (χ^2 réduit) est de 2,5.

De plus, en observant la TF, la contribution autour de $R+\Phi = 3,8 \text{ \AA}$ est correctement ajustée par le modèle. La contribution Pu...Pu est située à $3,85(2) \text{ \AA}$. Cette distance correspond, d'après la littérature, à des produits d'hydrolyse comme des particules colloïdales de plutonium avec une distance Pu...Pu de $3,82(2) \text{ \AA}$ (Ekberg et al., 2013). Les conditions de préparation des échantillons vont également dans ce sens puisqu'à un pH proche du pH physiologique l'hydrolyse doit être considérée, malgré la présence des carbonates. A pH = 7, le carbonate se transforme en hydrogénocarbonate, moins complexant voir en dégagement de CO_2 et H_2O . Pour rappel, le carbonate est une espèce qui présentent deux pKa pour lesquels les réactions acido-basiques sont décrites ci-dessous :



Ceci rend donc plus sensible le métal à l'hydrolyse. Lors de la formation d'un colloïde de Pu(IV), une bande caractéristique sur son spectre UV Visible apparaît à environ 630 nm (Lloyd et Haire, 1978; Walther et al., 2009), Cette bande n'est pas visible sur notre spectre expérimental Figure 67, ni dans le spectre de référence de $[\text{Pu}(\text{CO}_3)_5]^{6-}$ (Figure 29) ce qui montre que le pourcentage de plutonium hydrolysé dans notre échantillon est probablement faible.

La transformée de Fourier du spectre EXAFS a été filtrée entre $R+\Phi = 3,32$ et $3,91 \text{ \AA}$ afin d'isoler les contributions intervenant sur le signal dans cette zone. Les ajustements du signal EXAFS filtré sont représentés Figure 82ab. La contribution de l'oxygène distal du carbonate seule (Figure 32), décrit dans le Chapitre 2, ne permet pas d'ajuster ce signal EXAFS filtré (Figure 82a). Enfin, un ajustement du signal EXAFS filtré avec une combinaison de la contribution d'oxygène distal du carbonate et de la contribution Pu-Pu ne permet pas d'améliorer les facteurs de concordance R et de qualité Q.

Seule la contribution Pu-Pu a permis d'obtenir l'ajustement du signal filtré (Figure 82b). La distance Pu...Pu ajustée est de $3,80(5) \text{ \AA}$. Cette distance est cohérente avec l'ajustement des spectres EXAFS dans le Tableau 24 et est en bon accord avec la littérature (Ekberg et al., 2013).

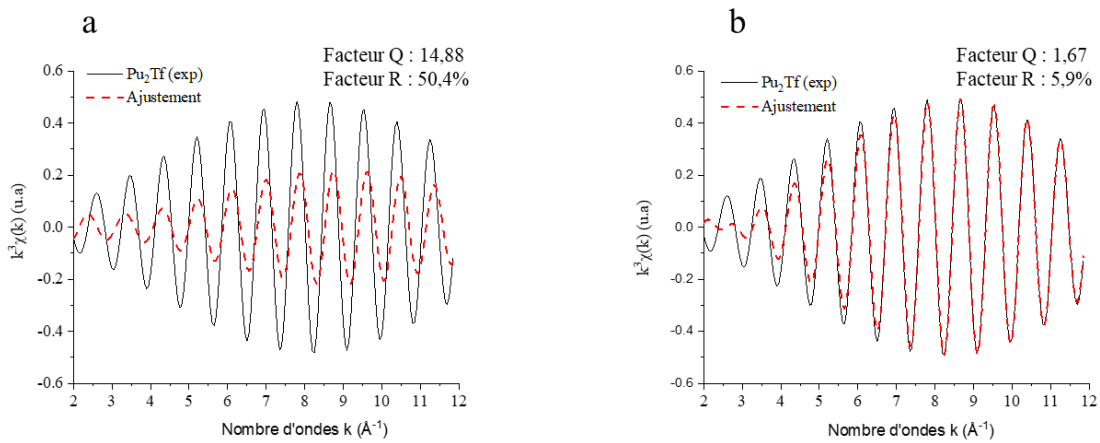


Figure 82ab : Spectre EXAFS expérimental filtré entre $R+\Phi = 3,32 \text{ \AA}$ et $3,91 \text{ \AA}$ de l'échantillon du complexe Pu_2Tf (exp) (trait plein en noir) et son ajustement (en pointillés rouge). a) Ajustement avec la contribution de l'oxygène distal. b) Ajustement avec la contribution Pu-Pu

Nous avons également comparé, sur la Figure 83, les TF des spectres de Pu_2Tf et du complexe mixte $\text{Pu}(\text{OH})_n\text{Asp}_m\text{Pu}_p$ étudié lors d'un précédent travail (Jeanson et al., 2009).

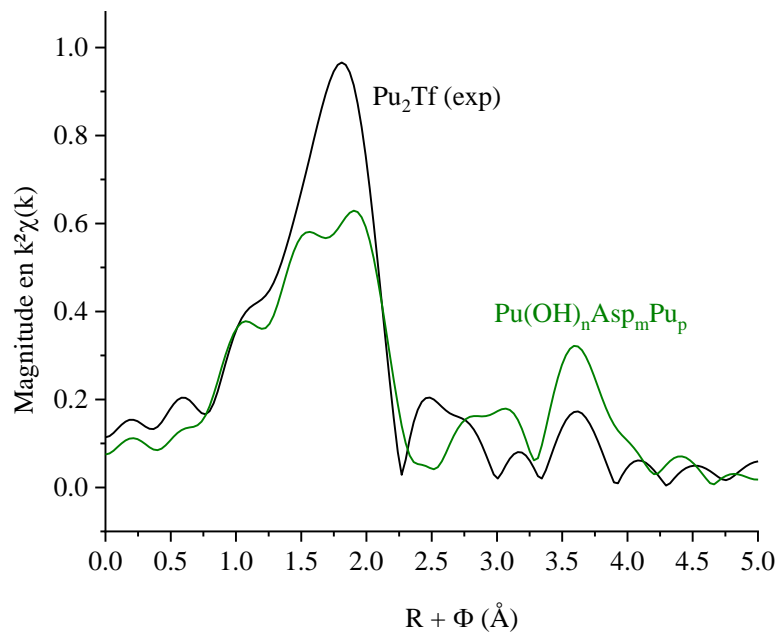


Figure 83 : Comparaison des transformées de Fourier des spectres EXAFS en $k^2\chi(k)$ du complexe Pu_2Tf (exp) (ligne noire) et d'un colloïde de Pu(IV) en présence d'aspartate (ligne verte).

Cette comparaison, bien que qualitative, confirme la présence de contribution Pu...Pu. De plus, nous avons repris le complexe Pu_2Tf possédant un anion synergique de NTA (au lieu du carbonate) dans

l'environnement proche du Pu, enregistré par Jeanson et nous l'avons ajusté avec le modèle en Figure 80 (Jeanson et al., 2010). Une comparaison des données publiées par Jeanson et l'ajustement de ce même spectre avec notre modèle est présentée dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Comparaison des paramètres d'ajustement du spectre Pu₂Tf publiée par Jeanson avec le modèle (illustré en Figure 80) et les données publiées par Jeanson (Jeanson et al., 2010). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement.

Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.

Spectres	Première sphère	Deuxième sphère	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Facteur - Q Facteur - R
Pu₂Tf-Jeanson	3,0(2) O à 2,19(6) Å $\sigma^2 = 0,005 \text{ \AA}^2$	8,9(9) C à 3,33(3) Å $\sigma^2 = 0,011 \text{ \AA}^2$		
<i>Ajusté avec le modèle</i>			1,0	28,9
<i>Pu_nTf (1carb) + Pu</i>	6,0(2) O à 2,37(2) Å $\sigma^2 = 0,005 \text{ \AA}^2$	1,0(2) Pu à 3,84(1) Å $\sigma^2 = 0,001 \text{ \AA}^2$	2,7	2,1 %
Pu₂Tf-Jeanson	3,5 O,N à 2,21(1) Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$	8,5 C à 3,33(3) Å $\sigma^2 = 0,011 \text{ \AA}^2$		
<i>Données publiées</i>			0,8	0,2
(Jeanson et al., 2010)	5,5 O,N à 2,37(1) Å $\sigma^2 = 0,005 \text{ \AA}^2$	4,7 C à 3,47(6) Å $\sigma^2 = 0,011 \text{ \AA}^2$	7,7	7,6 %

Cet ajustement avec notre modèle est indicatif car l'anion synergique diffère entre notre étude et celle réalisée par Jeanson (Jeanson et al., 2010). En première sphère, les deux couches ont des valeurs similaires aux données publiées par Jeanson, avec des distances moyennes de 2,19(6) Å et 2,37(2) Å contre 2,21(1) Å et 2,37(1) Å respectivement. En revanche, notre ajustement indique la présence d'une seule couche de carbones, contrairement aux données publiées pour lesquelles deux couches de carbone ont été utilisées. Néanmoins, notre couche de carbone a une distance moyenne de 3,33(3) Å, similaire à l'une des deux couches observées par Jeanson. L'ajout de la contribution Pu...Pu dans l'ajustement du spectre de Jeanson, affiche une distance moyenne de 3,84(1) Å similaire à la distance obtenue dans nos ajustements décrits dans le Tableau 24.

L'ajout du plutonium dans l'ajustement du spectre Pu₂Tf de Jeanson donne de meilleurs paramètres avec notamment le facteur d'amplitude global S_0^2 qui est de 1,0 contre 0,8 dans les données publiées (Jeanson et al., 2010). De plus, le facteur de concordance Facteur-R est également amélioré. Il apparaît donc que

dans nos conditions expérimentales, ainsi que dans celles de Jeanson en 2010, la présence de dimères Pu-Pu semble être avérée. Nous reviendrons sur ce point dans la partie 4 de ce chapitre.

Après avoir identifié l'implication d'une contribution Pu-Pu, nous avons défini plus précisément le nombre de carbonates dans l'environnement proche du Pu. Pour réaliser cette approche, une comparaison des données ajustées, par le modèle en Figure 80, avec une stœchiométrie variable est présentée dans le Tableau 24. Dans ces ajustements, la stœchiométrie des carbonates a été arbitrairement fixée entre 1 et 3 car il faut au moins 1 carbonate agissant comme anion synergique dans la structure du lobe. De plus, au-delà de 3 carbonates, l'interaction du Pu avec la protéine semble compromise. Dans ces ajustements, le nombre total d'oxygène en première sphère varie peu (de 10,0 à 10,5).

Pour ces trois ajustements, la première sphère est composée de deux couches d'oxygène distinctes. D'après le modèle Pu₂Tf (*1carb*), la première couche est caractéristique des atomes d'oxygène provenant des carbonates tandis que la deuxième couche correspond aux atomes d'oxygène des acides aminés et de l'eau.

Dans la deuxième sphère, les ajustements indiquent également deux couches d'atomes de carbone en plus de celle de plutonium. La première couche correspond aux atomes de carbone provenant uniquement des carbonates tandis que la deuxième couche correspond aux atomes de carbone provenant des acides aminés bidente et monodente.

Tableau 24 : Paramètres structurels les mieux ajustés obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS Pu₂Tf (exp). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.

Modèle :	Première sphère	Deuxième sphère	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Facteur - Q Facteur - R
Pu₂Tf (1carb) + Pu				
<i>Ajustement avec 1 carbonate</i>	2,4(1) O à 2,18(7) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	1 (fixe) C à 2,80(16) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	1,0	2,5
	8,3(2) O à 2,35(7) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	4,1(6) C à 3,23(32) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	2,60	0,7 %
<i>Ajustement avec 2 carbonates</i>	4,1(2) O à 2,27(3) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	2 (fixe) C à 2,80(16) Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$	1,0	3,4
	6,1(2) O à 2,40(2) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	5,0(7) C à 3,25(34) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	5,52	0,9 %
		0,8(2) Pu à 3,86(8) Å $\sigma^2 = 0,003 \text{ \AA}^2$		
<i>Ajustement avec 3 carbonates</i>	6,2(2) O à 2,31(7) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	3 (fixe) C à 2,81(17) Å $\sigma^2 = 0,009 \text{ \AA}^2$	1,0	4,4
	4,2(2) O à 2,44(2) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$	5,6(8) C à 3,25(34) Å $\sigma^2 = 0,009 \text{ \AA}^2$	6,80	1,3%
		0,8(3) Pu à 3,86(1) Å $\sigma^2 = 0,006 \text{ \AA}^2$		

Dans le Tableau 24, l'augmentation du nombre de carbonates détériore les paramètres d'ajustement du décalage en énergie ΔE_0 mais aussi du facteur de concordance de l'ajustement et du facteur de qualité. Il semble donc que l'ajustement ne comprenant qu'un seul carbonate soit le plus probable bien que les données avec 2 carbonates puissent être également considérés. En revanche, l'ajustement avec 3 carbonates présente un ΔE_0 important et un facteur d'accord nettement détérioré.

En résumé :

L'ajustement du spectre expérimental du complexe Pu₂Tf avec le modèle Pu_NTf (*Icarb*) avec un atome de plutonium révèle une première sphère de coordination composée de 2,42(2) et 8,3(2) O avec des distances de 2,19(6) Å et 2,36(7) Å. Dans le modèle de dynamique moléculaire Pu₂Tf (*Icarb*), deux couches d'oxygènes sont également présentes à 2,24(2) Å et environ 2,45(7) Å provenant, respectivement, des oxygènes du carbonate et des molécules d'eau et acide aminés. Les données sont donc cohérentes bien que les valeurs expérimentales soient légèrement plus courtes. De plus, les données publiées par Jeanson, avec du NTA comme anion synergique (Tableau 23), rapportent également deux couches d'oxygène distinctes : 3,5 O à 2,21(1) Å et 5,5 O à 2,37(1) Å (Jeanson et al., 2010). Bien que l'anion synergique soit différent dans cette étude, les distances obtenues sont similaires aux nôtres.

La deuxième sphère contient également deux couches composées d'un atome de carbone de carbonate avec une distance de 2,80(16) Å et de 4,4(6) atomes de carbone avec une distance de 3,23(33) Å. Dans le modèle de dynamique moléculaire Pu₂Tf (*Icarb*), la distance Pu...C des carbonates est de 2,66(2) Å et la distance Pu...C des acides aminés est de 3,4(4) Å. Ces données sont cohérentes. La deuxième distance semble indiquer que les acides aminés ont un mélange d'interaction monodente et bidente. Les données publiées par Jeanson indiquent deux couches de carbone à 3,33(3) Å et à 3,47(6) Å avec l'utilisation du NTA comme anion synergique (Jeanson et al., 2010). Ces données sont assez différentes des nôtres, car dans le cas du NTA aucune distance Pu...C courte n'est observée, néanmoins ces distances sont proches de la deuxième couche Pu...C obtenue lors de nos ajustements.

Enfin, la distance Pu...Pu est peu impactée par la variation du nombre de carbonates et indique 0,8(2) Pu à une distance de 3,85(3) Å. Ceci concorde avec la distance d'un composé colloïdal de plutonium (Ekberg et al., 2013).

c) Ajustement des données EXAFS du complexe Th₂Tf

L'ajustement du spectre expérimental du complexe Th₂Tf a été réalisé en prenant le même modèle de dynamique moléculaire Pu_NTf (*I carb*) contenant un atome de Pu, à environ 3,85 Å, mais en remplaçant Pu par Th. Les mêmes contributions ont été considérées. Enfin, l'ajustement a été réalisé avec un carbonate. Les données obtenues sont indiquées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Paramètres structuraux les mieux ajustés obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS Th₂Tf (exp). σ^2 est le facteur Debye Waller du chemin de diffusion considéré. S_0^2 est le facteur d'amplitude globale, ΔE_0 est le seuil d'énergie, Facteur-R est le facteur de concordance de l'ajustement en % et Facteur-Q est le facteur de qualité (χ^2 réduit) de l'ajustement. Les incertitudes indiquées entre parenthèses sont liées au dernier chiffre.

Modèle :	Première sphère	Deuxième sphère	S_0^2 ΔE_0 (eV)	Facteur - Q Facteur - R
Th _N Tf (1carb) + Th				
<i>Ajustement avec 1 carbonate</i>	2,2(2) O à 2,26(1) Å $\sigma^2 = 0,005 \text{ \AA}^2$	1 (<i>fixe</i>) C à 2,58(7) Å $\sigma^2 = 0,01 \text{ \AA}^2$	1,0	7,9
	8,2(2) O à 2,42(3) Å $\sigma^2 = 0,005 \text{ \AA}^2$	3,2 (5) C à 3,03(13) Å $\sigma^2 = 0,01 \text{ \AA}^2$	1,79	1,2 %
		2(1) Th à 3,88(3) Å $\sigma^2 = 0,01 \text{ \AA}^2$		

Les données sont similaires aux données précédemment décrites pour le complexe Pu₂Tf. La contraction actinidique de Th à Pu est notamment visible sur la première sphère de coordination ($\Delta \sim 0,06 \text{ \AA}$). Compte tenu de la similitude des résultats obtenus, nous pouvons donc en déduire que Pu et Th interagissent avec la transferrine de manière similaire.

4. Hypothèses sur la structure de la sphère de coordination de Pu et Th dans le complexe M₂Tf

La présence de ce dimère An(IV)...An(IV) dans les complexes An₂Tf amène à considérer deux hypothèses.

La première hypothèse serait la formation de colloïdes, très minoritaires, non détectables par UV-Visible. Un schéma simple la représente sur la Figure 84.

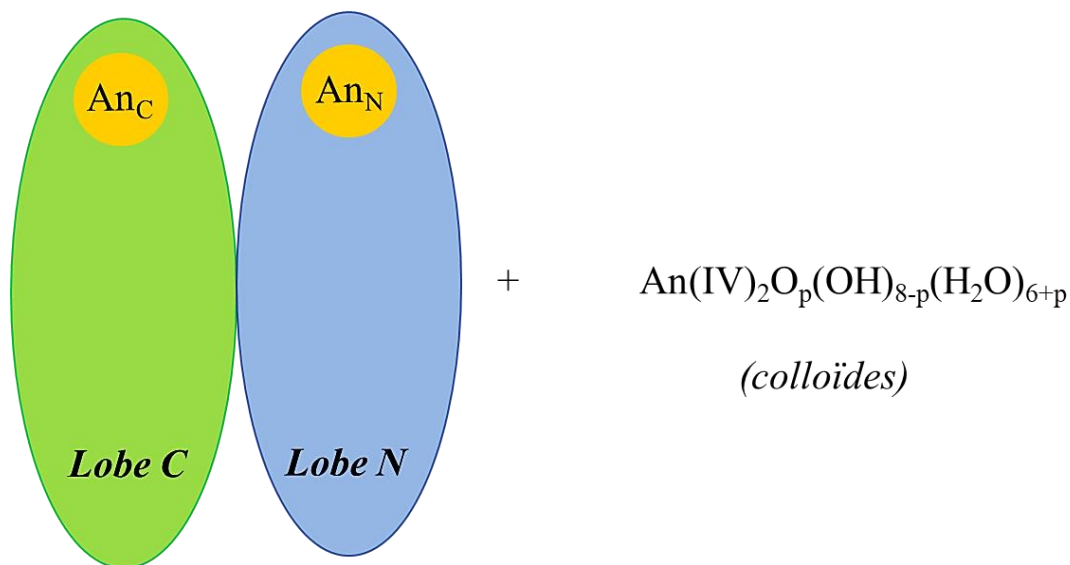


Figure 84 : Schéma de la première hypothèse de la présence d'une distance An(IV)...An(IV) par un colloïde dans le milieu (An = Th, Pu)

La deuxième hypothèse est l'inclusion d'un dimère An(IV)-An(IV) dans les lobes de la transferrine, noté dans ce cas $(\text{An}_2)_2\text{Tf}$, et illustrée sur la Figure 85.

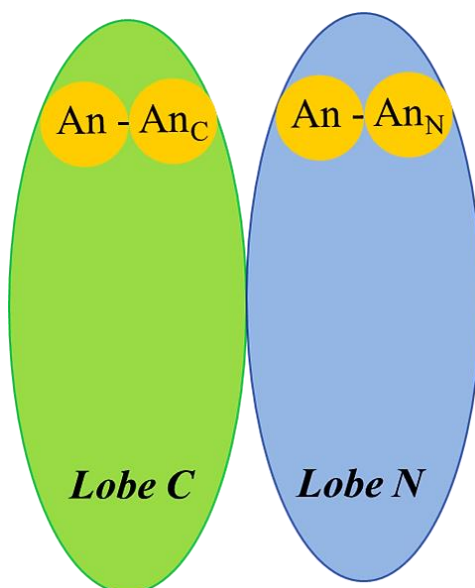
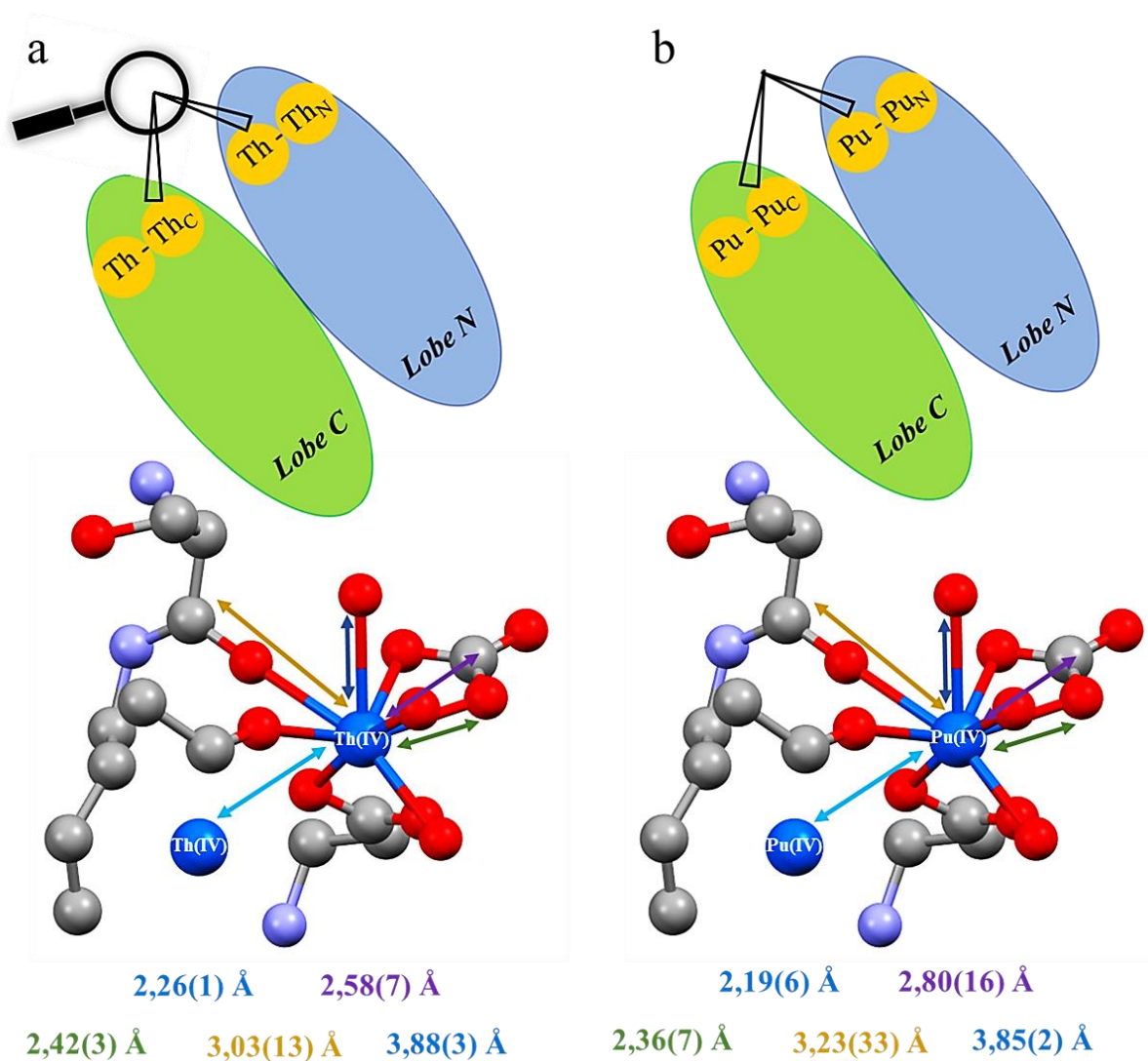


Figure 85 : Schéma de la deuxième hypothèse de la présence d'une distance An(IV)...An(IV) par la formation d'un dimère dans les lobes de la transferrine (An = Th, Pu)

Dans le cas où une formation de dimère au sein des lobes de la transferrine serait envisagée cela exigerait d'avoir un rapport stœchiométrique de 4 An(IV) pour une transferrine. Or dans la réalisation de ces complexes, décrits en Annexe A, le rapport utilisé était de 2,2 An(IV) pour une transferrine. Un léger

excès a été utilisé afin de considérer une potentielle saturation de la protéine puis l'échantillon a été rincé plusieurs fois afin d'éliminer les An(IV) non fixés à la protéine. Cependant, si un tel complexe $(An_2)_2Tf$ est considéré, il est probable que notre complexe réalisé n'est pas totalement saturé en An(IV). De plus, la littérature autour des données EXAFS sur de tel complexe Pu_2Tf est très restreinte.

Les distances obtenues dans les complexes An_2Tf ($An = Th, Pu$) peuvent être comparées avec les distances d'une structure cristalline de Fe_2Tf (PDB : 1N04) (Thakurta, Dasgupta et Dattagupta, 2003). Un dessin schématique des différentes structures avec ces distances est illustré sur la Figure 86.



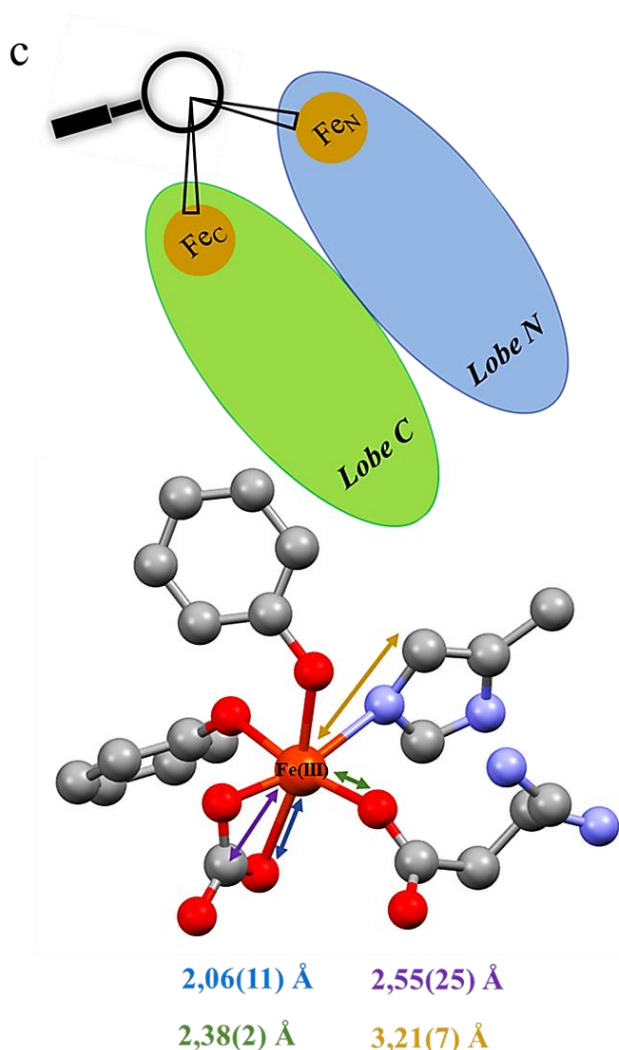


Figure 86 : a) Schéma du complexe $(Th_2)_2Tf$ et environnement local du Th après l'analyse par EXAFS ; b) Schéma du complexe $(Pu_2)_2Tf$ et environnement local du Pu après l'analyse par EXAFS ; c) Schéma de la holotransferrine et environnement local du Fe(III) issu de la structure cristalline de la holotransferrine issue de la PDB : 1N04 (Thakurta et al., 2003).

Les distances moyennes $M...X$ (avec $M = Fe, Th, Pu$ et $X = O/N$ et C), dans chaque environnement local, ont été représentées par des flèches de couleurs identiques avec les valeurs correspondantes.

La comparaison des distances moyennes indique que les distances du Pu_2Tf et Th_2Tf concordent avec les distances moyennes du complexe Fe_2Tf malgré d'importantes incertitudes dans les distances $M...C$ ($M = Th, Pu$). Pour les complexes Pu_2Tf et Th_2Tf , un atome lourd, Pu pour le complexe Pu_2Tf et Th pour le complexe Th_2Tf , serait présent à environ 3,85 Å de l'atome central.

Pour tenter d'amener de nouveaux éléments en vue de trancher cette question, la structure tertiaire de la protéine a été analysée par SAXS.

III. Analyse de la conformation des complexes de la transferrine et influence de l'ajout d'un sidérophore dans le milieu

Après avoir décrit l'environnement local du Pu(IV) et du Th(IV) liés à la transferrine, une analyse sur la conformation de la protéine a également été réalisée avec pour objectif d'observer un éventuel changement de conformation de la protéine après complexation et de comparer la structure tertiaire des différents complexes de la transferrine.

Rappelons que l'apotransferrine a une conformation dite « ouverte ». Après la complexation des lobes par deux atomes de Fe(III), ces lobes se rapprochent et confèrent à la protéine un changement structurel induisant une conformation dite « fermée » (Cheng et al., 2004). Lorsque l'apotransferrine est complexée par deux atomes de Pu(IV), il semblerait que la conformation globale reste inchangée (M. P. Jensen et al., 2011). Les données de Jensen semblent montrer que les atomes de Pu(IV) ne parviennent pas à induire un changement conformationnel de la protéine.

1. Description de la SAXS et analyse des spectres de diffusion de nos complexes

La SAXS ou Small Angle X-Ray Scattering (*Diffusion des Rayons X aux Petits Angles en français*) est une puissante méthode d'analyse pour la détermination de paramètres dimensionnels et de la structure de particules nanoscopiques. La SAXS est notamment très utilisée pour déterminer les conditions oligomères ainsi que les structures tertiaires et quaternaires des protéines en solution (Mertens et Svergun, 2010). Cette technique repose sur la diffusion d'un faisceau de rayons X monochromatique par l'échantillon à des angles très petits. Après regroupement isotrope des données l'intensité diffusée est généralement tracée en fonction du vecteur de transfert Q :

$$Q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

Où θ représente l'angle de diffusion du faisceau et λ la longueur d'onde.

La SAXS a été utilisée dans ce travail pour comparer les structures tertiaires des complexes de transferrine, avec et sans DFOB (dont ceux analysés par EXAFS dans la partie précédente), à celle de l'apotransferrine. Ces spectres ont été enregistrés sur la ligne MARS du synchrotron SOLEIL avec un

faisceau d'énergie de 16 keV. Une description détaillée de l'expérience est donnée en Annexe B (Dumas et al., 2022).

Il est important de noter que selon l'énergie du faisceau incident, l'analyse SAXS peut engendrer une dégradation de la protéine, et conduire à des dommages de l'échantillon rendant l'analyse structurale incorrecte. Lors de cette analyse, une étude statistique a été réalisée, en mesurant dix fois chaque complexe, afin de vérifier que les échantillons ne sont pas endommagés sous le faisceau, et en l'absence d'endommagement de calculer un spectre moyen, la variance et le coefficient de variation moyen. Le milieu tampon utilisé lors de la réalisation des complexes ainsi que les cellules vides ont été analysés dans les mêmes conditions. Ces données sont présentées en Annexe B.

Pour tous les échantillons analysés, le coefficient de variation moyen entre les spectres est inférieur à 3% sauf pour les mesures Pu₂Tf n°2 (4,57%) et Th₂Tf n°1 (34,50%) (confère Tableau 30 en Annexe B). Au-delà d'une probable variation de l'intensité du faisceau sur la mesure, ce problème semble être issu du transfert de flux de données, lié à la répétition de courtes acquisitions et au temps réel de réponses entre les différents dispositifs de la ligne de lumière. Pour l'échantillon Th₂Tf n°1, le coefficient de variation moyen est réduit de 34,50% à 2,17% en omettant la mesure du spectre divergeant.

Si une dégradation était la cause de cette variation importante, des coefficients de variation moyens importants auraient été observés pour toutes les mesures consécutives. De plus, aucune variation de la forme des spectres enregistrés n'est observée (illustrée en Annexe B) ce qui justifie que la dégradation de la protéine n'est pas la cause de ces écarts importants. Globalement, l'acquisition des spectres pour un même échantillon est répétable et montre que la protéine ne s'est pas dégradée sous faisceau car les écarts calculés sont similaires à ceux observés dans notre milieu tampon seul ainsi que dans les cellules vides.

Une première analyse par spectrophotométrie UV-Visible des complexes Pu₂Tf, Pu₂Tf-DFOB, Pu-DFOB et de l'apoTf et de la DFOB a permis de mettre en évidence une possible présence d'un complexe ternaire entre la transferrine, le Pu(IV) et la DFOB (confère Figure 102 de l'Annexe E). Il apparaît donc que la protéine ne semble pas être décomplexée par la DFOB, comme suggéré dans la littérature avec le Fe(III) (Bellotti et Remelli, 2021).

Les spectres SAXS moyens des complexes Pu₂Tf, Th₂Tf, Fe₂Tf, Th₂Tf-DFOB, Fe₂Tf-DFOB, Pu₂Tf-DFOB sont représentés en Figure 87. L'allure des spectres des différents complexes est comparée au spectre de l'apotransferrine.

L'allure de ces spectres montre une remontée du signal de diffusion vers les petits vecteurs Q. Comme dans l'étude de Jensen et al., cette dernière est attribuée au signal de diffusion de la protéine (M. P.

Jensen et al., 2011). On observe également deux courbures dans la chute d'intensité diffusée qui indiquent deux dimensions distinctes dans la structure de la protéine.

La première courbure aux plus petits angles, entre $0,03 \text{ nm}^{-1}$ jusqu'à $0,09 \text{ nm}^{-1}$ et la deuxième courbure, entre $0,1 \text{ nm}^{-1}$ jusqu'à $0,22 \text{ nm}^{-1}$, sont respectivement caractéristiques d'une grande et d'une petite dimension de la protéine.

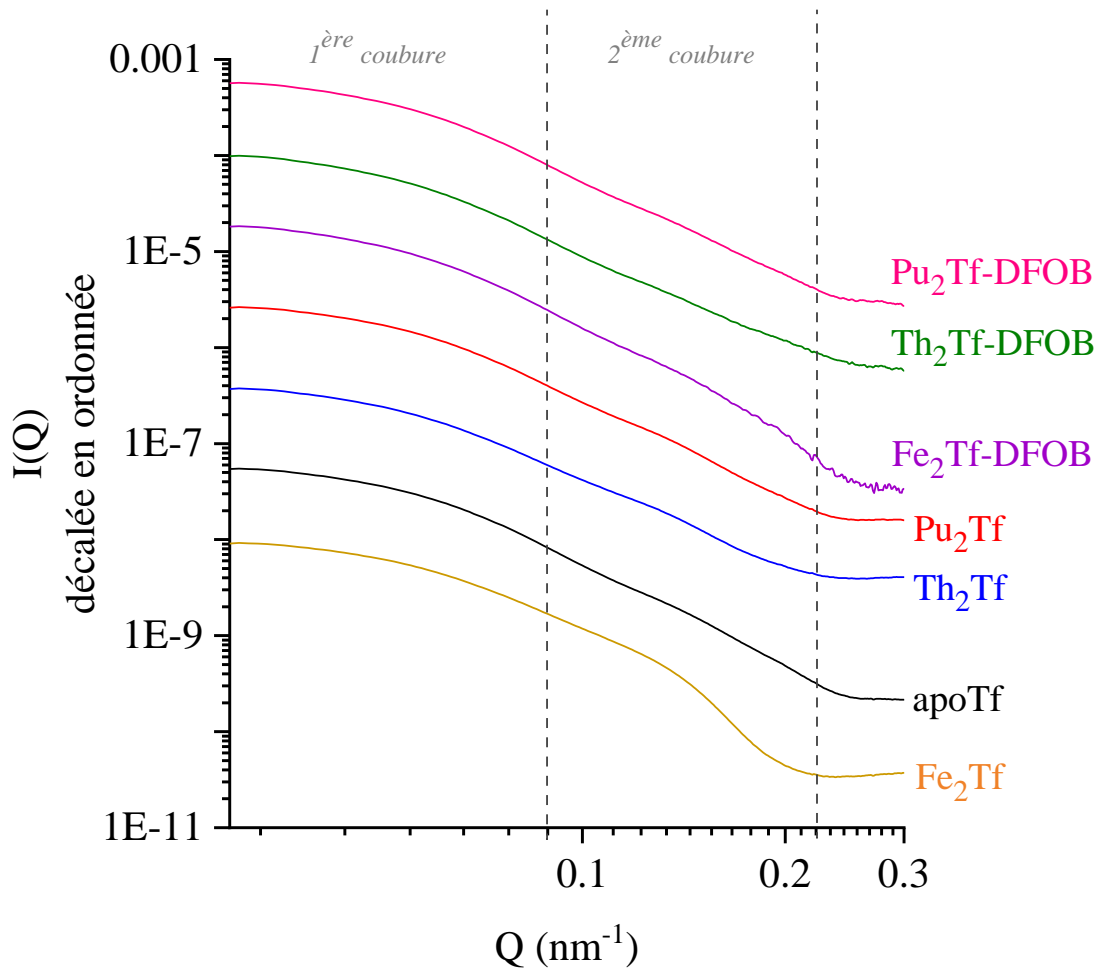


Figure 87 : Spectres de diffusion de l'apotransferrine, des complexes M_2Tf et M_2Tf -DFOB à pH physiologique.

En première analyse, il peut être observé que la première courbure des spectres SAXS est similaire pour les différents complexes analysés. En revanche, la deuxième courbure présente des différences distinctes selon le complexe analysé. Le spectre du complexe Fe_2Tf présente une deuxième courbure plus nette et légèrement plus courte par rapport au spectre de l'apotransferrine. Cette modification indique une variation de la dimension la plus courte. Les spectres des complexes Th_2Tf et Pu_2Tf possèdent également ces deux courbures mais la seconde est plus atténuée que pour le complexe Fe_2Tf et se rapproche plus

de celle de l'apoTf. Ces premières indications confirment que la complexation de la protéine influe sur sa conformation.

L'ajout de DFOB dans le milieu, atténue également cette deuxième courbure et semble même la décaler vers les grands Q lorsque l'on compare les spectres de Fe₂Tf et de Fe₂Tf-DFOB. Cette distinction est plus délicate lorsque l'on compare les spectres Th₂Tf et Pu₂Tf par rapport aux spectres Th₂Tf-DFOB et Pu₂Tf-DFOB, cependant, il semblerait que l'ajout de la DFOB lisse la deuxième courbure des spectres.

2. Analyse du rayon de giration des complexes de la transferrine par l'approximation de Guinier

Pour obtenir des informations plus quantitatives, une analyse de Guinier a été effectuée sur l'ensemble des données en considérant la première courbure des spectres pour définir un rayon de giration des complexes, noté R_g. Ce rayon de giration est obtenu en utilisant l'approximation de Guinier qui exprime l'intensité diffusée selon la loi suivante :

$$\text{Sphère} : I(Q) = I(0) \exp\left(\frac{-Q^2 R_g^2}{3}\right)$$

Où I(0) est l'intensité diffusée quand Q tend vers 0.

L'approximation de Guinier est valide pour les vecteurs de diffusion q tels que qR << 1 (Lairez, 2003). Le rayon de giration obtenu est fonction des distances r_i à partir du centre de gravité des N particules pouvant s'écrire :

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_i^N r_i^2$$

(Lairez, 2003)

Le rayon de giration permet de retrouver les dimensions de la particule étudiée si sa géométrie est connue. Dans notre cas, le R_g nous donne une indication sur la dimension moyenne de la particule analysée. Les données mesurées ont été ajustées par l'approximation de Guinier dans la région des faibles Q de 0,030 nm⁻¹ et 0,085 nm⁻¹ (Figure 88).

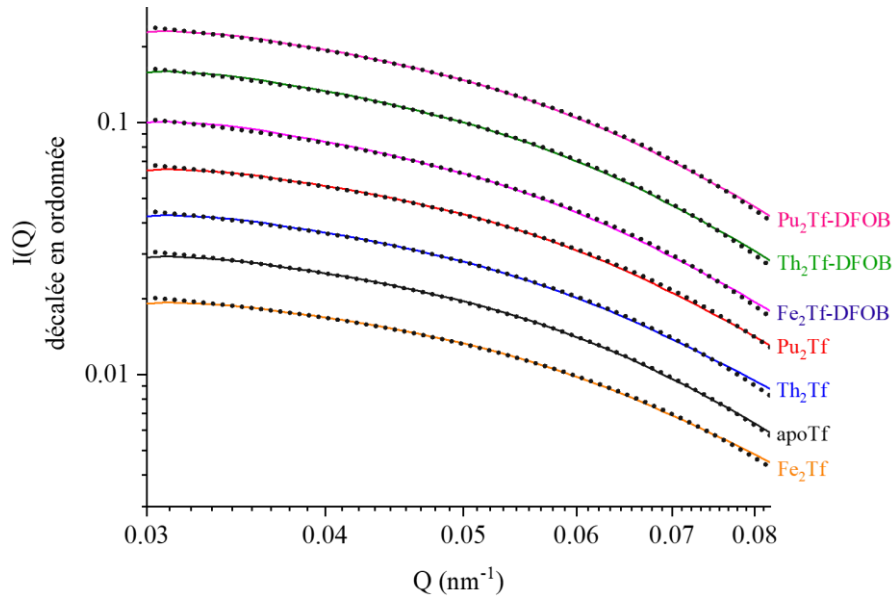


Figure 88 : Spectres de diffusion de l'apotransferrine, des complexes M_2Tf et $M_2Tf-DFOB$, à pH physiologique, centrés sur la région du Guinier. Chaque spectre à sa courbe de Guinier ajustée en pointillés.

Les valeurs de rayons de giration ajustées sont comparées à celles également obtenues par l'approximation de Guinier dans la littérature (Tableau 26). On remarque que cette méthode permet de distinguer des différences entre les rayons de giration de l'ordre de l'angström avec une précision de 0,4 Å environ.

Tableau 26 : Ajustement de la première courbure, par l'approximation de Guinier, des spectres SAXS de l'apotransferrine, des complexes M_2Tf et $M_2Tf-DFOB$ (pH ~ 7,4 ; I = 0,05 M) en utilisant le logiciel SASView© (« SASView », 2021). χ^2 représente l'erreur de l'ajustement. Les données de la littérature sont également répertoriées (M. P. Jensen et al., 2011)^a, (Yajima et al., 1998)^b

Echantillon	Rayon de giration (Å)	Erreur d'ajustement χ^2	Données publiées
<i>apoTf</i>	$28,7 \pm 0,1$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	30,3 ^b
<i>Th₂Tf</i>	$28,9 \pm 0,3$	$4,7 \cdot 10^{-6}$	
<i>Pu₂Tf</i>	$28,8 \pm 0,2$	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$34,2 \pm 0,6^a$
<i>Fe₂Tf</i>	$27,6 \pm 0,1$	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$29,3^b / 33,2 \pm 0,4^a$
<i>Th₂Tf-DFOB</i>	$30,5 \pm 0,3$	$7,3 \cdot 10^{-7}$	
<i>Pu₂Tf-DFOB</i>	$30,4 \pm 0,2$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	
<i>Fe₂Tf-DFOB</i>	$30,3 \pm 0,2$	$9,9 \cdot 10^{-7}$	

Les modifications structurales lors de la complexation, sont très faibles mais elles sont rendues visibles lorsque ces protéines sont sondées par SAXS. Les rayons de giration obtenus par ajustement de ces spectres avec l'approximation de Guinier permettent de visualiser ces légères modifications.

D'après ces ajustements, le rayon de giration de l'apotransferrine est de $28,7 \pm 0,1$ Å tandis que celui du complexe Fe_2Tf est de $27,6 \pm 0,1$ Å. Cette première comparaison indique que le complexe Fe_2Tf adopte une conformation différente de celle de l'apotransferrine, avec une différence de conformation de $1,1 \pm 0,2$ Å. Lors de la complexation, comme suggéré dans l'étude de Cheng et al., (Cheng et al., 2004) les lobes se rétractent autour du Fe(III), causant ainsi une légère modification structurale de la protéine. Cette différence de conformation est schématisée dans la Figure 89. D'après la littérature, le complexe Fe_2Tf a une conformation fermée, tandis que l'apoTf a une conformation ouverte.

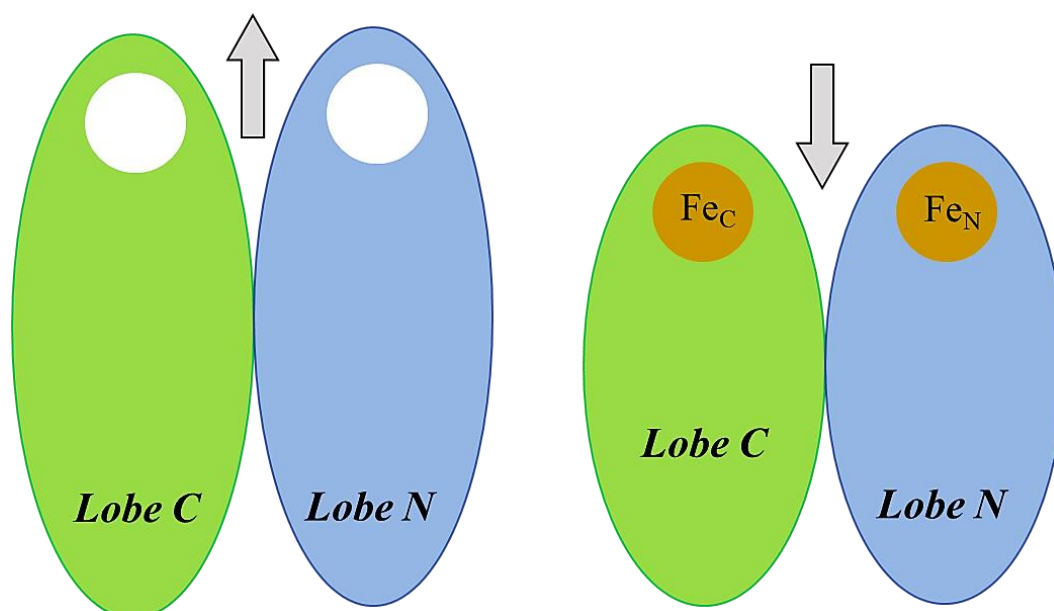


Figure 89 : Différence de conformation entre l'apoTf (à gauche) et le Fe_2Tf (à droite). La flèche vers le haut indique une conformation ouverte et celle vers le bas une conformation fermée.

Yajima (Yajima et al., 1998), a comparé les rayons de giration de l'apoTf et du Fe_2Tf et a observé une variation du rayon de giration allant de $30,3$ Å à $29,3$ Å respectivement, avec ici encore une différence entre ces deux rayons d'environ 1 Å.

Notons que les différences de rayon entre ces données publiées et celles observées lors de notre étude peuvent provenir de la composition du milieu. En effet, les conditions d'analyse des échantillons de Yajima comprenaient une concentration en protéine d'environ $1,3 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ dans un milieu tampon composé de Tris-HCl ($0,05$ mol.L⁻¹) et de NaHCO₃ ($0,03$ mol.L⁻¹) à pH = 8 tandis que nos échantillons

avaient une concentration en protéine d'environ $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un milieu tampon composé de MES ($0,15 \text{ mol.L}^{-1}$) et de NaCl ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) à $\text{pH} \sim 7,4$.

Pour les complexes Th_2Tf et Pu_2Tf , les rayons de giration de $28,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$ et $28,8 \pm 0,2 \text{ \AA}$ respectivement, sont très proches et comparables à celui de l'apotransferrine ($28,7 \pm 0,1 \text{ \AA}$). Le Th(IV) et le Pu(IV) liés à la protéine semblent contraindre leur incorporation dans les lobes de la protéine et donc limiter le repliement des lobes, comme illustré en Figure 90. Ceci a pour conséquence de conserver une conformation ouverte, similaire à celle de l'apoTf, pour les complexes Th_2Tf et Pu_2Tf .

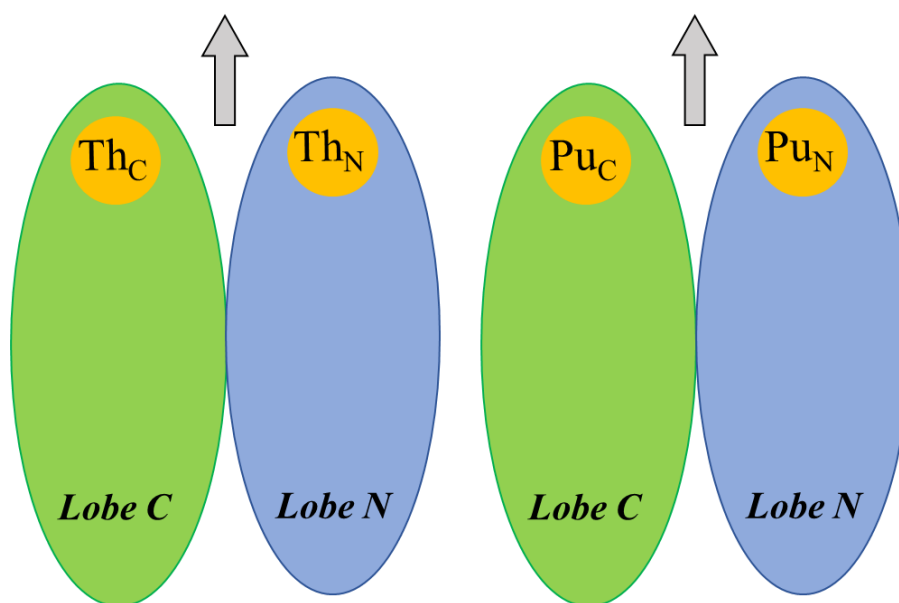


Figure 90 : Schéma de la conformation du complexe Th_2Tf (à gauche) et Pu_2Tf (à droite). Les flèches vers le haut indiquent une conformation ouverte.

Une étude antérieure de Jensen a évalué les rayons de giration des complexes Fe_2Tf et Pu_2Tf , à $33,2 \pm 0,4$ et $34,2 \pm 0,6$ respectivement (M. P. Jensen et al., 2011). Cette étude observe également un rayon de giration plus important pour le complexe Pu_2Tf que Fe_2Tf indiquant une structure différente et donc une conformation ouverte pour le Pu_2Tf . Une diminution de $1,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ est également observée entre ces deux complexes.

Par ailleurs, les rayons de giration des modèles Pu_2Tf (1 carb), Pu_2Tf (2 carb) et Pu_2Tf (3 carb), calculés par dynamique moléculaire, sont de $30,06 \pm 0,24 \text{ \AA}$, $30,43 \pm 0,14 \text{ \AA}$ et $30,03 \pm 0,10 \text{ \AA}$ respectivement. Ces données indiquent que le nombre de carbonates n'influe pas sur le rayon de giration et que ces trois modèles possèdent la même conformation. D'après nos données et celles observées par Jensen, ces complexes semblent donc adopter une conformation ouverte similaire à l'apoTf (M. P. Jensen et al., 2011).

L'hypothèse supposant un mélange de Pu_2Tf et de colloïdes de Pu dans la solution peut en première approximation être écartée. D'après une étude récente de Micheau et al., les particules de plutonium, obtenues dans un milieu acide ($\text{pH} \sim 1,5$) possèdent un rayon de giration R_g de $10,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$ environ (Micheau et al., 2020), caractérisée par une courbure à environ $Q \sim 2 \text{ nm}^{-1}$ sur les données SAXS, qui n'a pas été observée sur nos spectres. Les deux courbures observées sur nos spectres sont caractéristiques de notre protéine car elles sont également observées en l'absence de Pu (sur nos spectres de l'apoTf ou de Fe_2Tf et sur ceux de la littérature (M. P. Jensen et al., 2011)). De plus, lors des analyses par EXAFS, aucune indication ne laisse suggérer une présence observable de colloïdes. Il faut toutefois noter que les spectres SAXS et EXAFS donnent une information moyennée de toutes les particules présentes dans le milieu analysé. La présence de colloïdes de Pu en petite proportion donnerait lieu à un signal peu intense qui serait moyenné avec celui des protéines.

En ce qui concerne la présence de dimères de plutonium dans chaque lobe de la transferrine, les données SAXS ne nous permettent pas d'invalider cette hypothèse. Cependant, la présence d'un dimère dans chaque lobe de la transferrine ne semble pas modifier davantage le rayon de giration de la protéine car nos données sont en bon accord avec la littérature publiée par Jensen (M. P. Jensen et al., 2011).

L'ajout de la DFOB au complexe M_2Tf fait augmenter le rayon de Guinier à $30,4 \pm 0,2 \text{ \AA}$ et $30,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$ pour les complexes $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ et $\text{Th}_2\text{Tf-DFOB}$ et à $30,3 \pm 0,2 \text{ \AA}$ pour le complexe $\text{Fe}_2\text{Tf-DFOB}$. Ces données suggèrent donc que la DFOB se lie partiellement au métal en interaction avec la transferrine ce qui augmente donc le rayon de Guinier global du complexe. En effet, Bellotti et Remelli ont observé que la DFOB ne décomplexe pas totalement la protéine (Bellotti et Remelli, 2021). Le Pu et le Th semblent ne pas être incorporés dans la protéine et peuvent donc également interagir avec la DFOB, et former un complexe ternaire avec la protéine. Dans le cas du Fe, qui permet à la protéine d'adopter une conformation fermée, la DFOB semble interagir partiellement avec le Fe, qui entraîne une ouverture des lobes de la protéine lors de la formation du complexe ternaire $\text{Fe}_2\text{Tf-DFOB}$. Un schéma simple illustre ces structures en Figure 91.

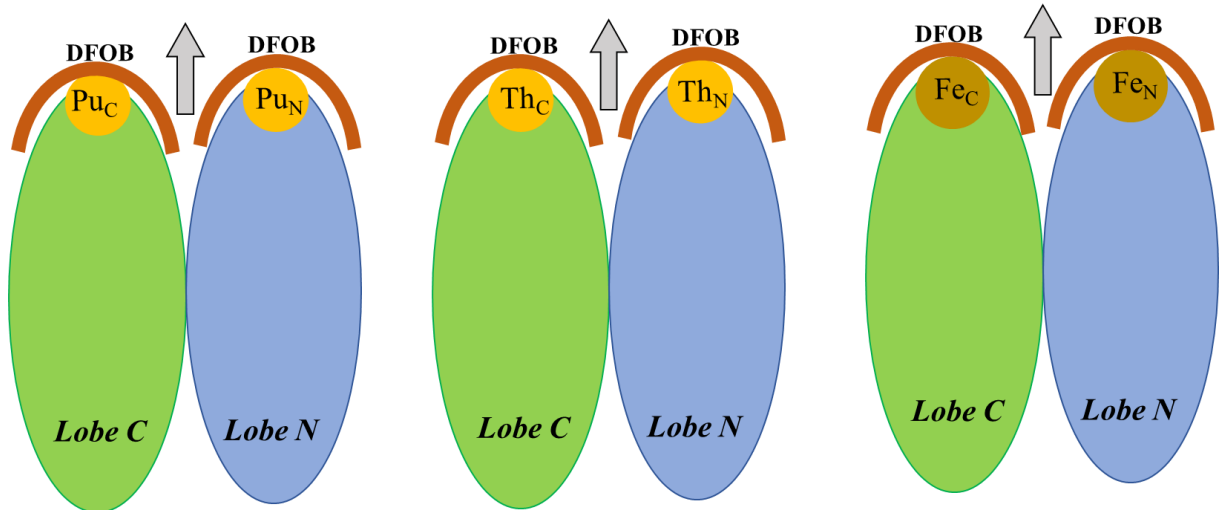


Figure 91 : Comparaison des structures Th₂Tf-DFOB (à gauche), Pu₂Tf-DFOB (au centre) et Fe₂Tf-DFOB (à droite). Les flèches vers le haut indiquent une conformation ouverte.

3. Tentative d'ajustement des spectres SAXS des complexes de la transferrine avec un facteur de forme simple

Pour aller plus loin dans l'analyse quantitative de ces données, ces dernières ont été ajustées par un modèle analytique considérant une forme non sphérique des objets diffusants. Les équations générales de la diffusion expriment l'intensité diffusée en fonction d'un facteur de forme $P(Q)$ et d'un facteur de structure $S(Q)$:

$$I(q) = \phi \cdot v \cdot \Delta\rho^2 \cdot P(q) \cdot S(q)$$

Avec ϕ : la fraction volumique d'espèces diffusantes, v : le volume de l'espèce diffusante et $\Delta\rho$: le contraste de densité de longueur de diffusion entre l'espèce diffusante et son milieu dispersif.

Un travail de reconstruction structurale de la transferrine sérique de bovin diférrique (Figure 92) a été réalisée par Jensen à partir des données SAXS de cette protéine et a montré que la structure cristalline de la protéine peut être considérée comme allongée (M. P. Jensen et al., 2011).

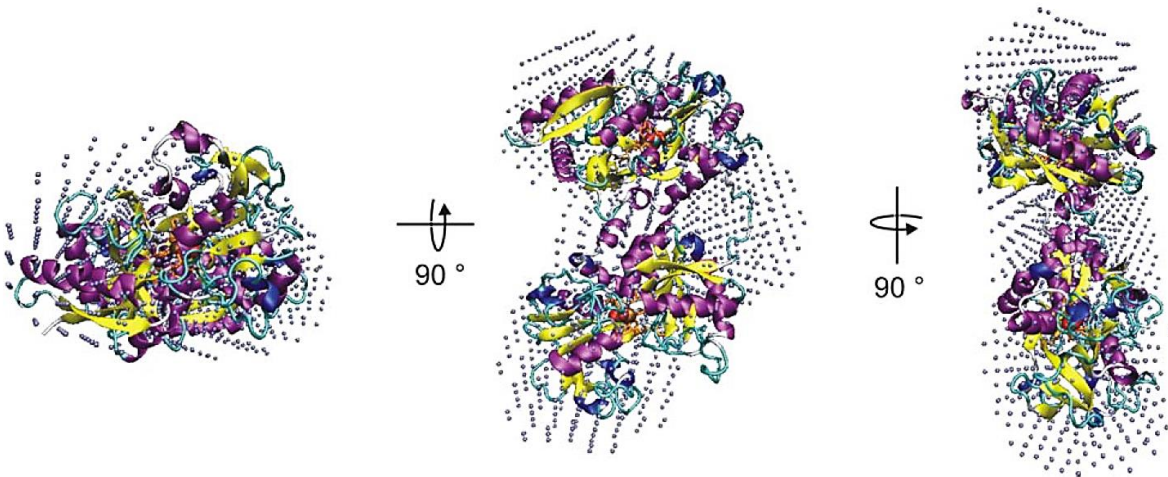


Figure 92 : Modèle à basse résolution de la transferrine sérique de bovin diférique issu de la reconstruction de forme à partir des données SAXS (M. P. Jensen et al., 2011).

Ces données suggèrent que la géométrie de la transferrine peut être décrite par différentes formes telles qu'une structure en bâtonnet, une structure en haltère ou une structure ellipsoïdale allongée comme illustrées en Figure 93. Le signal SAXS de nos complexes a donc été ajusté avec différents facteurs de forme simulant ces différentes géométries.

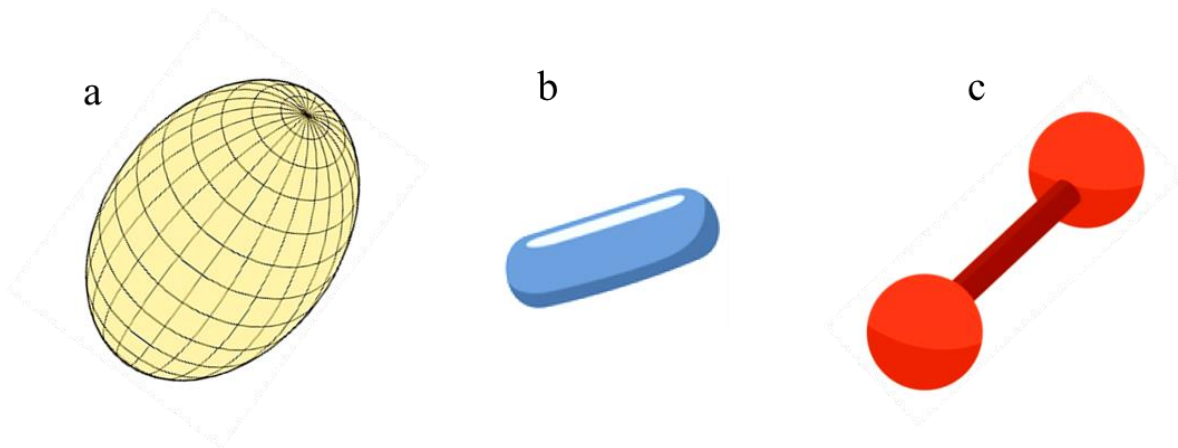


Figure 93 : Formes géométriques utilisées comme facteur de forme : a) ellipsoïde de révolution allongée (prolate), b) bâtonnet, c) haltère

Bien que ces formes puissent en première approximation être considérées comme proches de la géométrie de la protéine proposée par Jensen, il n'a pas été possible d'ajuster les données avec ces modèles. En revanche, un facteur de forme d'ellipsoïde de révolution aplatie (oblate) comme illustrée sur la Figure 94 a permis de simuler les données en donnant accès à deux dimensions de la protéine. Cette structure présente un rayon polaire (la plus courte distance) noté c sur la Figure 94, et un rayon équatorial (la plus grande distance) noté a sur la Figure 94.

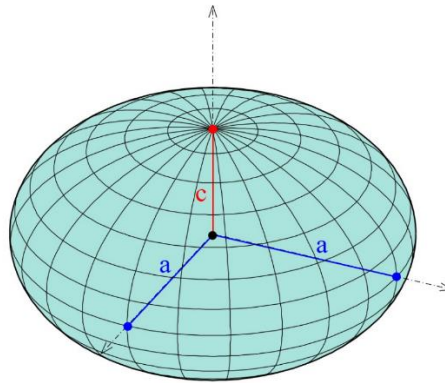


Figure 94 : Représentation des différents rayons qui composent une structure ellipsoïdale de révolution aplatie (oblate)

Les ajustements des données correspondant aux complexes Fe_2Tf , Pu_2Tf , $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ et l'apoTf sont présentés en Figure 95. Le signal du solvant a été soustrait, en amont de l'ajustement de ces spectres avec le facteur de forme d'un ellipsoïde.

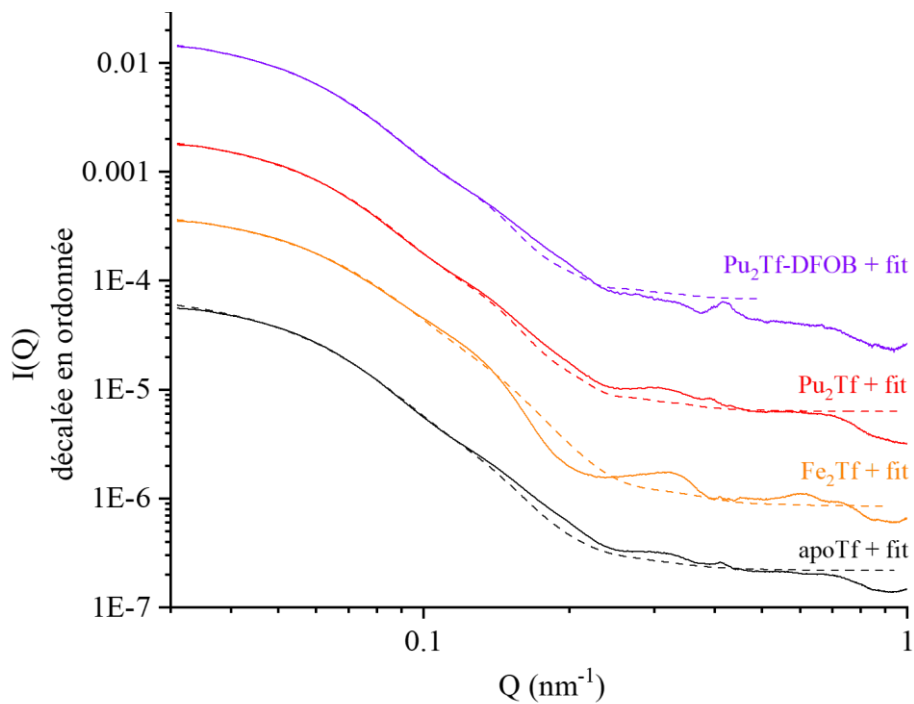


Figure 95 : Spectres SAXS des complexes Fe_2Tf , Pu_2Tf , $\text{Pu}_2\text{Tf-DFOB}$ et apoTf (ligne pleine) et leur ajustement par une structure ellipsoïdale (pointillés)

Il apparaît que ce modèle d'ellipsoïde permet de reproduire la présence des deux courbes même si l'ajustement de la chute d'intensité après la seconde nécessiterait d'être encore optimisé. Des oscillations

sont également visibles après soustraction du solvant aux Q supérieurs à $0,2 \text{ nm}^{-1}$. Ces dernières qui ne semblent pas être en lien avec le facteur de forme des protéines, n'ont à ce jour pas pu être interprétées. Pour confirmer si ces oscillations sont en lien avec le facteur de forme, il pourrait être envisagé d'appliquer des modèles plus complexes comme le programme DADIMODO qui permet d'affiner la structure des protéines (Evrard, Mareuil, Bontems, Sizun et Perez, 2011). Nos ajustements donnent cependant, grâce à un modèle relativement simple, une indication complémentaire sur la géométrie et sur les deux dimensions de la protéine : le rayon équatorial qui est le rayon de la plus grande dimension et le rayon polaire qui correspond à la plus petite dimension. Les valeurs ajustées obtenues sont regroupées dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Paramètres des facteurs de forme des spectres SAXS ajustés par une structure ellipsoïdale

Échantillon	Rayon polaire (Å)	Rayon équatorial (Å)	Erreur d'ajustement χ^2
<i>apoTf</i>	$16,1 \pm 0,1$	$45,3 \pm 0,3$	5.10^{-6}
<i>Fe₂Tf</i>	$13,9 \pm 0,1$	$43,8 \pm 0,2$	9.10^{-6}
<i>Pu₂Tf</i>	$15,5 \pm 0,2$	$45,9 \pm 0,1$	3.10^{-6}
<i>Pu₂Tf-DFOB</i>	$16,3 \pm 0,2$	$47,1 \pm 0,3$	6.10^{-6}

Les légères modifications structurales entre les conformations ouverte et fermée de la protéine, sont encore mieux mises en évidence par ces ajustements. Le rayon polaire est le plus affecté par le changement de conformation des complexes analysés. En effet, une diminution de ce rayon, passant de $16,1 \pm 0,1 \text{ Å}$ à $13,9 \pm 0,1 \text{ Å}$, pour l'*apoTf* et le *Fe₂Tf* respectivement, est observée lors d'un changement de conformation de la protéine. De manière similaire, le rayon polaire du *Pu₂Tf* est légèrement plus petit que celui de l'*apoTf* ce qui peut induire une légère fermeture de la protéine en présence de Pu. En revanche, le rayon polaire du complexe *Pu₂Tf-DFOB* est plus important que celui de l'*apoTf*. En comparaison, le rayon équatorial des différents complexes ajustés n'est que faiblement impacté par les changements de conformation : il est similaire pour l'*apoTf* et le *Pu₂Tf*. En revanche pour le *Fe₂Tf* ce rayon est légèrement plus petit, ce qui peut indiquer que la plus grande distance est légèrement impactée lors d'une modification de conformation de la protéine. Ce raisonnement peut être similaire mais inversé pour le *Pu₂Tf-DFOB*.

Les données d'ajustement confirment que la protéine adopte une structure plus ellipsoïdale que sphérique, et avec une ellipsoïde aplatie plutôt qu'allongée contrairement à ce que suggèrent les résultats de Jensen. Les autres facteurs de forme testés pour mener ces ajustements conduisent à des courbes calculées plus éloignées des courbes expérimentales. La forme ellipsoïdale oblate (aplatie) peut donc être considérée comme une bonne approximation de la forme « enveloppe » de cette protéine, qui possède cependant une structure plus complexe.

Martel avait également déterminé la forme de la transferrine diferrique humaine par SANS (Small Angle Neutron Diffusion) en utilisant une structure ellipsoïdale aplatie et obtient $46,6 \pm 1,4 \text{ \AA}$ et $15,8 \pm 3,8 \text{ \AA}$ pour le rayon équatorial et radial respectivement (Martel et al., 1980). De plus, Martel observe également que la structure ellipsoïdale oblate est la meilleure approximation simple de la forme de la molécule de transferrine. Nos données obtenues par cette même approximation sont en bon accord avec celles publiées par Martel et nous conforte dans le choix de ce facteur de forme.

Bien qu'il existe très peu de données dans la littérature sur la conformation de la transferrine liée au Pu(IV), nous allons discuter nos observations en nous appuyant sur d'autres techniques sondant indirectement la conformation globale de ces complexes.

- Comparaison des rayons de giration de la protéine liée au Pu(IV) :

Nos données sur les rayons de giration de nos complexes An_2Tf appuient l'hypothèse que les $An(IV)$ liés à la protéine ne referment pas totalement les lobes. Cette observation est en accord avec les données publiées par Jensen concernant les rayons de giration des complexes Pu_2Tf et Fe_2Tf qui indiquent également une conformation ouverte pour le complexe Pu_2Tf (M. P. Jensen et al., 2011). De plus, la différence du rayon de giration entre le Pu_2Tf et la holotransferrine est similaire à la différence entre le Pu_2Tf et la holotransferrine. Ces observations suggèrent que la formation d'un complexe Pu_2Tf ne peut être discriminé d'un complexe Pu_2Tf , uniquement par une étude sur les rayons de giration.

- Analyse des lobes de la protéine et de différents complexes par cIEF :

Brulfert et ses collaborateurs ont réalisé une étude par cIEF (capillary isoelectric Focusing) couplée à l'UV, ou à une ICP-MS, de plusieurs complexes de transferrine avec leur point isoélectrique, noté pI (Brulfert et Aupiais, 2018). La cIEF permet de suivre les changements de pI causés par la complexation des métaux par la transferrine (Tableau 28). Ces changements de pI sont liés aux changements conformationnels déclenchés par la présence de fer ou de tout autre métal capable de pénétrer dans le site de liaison de la protéine.

Tableau 28 : Point isoélectrique (pI) des complexes Fe-, Th-, et Pu-transferrine (Brulfert et Aupiais, 2018)

Echantillon	pI
<i>apoTf</i>	6,07 ± 0,02
<i>Th_CTf / Th_NTf</i>	6,05 ± 0,02
<i>Pu_CTf</i>	6,02 ± 0,02
<i>Fe₂Tf</i>	5,63 ± 0,02

Le pI de l'apotransferrine est de $6,07 \pm 0,02$ tandis que celui de la holotransferrine est de $5,63 \pm 0,02$. En revanche, les complexes $Th_C Tf$, $Th_N Tf$ et $Pu_C Tf$ ont un pI proche de celui de l'apotransferrine. Ces données suggèrent que les deux lobes de la transferrine, liée au thorium, ne se referme pas. Si ces lobes étaient fermés, le pI de ces complexes se situerait entre le pI de l'apotransferrine et celui de la holotransferrine. Cette observation est identique pour le plutonium lié au lobe C de la transferrine. Le lobe C est intéressant car d'après l'étude de Jensen et ses collaborateurs, ce lobe est censé se refermer lorsque le Pu(IV) lui est lié (M. P. Jensen et al., 2011), ce qui semble contradictoire avec les valeurs de pI supportées par Brulfert. Une analyse, par cIEF, de la potentielle formation de dimère $(An_2)_2 Tf$ nous permettrait d'obtenir une information supplémentaire de comparaison avec les complexes $An_2 Tf$.

- Reconnaissance du récepteur de la transferrine avec les $An_2 Tf$:

Une étude réalisée par Deblonde sur la reconnaissance du récepteur de la transferrine avec la transferrine liée aux actinides montre que la conformation ouverte de la transferrine n'empêche pas une reconnaissance par son récepteur. Ces données obtenues par simulation de la reconnaissance du récepteur pour le $Pu_2 Tf$ et le $Th_2 Tf$ montre une interaction de l'ordre de 55% et de 35% respectivement. (Deblonde et al., 2013). Ces données semblent similaires avec les mesures par gel chromatographique pour le complexe $Pu_2 Tf$, réalisées par Jensen, pour lequel une interaction entre le récepteur et le $Pu_2 Tf$ est d'environ 30% (M. P. Jensen et al., 2011). Ces différentes études confirment donc que la transferrine du complexe $Pu_2 Tf$ semble avoir une conformation ouverte mais que celle-ci interagirait partiellement avec son récepteur transmembranaire et pourrait donc être internalisée.

IV. Conclusion sur l'interaction des An(IV) avec la transferrine

Ce travail sur les complexes M_2Tf , avec de nombreuses techniques d'analyse complémentaires, a mis en évidence la complexation du Th(IV) et du Pu(IV) par la transferrine avec le carbonate comme anion synergique. La structure des complexes a été comparée à différents modèles de la complexation du Pu(IV) par la transferrine, calculés par dynamique moléculaire. Ces modèles sont différenciés par la variation du nombre de carbonate en interaction avec le métal au sein de la transferrine.

Des mesures EXAFS ont permis de sonder l'environnement proche du métal complexé à la protéine. Ces données indiquent que la présence d'un carbonate est le plus probable. De plus, Th(IV) et Pu(IV) sont liés à des acides aminés bidentate et monodente. Ces données sont sensiblement identiques à l'interaction locale naturelle du Fe(III) avec la transferrine. Cependant, l'ajustement du spectre nécessite un atome d'An(IV) à 3,85(2) Å et 3,88(3) Å pour le Pu(IV) et le Th(IV) respectivement, sans valider pour autant la présence de colloïdes dans le milieu. Les analyses EXAFS nous indiquent donc soit la présence d'un dimère dans les lobes de la protéine de complexe, noté $(An_2)_2Tf$, soit un mélange du complexe An_2Tf avec des colloïdes.

Les mesures SAXS ne permet pas de discriminer l'une des deux hypothèses entre la formation de complexe $(An_2)_2Tf$ et la présence de particules colloïdales dans ces complexes. De plus, la comparaison des rayons de giration des complexes de la transferrine complexée par les An(IV), de la holotransferrine et de l'apotransferrine indique qu'un changement de conformation est uniquement visible pour le complexe Fe_2Tf . Nos données SAXS sont similaires aux données publiées par Jensen et indiquent que la formation du complexe Pu_2Tf possède une structure proche de celle de la apoTf. Enfin, une approche qualitative du facteur de forme de la protéine, par l'ajustement des spectres SAXS avec une structure ellipsoïdale a pu être envisagée.

Des études complémentaires de spectroscopie, lors de l'ajout d'un sidérophore, la déféroxamine B, indiquent que cette molécule ne peut décomplexer totalement la protéine mais forme un complexe ternaire dans lequel le métal est lié à la fois avec la transferrine mais aussi avec le sidérophore. Les mesures SAXS de ces complexes ternaires indiquent un rayon de giration d'environ 30,5 Å, nettement supérieur au rayon de giration de l'apotransferrine, et confirmé par l'approche qualitative du facteur de forme par une structure ellipsoïdale.

Par conséquent, les lobes de la protéine semblent s'adapter à la géométrie du cation car il semblerait que l'interaction locale du Pu(IV) dans les lobes de la transferrine, obtenue par dynamique moléculaire, est légèrement différente des données par IR du Fe(III). De plus, cette adaptation exerce une influence sur

la structure tertiaire de la protéine observée par analyse SAXS sondant la conformation globales de la transferrine liée aux An(IV). Par extension, ces modifications locales et structurelle peuvent induire une altération de sa fonction biologique notamment observée par la diminution de la reconnaissance du récepteur transmembranaire.

Conclusion et réflexion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à décrire les mécanismes d'interaction entre Pu(IV), Th(IV) et deux protéines impliquées dans l'homéostasie du fer. Pour mener à bien ces études, des analyses de spectroscopie XAS et de diffusion SAXS, couplées à des calculs de modèles protéiques par dynamique moléculaire, ont été élaborés.

Dans un premier temps, les investigations sur les interactions des An(IV) (An = Th, Pu), ont été menées sur la ferritine, dont le rôle est le stockage du fer au niveau cellulaire. La ferritine est composée d'un cœur ferrique entouré d'un anneau protéique. Les données obtenues sur la capacité d'accumulation du Th(IV) dans cette protéine montrent qu'environ 2840 atomes sont liés par protéine. De plus, cette accumulation semble localisée majoritairement dans l'anneau protéique ce qui serait comparable à l'accumulation du fer sur l'anneau protéique de la ferritine (Pan et al., 2009). Les données obtenues par spectroscopie XAS, couplées à un modèle calculé par dynamique moléculaire, ont permis d'amener des précisions sur l'environnement local des An(IV) liés à la ferritine, qui semble similaire entre le Th et le Pu. Les informations convergent sur la présence d'acides aminés carboxylés de la protéine dans la sphère de coordination des An(IV) (An = Th, Pu), en interaction monodente et bidente, ainsi que la présence de carbonate. De plus, des molécules d'eau pourraient compléter la sphère de coordination du métal.

Dans un deuxième temps, l'interaction entre les An(IV) et la transferrine a été étudiée, en utilisant la même méthodologie que lors de l'étude précédente. Les données indiquent la présence d'un carbonate bidente ainsi que des acides aminés bidente et monodente de la protéine. Ces données sont similaires entre le Pu et le Th et sont sensiblement identiques à l'interaction locale naturelle du Fe(III) avec la transferrine (Harris et al., 1998, 1981; H. Li et al., 1996). Néanmoins, contrairement au complexe holoTf (Fe₂Tf), il semblerait qu'un atome d'An(IV) soit présent à 3,85(2) Å et 3,88(3) Å pour le Pu(IV) et le Th(IV) respectivement. Ces investigations suggèrent donc que les complexes An₂Tf ont potentiellement une présence minoritaire de colloïde dans le milieu ou bien la transferrine peut contenir un dimère cationique dans chaque lobe, de forme (An₂)₂Tf.

La structure tertiaire des complexes An₂Tf a été analysée par diffusion SAXS, et comparée au complexe naturel d'holotransferrine ainsi qu'à l'apotransferrine. Aucun changement significatif de conformation n'a été constaté entre l'apoTf et les complexes An₂Tf. En revanche, le complexe naturel d'holotransferrine Fe₂Tf se révèle être en conformation fermée. Nos observations sont similaires à la littérature qui suggère que l'apoTf, comme les complexes An₂Tf adoptent une conformation ouverte tandis que le complexe Fe₂Tf, a une conformation fermée (M. P. Jensen et al., 2011; Yajima et al., 1998).

Par conséquent, l'inclusion d'un dimère An-An au sein des lobes de la transferrine, si elle est avérée, ne semble pas modifier la structure tertiaire par rapport aux complexes An₂Tf.

Enfin, l'ajout du sidérophore déféroxamine B aux complexes An₂Tf semble conduire à la formation d'un complexe ternaire dans lequel le métal est lié à la fois à la protéine et au sidérophore. Ces observations sont consolidées par les analyses de diffusion SAXS qui montrent une structure plus ouverte dans ces conditions que pour l'apoTf.

Plus globalement, ce travail de thèse a permis d'amener des précisions sur les interactions locales des An(IV) avec deux protéines impliquées dans le cycle du fer mais aussi d'étudier l'influence de ces interactions sur la structure tertiaire de la protéine (Tf). Ce travail met en avant que les techniques d'analyses par spectroscopie XAS et par diffusion SAXS ne suffisent pas à elles-mêmes pour avoir une vision globale de ces interactions. En parallèle, des modèles calculés par dynamique moléculaire sont nécessaires afin d'explorer plus précisément ces interactions. En effet, le calcul réalisé avec la structure complète de la protéine permet de visualiser les modifications structurales après complexation. La combinaison de la spectroscopie XAS et de diffusion SAXS avec ces calculs ouvre un nouveau champ de réflexion et d'appréciation quant à ces interactions sur les protéines de manière générale.

- Géométrie de la structure des sites de complexation des protéines :

Lors de notre travail, il a été montré que les lobes de la transferrine semblent s'adapter à la géométrie du cation, mais que cette adaptation exerce une influence sur la structure tertiaire de la protéine, ce qui peut induire une altération de sa fonction. En effet, la transferrine adopte une géométrie bien définie pour s'adapter à la sphère de coordination du cation. Cette adaptabilité est localisée au sein des sites de complexation des deux lobes qui la composent et peut engendrer des modifications de la structure tertiaire. La souplesse de ces systèmes est principalement due à la structure secondaire, et plus particulièrement à la souplesse des hélices α par rapport aux feuillets β . C'est cette souplesse qui permet donc à la transferrine de pouvoir changer de conformation.

La transferrine, est une protéine pouvant complexer, en plus du Fe(III) naturel, une large variété d'ions métalliques comme la plupart des métaux de la première ligne des éléments de transition, quelques cations de la deuxième et troisième ligne, les métaux du groupe XIII, ainsi que plusieurs lanthanides et actinides (E.N. Baker, 1994). La flexibilité locale au niveau des lobes peut-être la raison pour laquelle de nombreux cations se lient à la transferrine (E.N. Baker, 1994; Harris, Yang, Abdollahi et Hamada, 1999). Cette flexibilité impacte la sphère de coordination du métal, qui varie légèrement par rapport à celle du Fe(III), due à de légers déplacements du cation et de l'anion synergique carbonate. Ainsi, le site de complexation des lobes de la transferrine possède en général une géométrie octaédrique avec des

ligands "durs" parfaitement adaptée au cation Fe(III), mais possède également une flexibilité suffisante pour chélater d'autres cations, de taille différente et de charge inférieure. L'affinité de la transferrine est néanmoins supérieure pour le Fe(III) que pour les autres cations (Harris et al., 1999; Holm, Kennepohl et Solomon, 1996).

L'adaptabilité des sites de complexation influence, sur une plus grande échelle, la structure tertiaire de la transferrine, à savoir l'ouverture ou la fermeture de ses lobes. Harris et ses collaborateurs suggèrent que la taille de l'ion n'est pas le seul facteur provoquant une éventuelle modification de la structure (Harris et al., 1999). En effet, la tendance à l'hydrolyse en plus du nombre de coordination du métal, différent de celui du Fe(III), est également à considérer (H. M. Baker et al., 2000). De plus, étant donné que le cation impose la géométrie d'interaction, le site de la transferrine se modifie de sorte à pouvoir se lier à l'actinide. Nous pouvons imaginer que cette modification peut, sans doute, entraîner également l'insertion d'un deuxième actinide dans le même lobe, amenant à la formation des complexes $(An_2)_2Tf$.

Dans le cas de la ferritine, la protéine peut interagir avec d'autres métaux que le Fe(II), comme le Th(IV) et le Pu(IV) (Chandramouli et al., 2019; Honarmand Ebrahimi et al., 2015). Cette réflexion est également rapportée par Maity et ses collaborateurs qui ont étudié les interactions de la ferritine avec du Pd(II) (Maity et al., 2019). L'auteur rapporte que la surface externe de l'anneau protéique complexe les atomes de Pd(II) sans avoir de sélectivité particulière. Cependant, peu d'atomes de Pd(II) interagissent avec les canaux triples C3 dans la protéine. Ces canaux font la liaison entre la surface externe et la cavité interne de la protéine et semblent être sélectifs des cations. Ces canaux ne peuvent pas s'adapter et modifier leur structure car ils sont issus de l'assemblage des sous-unités qui composent la protéine.

Ces réflexions, autour de la géométrie et de l'interaction entre les métaux et les protéines permettent d'expliquer les différentes interactions observées durant notre travail, et montrent que ces mécanismes sont plus complexes qu'il n'y paraît.

- Influence de la structure globale de la transferrine complexée par les An(IV) et étude biologique :

Dans le cycle de la transferrine, décrit dans le Chapitre 4, la protéine, une fois complexée, doit interagir avec son récepteur transmembranaire afin d'être internalisée dans la cellule. Ce récepteur a la particularité d'interagir majoritairement avec la conformation fermée mais faiblement avec la conformation ouverte (Deblonde et al., 2013; M. P. Jensen et al., 2011). Après avoir suggéré l'existence des complexes $(An_2)_2Tf$ observés dans notre travail de thèse, des études de reconnaissance entre ces complexes et le récepteur nous permettraient d'observer si une interaction est possible en vue d'une future internalisation cellulaire. Les complexes An_2Tf possèdent une conformation ouverte et semblent

être similaires aux complexes An_2Tf cités dans la littérature par Jensen. Ces données semblent indiquer que le dimère ne modifie pas davantage la structure globale de la protéine. Des études de Deblonde et Jensen ont montré que le récepteur peut interagir avec des complexes Pu_2Tf et les internaliser dans des cellules surrénales (Deblonde et al., 2013; M. P. Jensen et al., 2011).

Enfin, un dernier axe de recherche serait de mimer le cycle du fer avec les $An(IV)$, de la complexation avec la transferrine, en passant par une probable internalisation cellulaire des $An(IV)$, jusqu'au stockage par la ferritine située au sein de la cellule. Ce type d'étude est encore très complexe et difficilement réalisable. Pour réaliser une telle étude, une lignée cellulaire d'un organe cible du $Pu(IV)$ devrait être envisagée. De plus, cette lignée devrait synthétiser la ferritine in situ durant la manipulation et posséder un récepteur transmembranaire de la transferrine. En parallèle, une caractérisation des complexes Pu_2Tf , dans des conditions biologiques serait nécessaire en amont, cependant le Pu reste un élément assez délicat à manipuler et sa chimie riche complexifie davantage cette étude.

Références

- Addison, G. M., Beamish, M. R., Hales, C. N., Hodgkins, M., Jacobs, A. et Llewellyn, P. (1972). An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology*, 25(4), 326-329. doi:10.1136/jcp.25.4.326
- Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. 1.* (1990) (1. ed, vol. 1-2, vol. 20). Oxford : Pergamon Press.
- Ahmed, U. et Meehan, D. N. (2016). *Unconventional oil and gas resources: exploitation and development*. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group.
- AIEA. (2021). *Agence Internationale de l'Energie Atomique*. Repéré à <https://www.iaea.org/>
- Ali, M., Kumar, A., Kumar, M. et Pandey, B. N. (2016). The interaction of human serum albumin with selected lanthanide and actinide ions: Binding affinities, protein unfolding and conformational changes. *Biochimie*, 123, 117-129. doi:10.1016/j.biochi.2016.01.012
- Altmaier, M., Gaona, X. et Fanghänel, T. (2013). Recent advances in aqueous actinide chemistry and thermodynamics. *Chemical Reviews*, 113(2), 901-943. doi:10.1021/cr300379w
- Ammerich, M., Frot, P., Gambini, D.-J., Gauron, C., Herberet, G., Lahaye, T., ... Rannou, A. (2014a). IRSN - ED 4320 - Plutonium-239. Dans *Radioprotection : radionucléides* (1ere éd., p. 1-11).
- Ammerich, M., Frot, P., Gambini, D.-J., Gauron, C., Herberet, G., Lahaye, T., ... Rannou, A. (2014b). IRSN - ED 4321 - Uranium naturel. Dans *Radioprotection : radionucléides* (1ere éd., p. 1-12).
- Ammerich, M., Frot, P., Gambini, D.-J., Gauron, C., Herberet, G., Lahaye, T., ... Vial, E. (2013). IRSN - ED 4317 - Thorium-232. Dans *Radioprotection : radionucléides* (1ere éd., p. 1-12).
- Anderson, G. J. et Frazer, D. M. (2005). Recent advances in intestinal iron transport. *Current Gastroenterology Reports*, 7(5), 365-372. doi:10.1007/s11894-005-0005-1
- Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 341, 4986-1995. doi:10.1056/NEJM199912233412607
- Andrews, S. C., Harrison, P. M., Yewdall, S. J., Arosio, P., Levi, S., Bottke, W., ... Lobreaux, S. (1992). Structure, function, and evolution of ferritins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 47(1), 161-174. doi:10.1016/0162-0134(92)84062-R
- Ansoborlo, E., Prat, O., Moisy, P., Den Auwer, C., Guilbaud, P., Carriere, M., ... Moulin, V. (2006). Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie*, 88(11), 1605-1618. doi:10.1016/j.biochi.2006.06.011
- Appenroth, K.-J. (2010). Definition of "heavy metals" and their role in biological systems. Dans *Soil Heavy Metals* (vol. 19, p. 19-29). Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-02436-8_2
- Arogunjo, A. M., Höllriegel, V., Giussani, A., Leopold, K., Gerstmann, U., Veronese, I. et Oeh, U. (2009). Uranium and thorium in soils, mineral sands, water and food samples in a tin mining area in Nigeria with elevated activity. *Journal of Environmental Radioactivity*, 100(3), 232-240. doi:10.1016/j.jenvrad.2008.12.004
- Arosio, P., Carmona, F., Gozzelino, R., Maccarinelli, F. et Poli, M. (2015). The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochemical Journal*, 472(1), 1-15. doi:10.1042/BJ20150787
- Arosio, P. et Levi, S. (2002). Guest Editor: Mario Comporti. *Free Radic. Biol. Med.*, 33(4), 457-463. doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00842-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00842-0)
- Aryal, B. P., Gorman-Lewis, D., Paunesku, T., Wilson, R. E., Lai, B., Vogt, S., ... Jensen, M. P. (2011). Plutonium uptake and distribution in mammalian cells: Molecular vs. polymeric plutonium. *International Journal of Radiation Biology*, 87(10), 1023-1032. doi:10.3109/09553002.2011.584941
- Ashiotis, G., Deschildre, A., Nawaz, Z., Wright, J. P., Karkoulis, D., Picca, F. E. et Kieffer, J. (2015). The fast azimuthal integration Python library: pyFAI. *Journal of Applied Crystallography*, 48(2), 510-519. doi:10.1107/S1600576715004306
- Atwood, D. A. (2010). *Radionuclides in the environment*. John Wiley & Sons.
- Ault, T., Gosen, B. V., Krahn, S. et Croff, A. (2016). Natural thorium resources and recovery: options and impacts. *Nuclear Technology*, 194(2), 136-151. doi:10.13182/NT15-83
- Bacelo, D. E. et Binning, R. C. (2011). Modeling the diiron(II) ferroxidase complex in human H ferritin. *Chemical Physics Letters*, 507(1-3), 174-177. doi:10.1016/j.cplett.2011.03.083
- Baker, Edward N. et Lindley, P. F. (1992). New perspectives on the structure and function of transferrins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 47(1), 147-160. doi:10.1016/0162-0134(92)84061-Q
- Baker, E.N. (1994). Structure and reactivity of transferrins. Dans *Advances in Inorganic Chemistry* (vol. 41, p. 389-463). Elsevier. doi:10.1016/S0898-8838(08)60176-2

- Baker, H. M., Baker, C. J., Smith, C. A. et Baker, E. N. (2000). Metal substitution in transferrins: specific binding of cerium(IV) revealed by the crystal structure of cerium-substituted human lactoferrin. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(6), 692-698. doi:10.1007/s007750000157
- Bali, P. K. et Harris, W. R. (1990). Site-specific rate constants for iron removal from diferric transferrin by nitrilotris(methylenephosphonic acid) and pyrophosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281(2), 251-256. doi:10.1016/0003-9861(90)90440-A
- Balian, R. (2018, juin). Comment Becquerel a été amené à découvrir la radioactivité de l'uranium, p. 1-7.
- Banyard, S. H., Stammers, D. K. et Harrison, P. M. (1978). Electron density map of apoferritin at 2.8-Å resolution. *Nature*, 271, 282-284. doi:https://doi.org/10.1038/271282a0
- Bard, Allen. J., Parsons, R. et Jordan, J. (1985). *Standard potentials in aqueous solution* (1st ed.). New York : M. Dekker.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004
- Barth, A. et Zscherp, C. (2002). What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4), 369-430. doi:10.1017/S0033583502003815
- Beaugelin-Seiller, B., Fraysse, B. et Roussel-Debet, S. (2004). IRSN - Fiche radionucléide : Plutonium et environnement.
- Beaumont, C. et Karim, Z. (2013). Actualité du métabolisme du fer. *La Revue de Médecine Interne*, 34(1), 17-25. doi:10.1016/j.revmed.2012.04.006
- Bellotti, D. et Remelli, M. (2021). Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules*, 26(11), 3255. doi:10.3390/molecules26113255
- Bertini, I., Lalli, D., Mangani, S., Pozzi, C., Rosa, C., Theil, E. C. et Turano, P. (2012). Structural Insights into the ferroxidase site of ferritins from higher eukaryotes. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14), 6169-6176. doi:10.1021/ja210084n
- Bou-Abdallah, F. (2010). The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 719-731. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.021
- Bou-Abdallah, F., Zhao, G., Biasiotto, G., Poli, M., Arosio, P. et Chasteen, N. D. (2008). Facilitated diffusion of iron(II) and dioxygen substrates into human H-chain ferritin. A fluorescence and absorbance study employing the ferroxidase center substitution Y34W. *Journal of the American Chemical Society*, 130(52), 17801-17811. doi:10.1021/ja8054035
- Bou-Abdallah, F., Zhao, G., Mayne, H. R., Arosio, P. et Chasteen, N. D. (2005). Origin of the unusual kinetics of iron deposition in human H-chain ferritin. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11), 3885-3893. doi:10.1021/ja044355k
- Boukhalfa, H., Reilly, S. D. et Neu, M. P. (2007). Complexation of Pu(IV) with the Natural Siderophore Desferrioxamine B and the Redox Properties of Pu(IV)(siderophore) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 46(3), 1018-1026. doi:10.1021/ic061544q
- Brulfert, F. et Aupiais, J. (2018). Topological speciation of actinide–transferrin complexes by capillary isoelectric focusing coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry: evidence of the non-closure of the lobes. *Dalton Transactions*, 47(30), 9994-10001. doi:10.1039/C8DT01616J
- Bulletin of the Atomic Scientists. (2022). *Bulletin of the Atomic Scientists*. Repéré à <https://thebulletin.org/doomsday-clock/>
- Cai, H.-H., Cai, J. et Yang, P.-H. (2009). Electrochemical activity of holotransferrin and its electrocatalysis-mediated process of artemisinin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(3), 863-866. doi:10.1016/j.bmcl.2008.12.004
- Capdevila, H., Vitorge, P., Giffaut, E. et Delmau, L. (1996). Spectrophotometric study of the dissociation of the Pu(IV) carbonate limiting complex. *Radiochimica Acta*, 74(s1), 93-98. doi:10.1524/ract.1996.74.special-issue.93
- Cattan, D. (2004). Régulation de l'absorption du fer : données nouvelles. *EMC - Hépatologie*, 1(2), 82-97. doi:10.1016/j.emchep.2004.03.002
- Cavézian, R., Pasquet, G., Bel, G. et Baller, G. (2006). *Imagerie dento-maxillaire. Approche radio-clinique* (3eme éd.). Masson.
- Chandramouli, B., Del Galdo, S., Mancini, G. et Barone, V. (2019). Mechanistic insights into metal ions transit through threefold ferritin channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(2), 472-480. doi:10.1016/j.bbagen.2018.11.010
- Chasteen, N. D. et Harrison, P. M. (1999). Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 182-194. doi:10.1006/jsbi.1999.4118
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. et Walz, T. (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 116(4), 565-576. doi:10.1016/S0092-8674(04)00130-8
- Chikh, Z., Ha-Duong, N.-T., Miquel, G. et El Hage Chahine, J.-M. (2006). Gallium uptake by transferrin and interaction with receptor 1. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(1), 90-100. doi:10.1007/s00775-006-0169-7
- Choppin, G. R. (1983). Solution chemistry of the actinides. *Ract*, 32(1-3), 43-54. doi:10.1524/ract.1983.32.13.43
- Choppin, G. R. et Wong, P. J. (1998). The chemistry of actinide behavior in marine systems. *Aquatic Geochemistry*, 4, 77-101. doi:https://doi.org/10.1023/A:1009679303073

- Ciacchi, L. C. et Payne, M. C. (2004). The entry pathway of O₂ into human ferritin. *Chemical Physics Letters*, 390(4-6), 491-495. doi:10.1016/j.cplett.2004.04.069
- Clark, D. L. (2000). The Chemical Complexities of Plutonium, (26), 19.
- Clark, D. L., Conradson, S. D., Keogh, D. W., Palmer, P. D., Scott, B. L. et Tait, C. D. (1998). Identification of the limiting species in the plutonium(IV) carbonate system, solid state and solution molecular structure of the [Pu(CO₃)₅]⁶⁻ Ion. *Inorganic Chemistry*, 37(12), 2893-2899. doi:10.1021/ic971190q
- Clark, D. L., Hobart, D. E. et Neu, M. P. (1995). Actinide carbonate complexes and their Importance in actinide environmental chemistry. *Chemical Reviews*, 95(1), 25-48. doi:10.1021/cr00033a002
- Codd, R., Richardson-Sanchez, T., Telfer, T. J. et Gotsbacher, M. P. (2018). Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. *ACS Chemical Biology*, 13(1), 11-25. doi:10.1021/acscchembio.7b00851
- Cohen, D. (1961). The absorption spectra of plutonium ions in perchloric acid solutions. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 18, 211-218. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1902(61)80390-4
- Connick, R. E. (1949). Mechanism of the disproportionation of plutonium (V). *Journal of the American Chemical Society*, 71(5), 1528-1533. doi:10.1021/ja01173a002
- Conrad, M. E. et Umbreit, J. N. (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 29(3), 336-355. doi:10.1006/bcmd.2002.0564
- Creff, G., Safi, S., Roques, J., Michel, H., Jeanson, A., Solari, P.-L., ... Den Auwer, C. (2016). Actinide(IV) deposits on bone : potential role of the osteopontin–thorium complex. *Inorganic Chemistry*, 55(1), 29-36. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b02349
- Danon, J. (1956). Adsorption of thorium by anion-exchange resins from nitric acid media. *Journal of the American Chemical Society*, 78(22), 5953-5954. doi:10.1021/ja01603a064
- Deblonde, G. J.-P., Sturzbecher-Hoehne, M., Mason, A. B. et Abergel, R. J. (2013). Receptor recognition of transferrin bound to lanthanides and actinides: a discriminating step in cellular acquisition of f-block metals. *Metallomics*, 5(6), 619. doi:10.1039/c3mt20237b
- Degtyarenko, K. (2005). Metalloproteins. *Specialist Review*, 1-29. doi:10.1002/047001153X
- Delaby, C., Deybach, J.-C. et Beaumont, C. (2007). L'hépcidine et le métabolisme du fer. *La Revue de Médecine Interne*, 28(7), 510-512. doi:10.1016/j.revmed.2007.03.009
- Delacroix, D., Guerre, J. P. et Leblanc, P. (2006). *Radionucléides et radioprotection* (EDP Sciences).
- Despres, A. (1995). Les sources de plutonium dans l'environnement. *Revue Générale de l'Électricité S.A.*, p. 1-6.
- Dewan, J. C., Mikami, B., Hirose, M. et Sacchettini, J. C. (1993). Structural evidence for a pH-sensitive dilysine trigger in the hen ovotransferrin N-lobe: Implications for transferrin iron release. *Biochemistry*, 32(45), 11963-11968. doi:https://doi.org/10.1021/bi00096a004
- Douglas, T. et Ripoll, D. R. (1998). Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin. *Protein Science*, 7(5), 1083-1091. doi:10.1002/pro.5560070502
- Duca, G., Anghel, L. et Erhan, R. V. (2018). Structural aspects of lactoferrin and serum transferrin observed by FT-IR spectroscopy. *Chemistry Journal of Moldova*, 13(1), 111-116. doi:10.19261/cjm.2018.482
- Duckworth, O. W., Bargar, J. R. et Sposito, G. (2009). Quantitative Structure–Activity Relationships for Aqueous Metal–Siderophore Complexes. *Environmental Science & Technology*, 43(2), 343-349. doi:10.1021/es802044y
- Duffield, J. R. (1987). A spectroscopic study on the binding of plutonium(IV) and its chemical analogues to transferrin. *Inorganica Chimica Acta*, 140(15), 365-367. doi:https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)81125-1
- Duffield, J. R., Taylor, D. M. et Proctor, S. A. (1986). The binding of plutonium to transferrin in the presence of tri-n-butyl phosphate or nitrate and its release by diethylenetriaminepenta-acetate and the tetrameric catechoylamide ligand LICAMC(C). *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*, 12(6), 483-487. doi:10.1016/S0047-0740(86)80012-2
- Dumas, T., Viro, M., Menut, D., Tamain, C., Dourdain, S. et Diat, O. (2022). Size and structure of hexanuclear plutonium oxo-hydroxo clusters in aqueous solution from synchrotron analysis. *Journal of Synchrotron Radiation*, 29, 30-36. doi:https://doi.org/10.1107/S1600577521012005
- Ebrahimi, K. H., Hagedoorn, P.-L., van der Weel, L., Verhaert, P. D. E. M. et Hagen, W. R. (2012). A novel mechanism of iron-core formation by *Pyrococcus furiosus* archaeoferritin, a member of an uncharacterized branch of the ferritin-like superfamily. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(6), 975-985. doi:10.1007/s00775-012-0913-0
- Edelstein, N. M. (1980). *Lanthanide and actinide chemistry and spectroscopy* (Amer Chemical Society).
- Edwards, D. C. et Myneni, S. C. B. (2006). Near Edge X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy of Bacterial Hydroxamate Siderophores in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(42), 11809-11818. doi:10.1021/jp0611976
- Edwards, D. C., Nielsen, S. B., Jarzęcki, A. A., Spiro, T. G. et Myneni, S. C. B. (2005). Experimental and theoretical vibrational spectroscopy studies of acetohydroxamic acid and desferrioxamine B in aqueous solution: Effects of pH and iron complexation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(13), 3237-3248. doi:10.1016/j.gca.2005.01.030

- Ekberg, C., Larsson, K., Skarnemark, G., Ödegaard-Jensen, A. et Persson, I. (2013). The structure of plutonium(IV) oxide as hydrolysed clusters in aqueous suspensions. *Dalton Trans.*, 42(6), 2035-2040. doi:10.1039/C2DT32185H
- Evers, A., Hancock, R. D., Martell, A. E. et Motekaitis, R. J. (1989). Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of iron(III), gallium(III), indium(III), aluminum(III), and other highly charged metal ions. *Inorganic Chemistry*, 28(11), 2189-2195. doi:10.1021/ic00310a035
- Evrard, G., Mareuil, F., Bontems, F., Sizun, C. et Perez, J. (2011). DADIMODO : a program for refining the structure of multidomain proteins and complexes against small-angle scattering data and NMR-derived restraints. *Journal of Applied Crystallography*, 44(6), 1264-1271. doi:10.1107/S0021889811035758
- Fallet, A., Larabi-Gruet, N., Jakab-Costenoble, S. et Moisy, P. (2016). Electrochemical behavior of plutonium in nitric acid media. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 308(2), 587-598. doi:10.1007/s10967-015-4423-8
- Finazzi, D. et Arosio, P. (2014). Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol*, 88, 1787-1802. doi:10.1007/s00204-014-1329-0
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D. et Andrews, N. C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 1148-1153. doi:10.1073/pnas.95.3.1148
- Ganz, T. (2011). Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, 117(17), 4425-4433. doi:10.1182/blood-2011-01-258467
- Garnier-Laplace, J., Colle, C. et Morello, M. (2001, 14 mai). IRSN - Fiche radionucléide : Uranium naturel et environnement.
- Gorden, A. E. V., Xu, J., Raymond, K. N. et Durbin, P. (2003). Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. *Chemical Reviews*, 103(11), 4207-4282. doi:10.1021/cr990114x
- Granier, T., Langlois d'Estaintot, B., Gallois, B., Chevalier, J.-M., Précigoux, G., Santambrogio, P. et Arosio, P. (2003). Structural description of the active sites of mouse L-chain ferritin at 1.2 Å resolution. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8(1), 105-111. doi:10.1007/s00775-002-0389-4
- Grossmann, J. G., Neu, M., Pantos, E., Schwab, F. J., Evans, R. W., Townes-Andrews, E., ... Hasnain, S. S. (1992). X-ray solution scattering reveals conformational changes upon iron uptake in lactoferrin, serum and ovo-transferrins. *Journal of Molecular Biology*, 225(3), 811-819. doi:10.1016/0022-2836(92)90402-6
- Guillaumont, R. (2003). *Update of the chemical thermodynamics of uranium, neptunium, plutonium, americium and technetium* (OECD Nuclear Energy Agency, Data Bank). Repéré à https://www.oecd-neo.org/upload/docs/application/pdf/2020-09/update_on_the_chemical_thermodynamics_of_uranium_neptunium_plutonium_americium_and_techneium_volume_5.pdf
- Guillaumont, R. (2020). Tableau périodique des éléments chimiques et actinides. *Comptes Rendus. Chimie*, 23(3), 243-254. doi:10.5802/crchim.22
- Ha-Duong, N.-T., Hémadi, M., Chikh, Z. et Chahine, J.-M. E. H. (2008). Kinetics and thermodynamics of metal-loaded transferrins: transferrin receptor 1 interactions. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1422-1426. doi:10.1042/BST0361422
- Hall, D. R., Hadden, J. M., Leonard, G. A., Bailey, S., Neu, M., Winn, M. et Lindley, P. F. (2002). The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 58, 70-80. doi:https://doi.org/10.1107/S0907444901017309
- Harris, W. R., Cafferty, A. M., Abdollahi, S. et Trankler, K. (1998). Binding of monovalent anions to human serum transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1383(2), 197-210. doi:10.1016/S0167-4838(97)00152-0
- Harris, W. R., Carrano, C. J., Pecoraro, V. L. et Raymond, K. N. (1981). Siderophilin metal coordination. 1. Complexation of thorium by transferrin: structure-function implications. *Journal of the American Chemical Society*, 103(9), 2231-2237. doi:10.1021/ja00399a016
- Harris, W. R., Yang, B., Abdollahi, S. et Hamada, Y. (1999). Steric restrictions on the binding of large metal ions to serum transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76(3-4), 231-242. doi:10.1016/S0162-0134(99)00150-6
- Harrison, P. M. et Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(3), 161-203. doi:10.1016/0005-2728(96)00022-9
- Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T., Plantevin, S., Vidaud, C. et El Hage Chahine, J.-M. (2010). Can uranium follow the iron-acquisition pathway? Interaction of uranyl-loaded transferrin with receptor 1. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(4), 497-504. doi:10.1007/s00775-009-0618-1
- Hempstead, P. D. et al. (1997). Comparison of the Three-dimensional Structures of Recombinant Human H and Horse L Ferritins at High Resolution. *J. Mol. Biol.*, 25.
- Henderson, M. P., Miasek, V. I. et Swaddle, T. W. (1971). Kinetics of thermal decomposition of aqueous perchloric acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 49(2), 317-324. doi:10.1139/v71-051
- Henner, P. et Garcia-Sanchez, L. (2002, 11 avril). IRSN - Fiche radionucléide : Thorium et environnement.

- Hiemstra, T., Rahnamaie, R. et van Riemsdijk, W. H. (2004). Surface complexation of carbonate on goethite: IR spectroscopy, structure and charge distribution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278(2), 282-290. doi:10.1016/j.jcis.2004.06.014
- Higley, K. A. (2006). Environmental consequences of the chernobyl accident and their remediation: twenty years of experience. Report of the chernobyl forum expert group 'environment'. *Radiation Protection Dosimetry*, 121(4), 476-477. doi:10.1093/rpd/ncl163
- Hirose, K., Igarashi, Y., Aoyama, M. et Miyao, T. (2001). Long-term trends of plutonium fallout observed in Japan. Dans *Radioactivity in the Environment* (vol. 1, p. 251-266). Elsevier. doi:10.1016/S1569-4860(01)80018-8
- Holm, R. H., Kennepohl, P. et Solomon, E. I. (1996). Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2239-2314. doi:10.1021/cr9500390
- Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P.-L. et Hagen, W. R. (2015). Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chemical Reviews*, 115(1), 295-326. doi:10.1021/cr5004908
- Huard, D. J. E., Kane, K. M. et Tezcan, F. A. (2013). Re-engineering protein interfaces yields copper-inducible ferritin cage assembly. *Nature Chemical Biology*, 9(3), 169-176. doi:10.1038/nchembio.1163
- Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C. et Ketteler, M. (2011). Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation Research*, 108(12), 1494-1509. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234260
- Jeanson, A., Berthon, C., Coantic, S., Den Auwer, C., Floquet, N., Funke, H., ... Subra, G. (2009). The role of aspartyl-rich pentapeptides in comparative complexation of actinide(IV) and iron(III). Part 1. *New Journal of Chemistry*, 33(5), 976-985. doi:10.1039/b813523a
- Jeanson, A., Ferrand, M., Funke, H., Hennig, C., Moisy, P., Solari, P. L., ... Den Auwer, C. (2010). The Role of Transferrin in Actinide(IV) Uptake: Comparison with Iron(III). *Chemistry - A European Journal*, 16(4), 1378-1387. doi:10.1002/chem.200901209
- Jensen, M. P., Gorman-Lewis, D., Aryal, B., Paunesku, T., Vogt, S., Rickert, P. G., ... Soderholm, L. (2011). An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 560-565. doi:10.1038/nchembio.594
- Jensen, W. B. (1982). The positions of lanthanum (actinium) and lutetium (lawrencium) in the periodic table. *Journal of Chemical Education*, 59(8), 634-636. doi:10.1021/ed059p634
- Johansen, M. P., Anderson, D., Child, D., Hotchkis, M. A. C., Tsukada, H., Okuda, K. et Hinton, T. G. (2021). Differentiating Fukushima and Nagasaki plutonium from global fallout using ²⁴¹Pu/²³⁹Pu atom ratios: Pu vs. Cs uptake and dose to biota. *Science of The Total Environment*, 754, 1-11. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141890
- Jolivet, J. P. et Tavel, B. (1982). INFRARED SPECI'RAOF CERIUM AND THORIWI PCNTAMWJNATE C@IpLIXLS, 6.
- Jutz, G., van Rijn, P., Santos Miranda, B. et Böker, A. (2015). Ferritin: A Versatile Building Block for Bionanotechnology. *Chemical Reviews*, 115(4), 1653-1701. doi:10.1021/cr400011b
- Katz, J. J., Morss, L. R. et Seaborg, G. T. (1986). *The chemistry of the actinide elements* (2ème).
- Kell, D. B. et Pretorius, E. (2014). Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*, 6(4), 748-773. doi:10.1039/C3MT00347G
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. et Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 181, 662-666. doi:https://doi.org/10.1038/181662a0
- Kerisit, S. et Liu, C. (2014). Molecular Dynamics Simulations of Uranyl and Uranyl Carbonate Adsorption at Aluminosilicate Surfaces. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 3899-3907. doi:10.1021/es405387c
- Kiss, T. et Farkas, E. (1998). Metal-binding Ability of Desferrioxamine B, 20.
- Knopp, R., Neck, V. et Kim, J. I. (1999). Solubility, hydrolysis and colloid formation of plutonium(IV). *Ract*, 86(3-4), 101-108. doi:10.1524/ract.1999.86.34.101
- Koltunov, V. S. et Zhuravleva, G. I. (1974). Kinetics of reduction of plutonium by hydrazine, reduction of Pu(IV). *Sov. Radiochem*, 16, 1-4.
- Koltunov, V. S., Zhuravleva, G. I. et Shapovalov, M. P. (1981). Kinetics of actinide reduction by hydroxylamine. *Sov. Radiochem*, 1-7.
- Kotrly, S. et Sucha, L. (1985). *Handbook of chemical equilibria in analytical chemistry* (Ellis Horwood Ltd).
- Kraemer, S. M. (2005). Siderophores and the Dissolution of Iron-Bearing Minerals in Marine Systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59(1), 53-84. doi:10.2138/rmg.2005.59.4
- Kretchmar, S. A. et Raymond, K. N. (1986). Biphasic kinetics and temperature dependence of iron removal from transferrin by 3,4-LICAMS. *Journal of the American Chemical Society*, 108(20), 6212-6218. doi:10.1021/ja00280a017
- Kumar, A., Ali, M., Ningthoujam, R. S., Gaikwad, P., Kumar, M., Nath, B. B. et Pandey, B. N. (2016). The interaction of actinide and lanthanide ions with hemoglobin and its relevance to human and environmental toxicology. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 281-293. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.12.029

- Kuser, P., Hall, D. R., Haw, M. L., Neu, M., Evans, R. W. et Lindley, P. F. (2002). The mechanism of iron uptake by transferrins: the X-ray structures of the 18 kDa NII domain fragment of duck ovotransferrin and its nitrilotriacetate complex. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(5), 777-783. doi:10.1107/S0907444902003724
- Laghaei, R., Evans, D. G. et Coalson, R. D. (2013). Metal binding sites of human H-chain ferritin and iron transport mechanism to the ferroxidase sites: A molecular dynamics simulation study: Mechanism of Iron Ion Intake Into Ferritin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(6), 1042-1050. doi:10.1002/prot.24251
- Lairez, D. (2003). Introduction à la diffusion de neutrons aux petits angles. *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 103, 253-290. doi:10.1051/jp4:200300010
- Langlois d'Estaintot, B., Santambrogio, P., Granier, T., Gallois, B., Chevalier, J. M., Précigoux, G., ... Arosio, P. (2004). Crystal structure and biochemical properties of the human Mitochondrial ferritin and its mutant Ser144Ala. *Journal of Molecular Biology*, 340(2), 277-293. doi:10.1016/j.jmb.2004.04.036
- Lavelle, L. (2008). Lanthanum (La) and actinium (Ac) should remain in the d-block. *Journal of Chemical Education*, 85(11), 1482-1483. doi:10.1021/ed085p1482
- Le Brun, N. E., Crow, A., Murphy, M. E. P., Mauk, A. G. et Moore, G. R. (2010). Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 732-744. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.002
- Leblanc, N. J. (1987). Du projet Manhattan à Hiroshima : histoire d'une décision, p. 71-93.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J. et Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371-384. doi:10.1038/nrmicro3028
- Lemire, R. J. et NEA Data Bank (dir.). (2001). *Chemical thermodynamics of neptunium and plutonium*. Amsterdam : Oxford : Elsevier.
- Levi, S., Corsi, B., Rovida, E., Cozzi, A., Santambrogio, P., Albertini, A. et Arosio, P. (1994). Construction of a ferroxidase center in human ferritin L-chain. *Journal of Biological Chemistry*, 269(48), 30334-30339. doi:10.1016/S0021-9258(18)43817-3
- Lewin, A., Moore, G. R. et Le Brun, N. E. (2005). Formation of protein-coated iron minerals. *Dalton Transactions*, (22), 3597-3610. doi:10.1039/b506071k
- Li, H., Sadler, P. J. et Sun, H. (1996). Rationalization of the Strength of Metal Binding to Human Serum Transferrin. *European Journal of Biochemistry*, 242(2), 387-393. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0387r.x
- Li, P., Song, L. F. et Merz, K. M. (2015). Parameterization of Highly Charged Metal Ions Using the 12-6-4 LJ-Type Nonbonded Model in Explicit Water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(3), 883-895. doi:10.1021/jp505875v
- Lid, S., Carmona, D., Maas, M., Treccani, L. et Colombi Ciacchi, L. (2018). Anchoring of iron oxyhydroxide clusters at H and L ferritin subunits. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(2), 483-490. doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00814
- Liu, X. S., Patterson, L. D., Miller, M. J. et Theil, E. C. (2007). Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of Iron recovery from the ferritin mineral. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 31821-31825. doi:10.1074/jbc.C700153200
- LLorens, I., Solari, P. L., Sitaud, B., Bes, R., Cammelli, S., Hermange, H., ... Den Auwer, C. (2014). X-ray absorption spectroscopy investigations on radioactive matter using MARS beamline at SOLEIL synchrotron. *Radiochimica Acta*, 102(11), 957-972. doi:10.1515/ract-2013-2241
- Lloyd, M. H. et Haire, R. G. (1978). The chemistry of plutonium in sol-gel processes. *Ract*, 25(3-4), 139-148. doi:10.1524/ract.1978.25.34.139
- Loréal, O., Bardou-Jacquet, É., Island, M.-L., Fatih, N., Doyard, M., Detivaud, L. et Brissot, P. (2012). Métabolisme du fer. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(3), 117-124. doi:10.1016/j.cnd.2012.01.003
- Loréal, O., Ropert, M., Doyard, M., Island, M.-L., Fatih, N., Detivaud, L., ... Brissot, P. (2012). Métabolisme du fer en 2012. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(442), 31-37. doi:10.1016/S1773-035X(12)71455-7
- MacGillivray, R. T. A., Moore, S. A., Chen, J., Anderson, B. F., Baker, H., Luo, Y., ... Baker, E. N. (1998). Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in Iron release. *Biochemistry*, 37(22), 7919-7928. doi:10.1021/bi980355j
- Maity, B., Hishikawa, Y., Lu, D. et Ueno, T. (2019). Recent progresses in the accumulation of metal ions into the apo-ferritin cage: Experimental and theoretical perspectives. *Polyhedron*, 172, 104-111. doi:10.1016/j.poly.2019.03.048
- Marsh, S. F., Veirs, D. K., Jarvinen, G. D., Barr, M. E. et Moody, E. W. (2000). Molecularly engineered resins for plutonium recovery. *Los Alamos Science*, (26), 454-463.
- Martel, P., Kim, S. M. et Powell, B. M. (1980). Physical characteristics of human transferrin from small angle neutron scattering. *Biophysical Journal*, 31(3), 371-380. doi:10.1016/S0006-3495(80)85065-X
- Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T. et Mikami, B. (2010). Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4049-4059. doi:10.1074/jbc.M109.059790

- Masuda, T., Morimoto, S.-I., Mikami, B. et Toyohara, H. (2012). The extension peptide of plant ferritin from sea lettuce contributes to shell stability and surface hydrophobicity: Interaction between the EP and plant ferritin shell. *Protein Science*, 21(6), 786-796. doi:10.1002/pro.2061
- Masuda, T., Zang, J., Zhao, G. et Mikami, B. (2018). The first crystal structure of crustacean ferritin that is a hybrid type of H and L ferritin: First crystal structure of crustacean ferritin. *Protein Science*, 27(11), 1955-1960. doi:10.1002/pro.3495
- Mertens, H. D. T. et Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 128-141. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.012
- Metz, S., Kästner, J., Sokol, A. A., Keal, T. W. et Sherwood, P. (2014). ChemShell—a modular software package for QM/MM simulations. *WIREs Computational Molecular Science*, 4(2), 101-110. doi:10.1002/wcms.1163
- Micheau, C., Virost, M., Dourdain, S., Dumas, T., Menut, D., Solari, P. L., ... Nikitenko, S. I. (2020). Relevance of formation conditions to the size, morphology and local structure of intrinsic plutonium colloids. *Environmental Science: Nano*, 7(8), 2252-2266. doi:10.1039/D0EN00457J
- Miquel, G., Nekaa, T., Kahn, P. H., Hémadi, M. et El Hage Chahine, J.-M. (2004). Mechanism of formation of the complex between transferrin and bismuth, and interaction with transferrin receptor 1. *Biochemistry*, 43(46), 14722-14731. doi:10.1021/bi048484p
- Morss, L. R., Edelstein, N. M., Fuger, J. et Katz, J. J. (dir.). (2006). *The chemistry of the actinide and transactinide elements* (3rd ed). Dordrecht : Springer.
- Mould, R. F. (1998). The discovery of radium in 1898 by Maria Sklodowska-Curie (1867-1934) and Pierre Curie (1859-1906) with commentary on their life and times. *The British Journal of Radiology*, 71(852), 1229-1254. doi:10.1259/bjr.71.852.10318996
- Nakamoto, K. (2009). *Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds: Part B: Applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry, Sixth Edition* (John Wiley&Sons, Inc.).
- Neck, V. et Kim, J. I. (2000). An electrostatic approach for the prediction of actinide complexation constants with inorganic ligands-application to carbonate complexes. *Radiochimica Acta*, 88(9-11), 815-822. doi:10.1524/ract.2000.88.9-11.815
- Neck, V. et Kim, J. I. (2001). Solubility and hydrolysis of tetravalent actinides. *Radiochimica Acta*, 89(1), 1-16. doi:10.1524/ract.2001.89.1.001
- Newton, T. W., Hobart, D. E. et Palmer, P. D. (1986). The formation of Pu(IV)-colloid by the alpha-reduction of Pu(V) or Pu(VI) in aqueous solutions. *Ract*, 39(3), 139-148. doi:10.1524/ract.1986.39.3.139
- Nuclear Emergency Response Headquarters, Government of Japan. (2011). Report of Japanese Government to IAEA Ministerial Conference on Nuclear Safety - Accident at TEPCO's Fukushima Nuclear Power Stations.
- Omar, S., Feki, M. et Kaabachi, N. (2006). Iron metabolism, overview and recent insights. *Annales de Biologie Clinique*, 64(6), 523-534. doi:https://www.jle.com/10.1684/abc.2006.0016
- Orino, K., Miura, T., Muto, S. et Watanabe, K. (2005). Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. *DNA Sequence*, 16(1), 58-64. doi:10.1080/10425170400024359
- Orino, K. et Watanabe, K. (2008). Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *The Veterinary Journal*, 178(2), 191-201. doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.006
- Osawa, M., Tokumitsu, H., Swindells, M. B., Kurihara, H., Orita, M., Shibamura, T., ... Ikura, M. (1999). A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase. *Nature Structural Biology*, 6, 819-824. doi:https://doi.org/10.1038/12271
- Pan, Y.-H., Sader, K., Powell, J. J., Bleloch, A., Gass, M., Trinick, J., ... Brown, A. (2009). 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: New evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *Journal of Structural Biology*, 166(1), 22-31. doi:10.1016/j.jsb.2008.12.001
- Pearson, R. (1963). Hard and soft acids and bases. *Journal of American Chemistry Society*, 85(22), 3533-3539. doi:https://doi.org/10.1021/ja00905a001
- Pearson, R. G. (1997). *Chemical hardness*. Weinheim, Germany ; New York : Wiley-VCH.
- Pikaev, A. K., Shilov, V. P. et Gogolev, A. V. (1997). Radiation chemistry of aqueous solutions of actinides. *Russian Chemical Reviews*, 66(9), 763-788. doi:10.1070/RC1997v066n09ABEH000284
- Pozzi, C., Ciambellotti, S., Bernacchioni, C., Di Pisa, F., Mangani, S. et Turano, P. (2017). Chemistry at the protein-mineral interface in L-ferritin assists the assembly of a functional (μ₃-oxo)Tris[(μ₂-peroxo)] triiron(III) cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), 2580-2585. doi:10.1073/pnas.1614302114
- Rabideau, S. W. (1953). Equilibria and reaction rates in the disproportionation of Pu(IV). *Journal of American Chemistry Society*, 75(4), 798-801. doi:https://doi.org/10.1021/ja01100a011
- Rai, D., Hess, N. J., Felmy, A. R., Moore, D. A., Yui, M. et Vitorge, P. (1999). A thermodynamic model for the solubility of PuO₂(am) in the aqueous K⁺,HCO₃⁻,CO₃²⁻,OH⁻, H₂O system. *Radiochimica Acta*, 86, 89-99. doi:https://doi.org/10.1524/ract.1999.86.34.89
- Rainey, R. H. (1959). Chemistry of Pu(IV) polymer. Technical Report.

Références

- Rao, L., Zanonato, P. et Di Bernardo, P. (2005). Interaction of actinides with carboxylates in solution: Complexation of U(VI), Th(IV), and Nd(III) with acetate at variable temperatures. *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*, 6(1), 31-37. doi:<https://doi.org/10.14494/jnrs2000.6.31>
- Rao, P. S. et Hayon, E. (1975). Redox potentials of free radicals. IV. Superoxide and hydroperoxy radicals . O₂⁻ and . HO₂. *The Journal of Physical Chemistry*, 79(4), 397-402. doi:10.1021/j100571a021
- Ravel, B. et Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, EPHAESTUS : data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation*, 12(4), 537-541. doi:10.1107/S0909049505012719
- Richardson, G. L. et Swanson, J. L. (1975). Plutonium partitioning in the Purex process with hydrazine-stabilized hydroxylamine nitrate (n° HEDL-TME--75-31, 4173805) (p. 1-100). doi:10.2172/4173805
- Romanov, S. A., Efimov, A. V., Aladova, E. E., Suslova, K. G., Kuznetsova, I. S., Sokolova, A. B., ... Khokhryakov, V. F. (2020). Plutonium production and particles incorporation into the human body. *Journal of Environmental Radioactivity*, 211, 1-9. doi:10.1016/j.jenvrad.2019.106073
- Rothe, J., Walther, C., Denecke, M. A. et Fanghänel, Th. (2004). XAFS and LIBD investigation of the formation and structure of colloidal Pu(IV) hydrolysis products. *Inorganic Chemistry*, 43(15), 4708-4718. doi:10.1021/ic049861p
- Runde, W., Brodnax, L. F., Goff, G., Bean, A. C. et Scott, B. L. (2009). Directed synthesis of crystalline plutonium(III) and (IV) oxalates: Accessing redox-controlled separations in acidic solutions. *Inorganic Chemistry*, 48(13), 5967-5972. doi:10.1021/ic900344u
- Ryan, J. L. et Wheelwright, E. J. (1959). Recovery and purification of plutonium by anion exchange. *Industrial & Engineering Chemistry*, 51(1), 60-65. doi:10.1021/ie50589a038
- Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Corsi, B. et Arosio, P. (1996). Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *Biochemical Journal*, 314(1), 139-144. doi:10.1042/bj3140139
- SASView. (2021). Repéré à <https://www.sasview.org/publications/>
- Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Evans, R. W., Berthomieu, C. et Aupiais, J. (2017). Revisiting binding of plutonium to transferrin by CE-ICP-MS. *Dalton Transactions*, 46(5), 1389-1396. doi:10.1039/C6DT04336D
- Schmidt, E. W. (1984). *Hydrazine and Its derivatives: Preparation, properties, applications* (New York : Wiley).
- Seaborg, G. T. (1992). *Transuranium elements* (vol. 24).
- Seaborg, G. T. (1993). Overview of the actinide and lanthanide (the f) elements. *Ract*, 61(3-4), 115-122. doi:10.1524/ract.1993.61.34.115
- Seeger, P. A., Rokop, S. E., Palmer, P. D., Henderson, S. J., Hobart, D. E. et Trehwella, J. (1997). Neutron resonance scattering shows specific binding of plutonium to the calcium-binding sites of the protein calmodulin and yields precise distance information. *Journal of the American Chemical Society*, 119(22), 5118-5125. doi:10.1021/ja9633124
- Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, 32, 751-767. doi:<https://doi.org/10.1107/S0567739476001551>
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., ... McKie, A. T. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 122(5), 789-801. doi:10.1016/j.cell.2005.06.025
- Shongwe, M. S., Smith, R., Marques, H. M. et van Wyk, J. A. (2004). Synergistic anion-directed coordination of ferric and cupric ions to bovine serum transferrin – an inorganic perspective. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(2), 199-208. doi:10.1016/j.jinorgbio.2003.10.009
- Sitaud, B., Solari, P. L., Schlutig, S., Llorens, I. et Hermange, H. (2012). Characterization of radioactive materials using the MARS beamline at the synchrotron SOLEIL. *Journal of Nuclear Materials*, 425(1-3), 238-243. doi:10.1016/j.jnucmat.2011.08.017
- Smith, H. (1995). Published on behalf of the International Commission on Radiological Protection, volume 25. *ICRP*, p. 1-87.
- Sodek, J., Ganss, B. et McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3), 279-303. doi:10.1177/10454411000110030101
- Solymosi, F. (1977). Thermal stability of perchloric acid. *Acta Physica et Chemica*, 23(2-3), 317-354.
- Stevens, R. W., Siriwardane, R. V. et Logan, J. (2008). In situ fourier transform infrared (FTIR) investigation of CO₂ adsorption into zeolite materials. *Energy & Fuels*, 22(5), 3070-3079. doi:10.1021/ef800209a
- Stover, B. J., Atherton, D. R., Keller, N. et Buster, D. S. (1960). Metabolism of the Th 228 decay series in adult beagle dogs I. Th 228 (RdTh). *Radiation Research*, 12(6), 657-671. doi:10.2307/3571000
- Sun, H., Li, H. et Sadler, P. J. (1999). Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chemical Reviews*, 99(9), 2817-2842. doi:10.1021/cr980430w
- Tait, C. D., Ekberg, S. A., Palmer, P. D. et Morris, D. E. (1995). Plutonium carbonate speciation changes as measured in dilute solutions with photoacoustic spectroscopy: Yucca Mountain site characterization program milestone report 3350 (n° LA--12886-MS, 70775) (p. 1-24). doi:10.2172/70775

- Takahashi, T. et Kuyucak, S. (2003). Functional properties of threefold and fourfold channels in ferritin deduced from electrostatic calculations. *Biophysical Journal*, 84(4), 2256-2263. doi:10.1016/S0006-3495(03)75031-0
- Tamás, M., Sharma, S., Ibstedt, S., Jacobson, T. et Christen, P. (2014). Heavy metals and metalloids As a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, 4(1), 252-267. doi:10.3390/biom4010252
- Tang, S., MacColl, R. et Parsons, P. J. (1995). Spectroscopic study of the interaction of aluminum ions with human transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 60(3), 175-185. doi:10.1016/0162-0134(95)00018-J
- Taylor, D. M. (2001). Environmental plutonium — creation of the universe to twenty-first century mankind. Dans *Radioactivity in the Environment* (vol. 1, p. 1-14). Elsevier. doi:10.1016/S1569-4860(01)80003-6
- Thakur, P., Pathak, P. N. et Choppin, G. R. (2009). Complexation thermodynamics and the formation of the binary and the ternary complexes of tetravalent plutonium with carboxylate and aminocarboxylate ligands in aqueous solution of high ionic strength. *Inorganica Chimica Acta*, 362(1), 179-184. doi:10.1016/j.ica.2008.03.127
- Thakurta, P. G., Dasgupta, R. et Dattagupta, J. K. (2003). Structure of diferric hen serum transferrin at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59, 1773-1781. doi:https://doi.org/10.1107/S09074444903016652
- Theil, E. C., Tosha, T. et Behera, R. K. (2016). Solving biology's iron chemistry problem with ferritin protein nanocages. *Accounts of Chemical Research*, 49(5), 784-791. doi:10.1021/ar500469e
- Thomas, C. M. et Ward, T. R. (2005). Artificial metalloenzymes: proteins as hosts for enantioselective catalysis. *Chemical Society Reviews*, 34(4), 337-346. doi:10.1039/b314695m
- Timkovich, R., Bergmann, D., Arciero, D. M. et Hooper, A. B. (1998). Primary sequence and solution conformation of ferrocycytochrome c-552 from nitrosomonas europaea. *Biophysical Journal*, 75(4), 1964-1972. doi:10.1016/S0006-3495(98)77637-4
- Tosha, T., Ng, H.-L., Bhattachali, O., Alber, T. et Theil, E. C. (2010). Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold Pores to catalytic sites. *Journal of the American Chemical Society*, 132(41), 14562-14569. doi:10.1021/ja105583d
- Toussaint, L., Bertrand, L., Hue, L., Crichton, R. R. et Declercq, J.-P. (2007). High-resolution X-ray structures of Human apoferritin H-chain mutants correlated with their activity and metal-binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 365(2), 440-452. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.010
- Treffry, A., Bauminger, E. R., Hechel, D., Hodson, N. W., Nowik, I., Yewdall, S. J. et Harrison, P. M. (1993). Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin: a study aided by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 296(3), 721-728. doi:10.1042/bj2960721
- Trémillon, B. (1965). *Les séparations par les résines échangeuses d'ions* (Gauthier-Villars Rennes).
- Uchida, M., Kang, S., Reichhardt, C., Harlen, K. et Douglas, T. (2010). The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 834-845. doi:10.1016/j.bbagen.2009.12.005
- United Nations. (1982). Ionizing radiation : Sources and biological effects. Report.
- United Nations (dir.). (2000). *Sources and effects of ionizing radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR 2000 report to the General Assembly, with scientific annexes*. New York : United Nations.
- Vaulont, S. (2017). Métabolisme du fer. *Archives de Pédiatrie*, 24(5), 5S32-5S39. doi:10.1016/S0929-693X(17)24007-X
- Vidaud, C., Gourion-Arsiquaud, S., Rollin-Genetet, F., Torne-Celer, C., Plantevin, S., Pible, O., ... Quéméneur, E. (2007). Structural consequences of binding of UO₂²⁺ to apotransferrin: can this protein account for entry of uranium into human cells? *Biochemistry*, 46(8), 2215-2226. doi:10.1021/bi061945h
- Vidaud, C., Miccoli, L., Brulfert, F. et Aupiais, J. (2019). Fetuin exhibits a strong affinity for plutonium and may facilitate its accumulation in the skeleton. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. doi:10.1038/s41598-019-53770-6
- Vincent, J. B. et Love, S. (2012). The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 362-378. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.003
- Voliotis, S. et Rimsky, A. (1975). Etude structurale des carbonates complexes de cérium et de thorium. III. Structure cristalline et moléculaire du pentacarbonatothorate de sodium dodécahydraté, Na₆[Th(CO₃)₅].12H₂O. *Acta Crystallographica Section B Structural science, crystal engineering and materials*, 31, 2620-2622. doi:https://doi.org/10.1107/S056774087500831X
- Wally, J., Halbrooks, P. J., Vonnrhein, C., Rould, M. A., Everse, S. J., Mason, A. B. et Buchanan, S. K. (2006). The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24934-24944. doi:10.1074/jbc.M604592200
- Walther, C., Rothe, J., Brendebach, B., Fuss, M., Altmaier, M., Marquardt, C. M., ... Seibert, A. (2009). New insights in the formation processes of Pu(IV) colloids. *Radiochimica Acta*, 97(4-5), 199-207. doi:10.1524/ract.2009.1595

Références

- Wang, L., Zhong, B., Liang, T., Xing, B. et Zhu, Y. (2016). Atmospheric thorium pollution and inhalation exposure in the largest rare earth mining and smelting area in China. *Science of The Total Environment*, 572, 1-8. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.192
- Wémeau, J.-L., Vialettes, B. et Schlienger, J.-L. (2014). *Endocrinologie, diabète, métabolisme et nutrition pour le praticien* (Elsevier Masson).
- Williams, J. et Moreton, K. (1980). The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin in human serum. *Biochemical Journal*, 185(2), 483-488. doi:https://doi.org/10.1042/bj1850483
- Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 691-696. doi:10.1042/bst0300691
- Yajima, H., Yamamoto, H., Nagaoka, M., Nakazato, K., Ishii, T. et Niimura, N. (1998). Small-angle neutron scattering and dynamic light scattering studies of N- and C-terminal fragments of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1381(1), 68-76. doi:10.1016/S0304-4165(98)00014-2
- Yamaguchi, T., Sakamoto, Y. et Ohnuki, T. (1994). Effect of the complexation on solubility of Pu(IV) in aqueous carbonate system. *Radiochimica Acta*, 66, 9-14. doi:https://doi.org/10.1524/ract.1994.6667.s1.9
- Yamashita, I., Iwahori, K. et Kumagai, S. (2010). Ferritin in the field of nanodevices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 846-857. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.005
- Zhao, G., Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C. et Chasteen, N. D. (2003). Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 42(10), 3142-3150. doi:10.1021/bi027357v

Annexes

Annexe A : Protocoles de préparation des solutions

Les concentrations, milieu et pH des solutions sont rassemblés dans le Tableau 29.

1. Préparation des solutions de carbonate d'An(IV)

Dans un flacon en plastique de 50 mL, une solution de carbonate, de concentration 3M, est préparée en dissolvant du carbonate de sodium dans de l'eau Mili-Q. La solution est laissée au repos pendant 24h et le pH de cette solution est de 10,30.

Dans un tube de 5 mL, la solution de carbonate préparée est préalablement introduite puis un volume défini d'actinide (IV), initialement contenu en milieu acide nitrique, est ajouté. Pendant l'ajout, une agitation de la solution est réalisée afin d'éviter l'hydrolyse de l'actinide (IV). Cette solution est laissée 24h au repos. Le pH de cette solution est situé entre 9 et 10. Enfin, la solution est centrifugée puis le surnageant est isolé dans un autre tube.

2. Préparation des protéines

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique, à l'exception des protéines. L'apotransferrine et la holotransferrine ont été achetées chez Sigma-Aldrich. Les lots commerciaux ont été dialysés avant d'être utilisés. Les protéines ont été placées dans une membrane de 12 kDa et dialysées 3 fois pendant 24 heures dans un milieu tampon composé de MES-NaCl (5×10^{-2} M et $1,5 \times 10^{-1}$ M respectivement), à un pH proche du pH physiologique (pH $7,4 \pm 0,1$).

La ferritine de rate de cheval a été achetée chez Sigma-Aldrich. Le lot commercial de la ferritine de rate de cheval a été dialysée avant d'être utilisé. À cette fin, la ferritine est placée dans une membrane de 12 kDa et dialysées 3 fois pendant 24 heures dans un milieu tampon composé de MES-NaCl (5×10^{-2} M et $1,5 \times 10^{-1}$ M respectivement), à un pH proche du pH physiologique (pH $7,4 \pm 0,1$).

3. Préparation des complexes An(IV)-protéine

Les complexes An(IV)-ferritine ont été préparés en ajoutant un volume défini de la solution mère de $[\text{An(IV)(CO}_3)_5]^{6-}$ à un volume fixe de ferritine, préalablement dialysée dans la solution tamponnée. Le contact est fait directement sur un filtre centrifuge microcon® de 30 kDa et conservé à 4°C pendant 6 heures. Une étape de centrifugation (12000g ; 6 minutes ; 4°C) suivie d'un rinçage avec le milieu tampon est réalisée. Durant ces étapes, le pH de la solution est également ajusté à un pH proche du pH physiologique (pH $7,4 \pm 0,1$). L'échantillon est ensuite récupéré sur le filtre. Le volume final de l'échantillon est de 250µL. Les concentrations d'An(IV) et de protéine ainsi que le rapport du complexe F/Th dépendent de l'étude réalisée (Tableau 29).

Les complexes An(IV)-transferrine ont été préparés en ajoutant un volume défini de la solution mère de $[\text{An(IV)(CO}_3)_5]^{6-}$ à un volume fixe d'apotransferrine, préalablement dialysée dans la solution tamponnée. Pour réaliser ces complexes, trois mises au contact ont été effectuées et sont alternés par des étapes de rinçage. Pour chaque mise au contact, un tiers du volume total de la solution $[\text{An(IV)(CO}_3)_5]^{6-}$ est ajouté dans l'échantillon contenant la protéine. Un léger excès de métal est ajouté afin de s'assurer de la saturation de la protéine. Les étapes de mises au contact sont faites directement sur un filtre centrifuge microcon® de 5 kDa et conservé à 4°C pendant 6 heures. Les étapes de rinçage ont été réalisées en ajustant le pH de l'échantillon à un pH proche du pH physiologique (pH $7,4 \pm 0,1$) et en ajoutant du milieu tampon. À toutes les étapes, la centrifugation a été réalisée selon les conditions suivantes : (2000g ; 20 minutes ; 4°C). Les concentrations d'An(IV) et de protéine dépendent de l'étude réalisée.

Pour les complexes ternaires avec le sidérophore, la DFOB ($C \sim 2,7 \cdot 10^{-2}$ M) a été ajoutée dans l'échantillon à pH proche du pH physiologique. Le volume est ajusté en fonction de la stœchiométrie entre la Tf et la DFOB dans l'échantillon. Après un temps de contact de 6h, l'échantillon est rincé de la même façon que décrit au-dessus. L'échantillon a ensuite été récupéré sur le filtre. Le volume final de l'échantillon est de 250µL.

Tableau 29 : Liste des échantillons préparés selon le type d'analyse réalisée (concentrations finales théoriques engagées, pH, milieu tampon)

Complexe	C _{protéine} (mol.L ⁻¹)	C _{An} (mol.L ⁻¹)	pH	Tampon	Technique d'analyse
<i>F-Pu</i>	~ 3,2.10 ⁻⁷	~ 1,7.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS
<i>F-Pu</i>	~ 1,6.10 ⁻⁷	~ 4,5.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	UV
<i>F-Th</i>	~ 3,2.10 ⁻⁷	~ 5,5.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / XANES
<i>F-Th</i>	~ 1,8.10 ⁻⁷	~ 5,5.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	IR
<i>Stock-F</i>	~ 3,2.10 ⁻⁷	-	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / XANES
<i>Stock-F</i>	~ 1,8.10 ⁻⁶	-	~ 7,4	MES-NaCl	IR
<i>Pu₂Tf</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / SAXS / UV
<i>Pu₂Tf</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	-	IR
<i>Th₂Tf</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / SAXS
<i>Th₂Tf</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	-	IR
<i>Pu₂Tf-DFOB*</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / SAXS / UV
<i>Th₂Tf-DFOB*</i>	~ 3.10 ⁻⁴	~ 6.10 ⁻⁴	~ 7,4	MES-NaCl	EXAFS / SAXS / UV
<i>[Pu(CO₃)₅]⁶⁻ stock °</i>	-	~ 2,5.10 ⁻³	~ 9/10	-	EXAFS / UV
<i>[Th(CO₃)₅]⁶⁻ stock °</i>	-	~ 2,5.10 ⁻³	~ 9/10	-	EXAFS / IR

*concentration en DFOB : ~ 3.10⁻³ mol.L⁻¹° concentration en carbonate : ~ 3 mol.L⁻¹

Annexe B : Méthode d'analyses des complexes An(IV)-protéine sur Grands Instruments

Ce travail a donné lieu à de nombreuses campagnes d'expérience sur un Grand Instrument, à savoir le synchrotron de Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE (SOLEIL), situé à Saint-Aubin, France et représenté en Figure 96.



Figure 96 : Photographie du synchrotron SOLEIL

Les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et de spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS) ont été réalisées sur la ligne de faisceau MARS (Multi Analyses on Radioactive Samples), qui est l'unique ligne pouvant recevoir des échantillons radioactifs.

1. Conditions de la ligne MARS

Les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et de spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS) ont été réalisées sur la ligne de lumière MARS (Multi-Analyses on Radioactive Samples) du synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France) (LLorens et al., 2014; Sitaud, Solari, Schlutig, Llorens et Hermange, 2012). L'anneau de stockage fonctionnait en mode top-up avec un courant électronique de 500 mA, accéléré jusqu'à une énergie critique de 2,5 GeV. L'optique de la ligne de lumière est constituée de deux longs miroirs en Si revêtus d'une couche mince de Pt-Rh insérés de part et d'autre d'un monochromateur à double cristal (DCM) refroidi à l'eau pour la sélection de l'énergie incidente. Les deux miroirs ont pour rôle, d'une part de collimater dans la dimension verticale le faisceau de rayons X prélevé dans l'anneau de stockage du synchrotron SOLEIL au préalable de son entrée dans le monochromateur puis jusqu'à la position de l'échantillon sur le poste d'analyse et d'autre part, assurer la rejet des harmoniques de plus forte énergie. Le premier cristal plan du monochromateur assure la sélection en énergie du faisceau monochromatique utilisé pour l'analyse. Le second cristal est monté sur un système courbe afin d'assurer la focalisation dans le plan horizontal du faisceau monochromatique ainsi que le maintien fixe du faisceau sur l'échantillon. Le monochromateur de la ligne MARS est équipé de deux paires de cristaux Si(111) et Si(220) pour couvrir une gamme d'énergie de rayons X monochromatiques comprise entre 3 et 35 keV. Pour les analyses SAXS et XAS réalisées, le faisceau était focalisé sur l'échantillon avec une taille d'environ 300 x 300 microns (H x V, largeur à mi-hauteur).

2. Conditions d'acquisition XAS

L'étalonnage de l'énergie du monochromateur a été effectué à partir des feuilles métalliques de référence au seuil K de l'Yttrium correspondant à 17,038 keV pour sonder le seuil L_{III} du Thorium (16,300 keV), au seuil K du Zirconium correspondant à 17,998 keV pour sonder le seuil L_{III} du plutonium (18,057 keV) et au seuil K du Fer correspondant à 7,112 keV pour sonder le seuil K du fer (7,112 keV). Une cellule spécifique a été utilisée pour les échantillons radioactifs et était composée de supports d'échantillons en Téflon contenant trois fentes de 250 μ L fermées par deux couches de films Kapton® (polyimide) de chaque côté (Figure 97).

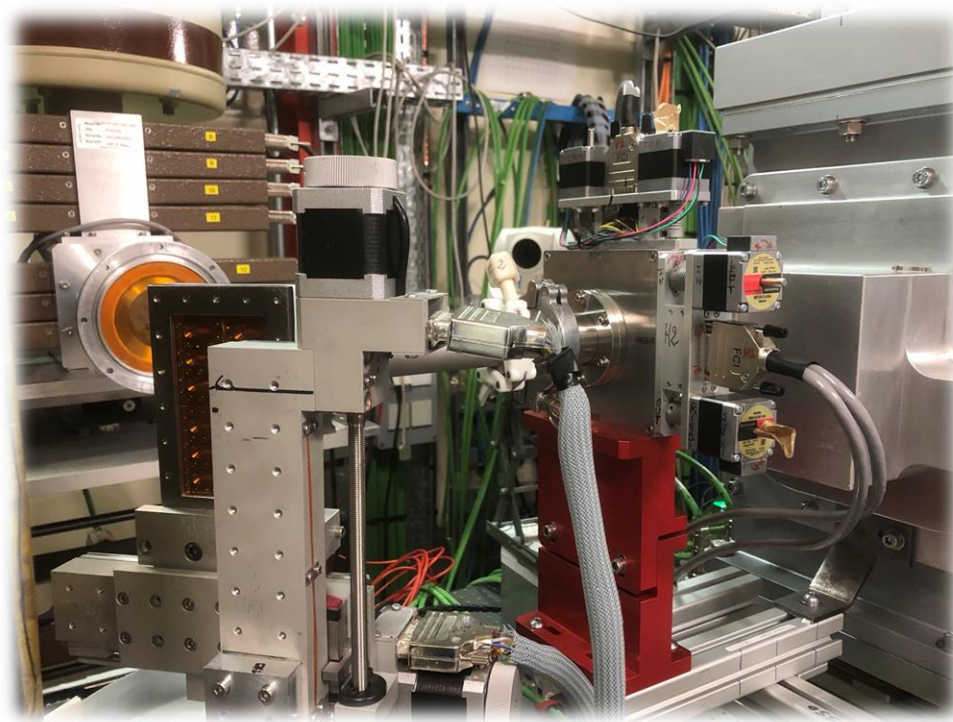


Figure 97 : Photographie du montage utilisé sur la ligne MARS en configuration XAS

Les données ont été traitées en utilisant le code ATHENA du progiciel Demeter 0.9.25.58. Les données EXAFS ont été ajustées en utilisant les phases et les amplitudes calculées avec le code Feff7 intégré dans le code ARTEMIS de Demeter 0.9.25 (Ravel et Newville, 2005).

Les modèles issus des calculs en dynamique moléculaire sont utilisés comme composés modèle. Le signal EXAFS a été ajusté dans l'espace R (Å) entre 1 et 6 (sans aucun filtrage supplémentaire après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning en k^2 ($2,7 - 10,8 \text{ \AA}^{-1}$)). Dans tous les ajustements, un seul facteur d'amplitude global S_0^2 et un seul facteur de seuil d'énergie E_0 ont été considérés pour toutes les contributions. Le facteur d'accord R (en %) et le facteur de qualité réduit χ^2 (Q) sont tous deux fournis comme indication de la qualité de l'ajustement. La simulation des spectres EXAFS obtenus par calcul en dynamique moléculaire, ont été réalisés avec le code Feff9 en utilisant un décalage du seuil d'énergie de 8 eV.

3. Conditions d'acquisition SAXS

L'étalonnage de l'énergie du faisceau incident a été effectué au saut de seuil K de l'Yttrium correspondant à 17,038 keV. Une cellule spécifique a été utilisée pour les échantillons radioactifs et était composée de

supports d'échantillons en Téflon contenant trois fentes de 250 μL fermées par deux couches de films Kapton® (polyimide) de chaque côté.

Les expériences SAXS ont été réalisées par la suite avec une énergie de rayons X de 16,0 keV correspondant à une longueur d'onde moyenne de $0,7749 \text{ \AA}^{-1}$, et une distance échantillon-détecteur de 763,67 mm. Cette configuration permet de couvrir une gamme de Q comprise entre environ $0,02 \text{ \AA}^{-1}$ et 2 \AA^{-1} . Un réservoir rempli de gaz He contenant l'arrêt de faisceau de la photodiode centrée a été placé entre le support d'échantillon et le détecteur Pilatus 3 2M CdTe afin de réduire la diffusion de l'air (Figure 98) (Dumas et al., 2022). Les transmissions des échantillons ont été enregistrées pendant 5 s à l'aide de photodiodes et les diagrammes de diffusion ont été enregistrés pendant 45 s par échantillon. Les données de diffusion 2D isotrope ont été moyennées azimutalement pour obtenir l'intensité de diffusion $I(Q)$ en utilisant le logiciel PyFAI (Ashiotis et al., 2015). L'intensité de diffusion des échantillons a ensuite été normalisée par le temps d'acquisition, la transmission et l'épaisseur, et multipliée par une constante de normalisation déterminée à l'aide de l'intensité de diffusion du polyéthylène (PE) à $Q = 0,36 \text{ nm}^{-1}$ qui correspond à $4,9 \text{ cm}^{-1}$. L'intensité absolue diffusée par les échantillons a finalement été obtenue en soustrayant les contributions des cellules vides, du solvant et du fond. Les données ont été simulées à l'aide du logiciel SasView 4.2.0 (<http://www.sasview.org>), notamment pour les facteurs de forme bâtonnet, haltères et ellipsoïde.

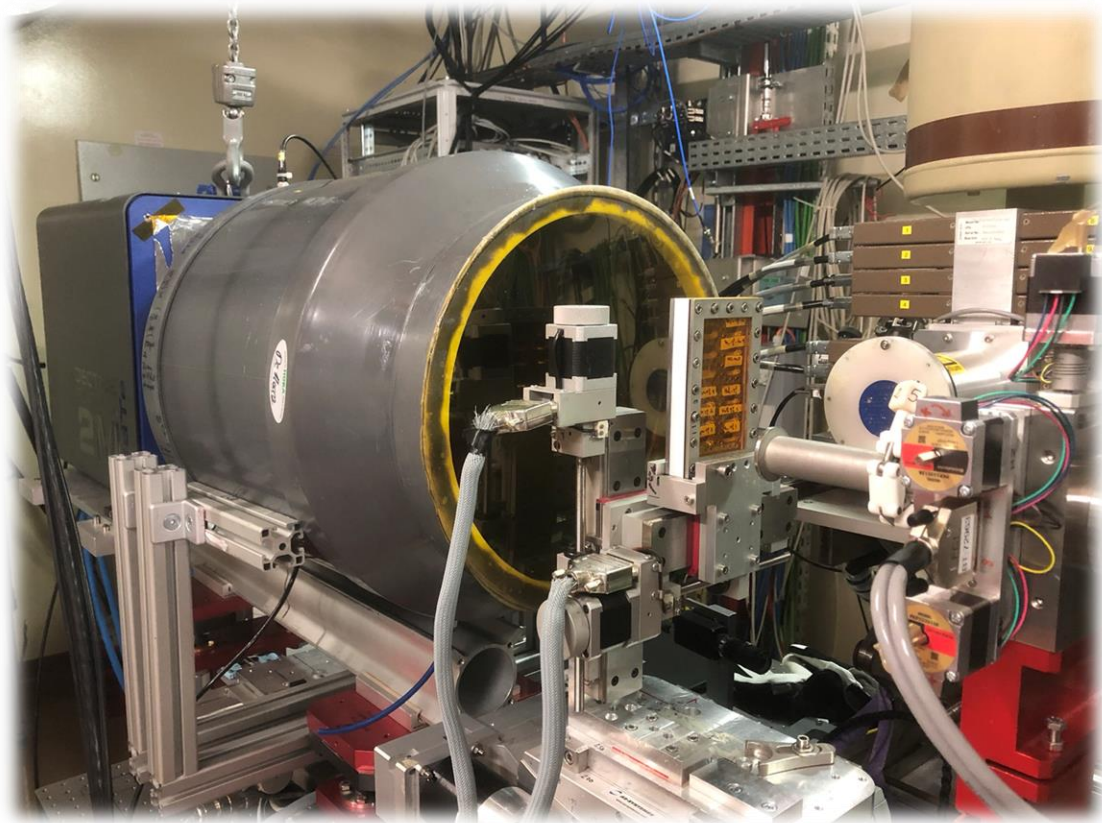


Figure 98 : Photographie du montage utilisé sur la ligne MARS en configuration SAXS

4. Analyse de la dégradation de la protéine

Une étude statistique a été réalisée, en mesurant dix fois chaque complexe, afin de calculer un spectre moyen et l'écart-type et de vérifier que les échantillons ne se sont pas endommagés sous le faisceau. Le milieu tampon utilisé lors de la réalisation des complexes ainsi que les cellules vides ont été analysés dans les mêmes conditions.

Le spectre moyen, en chaque point, des différents échantillons est calculé suivant la formule :

$$m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Ensuite la variance, qui représente la dispersion des valeurs d'un échantillon a été calculé, en chaque point, des différents échantillons selon la formule :

$$V = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - m)^2$$

L'écart-type est déduit de la variance, en chaque point, selon la formule :

$$\sigma = \sqrt{V}$$

Enfin, le coefficient de variation, noté RSD, a été calculée, en chaque point, suivant la formule :

$$RSD = \frac{\sigma}{m}$$

Le coefficient de variation moyen, de chaque échantillon analysé, est présentés dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Coefficient de variation moyen, en pourcentage, des dix spectres enregistrés pour chaque échantillon.

Echantillon	Coefficient de variation (%)
<i>Tube vide n°1</i>	1,99 ± 0,01
<i>Tube vide n°2</i>	1,66 ± 0,01
<i>Milieu tampon n°1</i>	1,99 ± 0,01
<i>Milieu tampon n°2</i>	1,29 ± 0,01
<i>Pu₂Tf n°1</i>	2,22 ± 0,01
<i>Pu₂Tf n°2</i>	4,57 ± 0,01
<i>Pu₂Tf n°3</i>	2,12 ± 0,01
<i>Pu₂Tf-DFOB</i>	1,85 ± 0,01
<i>Th₂Tf n°1</i>	34,50 ± 0,25 / 2,12 ± 0,01 (<i>après retrait du spectre différent</i>)
<i>Th₂Tf n°2</i>	2,25 ± 0,01
<i>Th₂Tf n°3</i>	2,86 ± 0,01
<i>Th₂Tf-DFOB</i>	1,82 ± 0,01
<i>Fe₂Tf n°1</i>	1,25 ± 0,01
<i>Fe₂Tf n°2</i>	1,55 ± 0,01
<i>Fe₂Tf-DFOB</i>	1,45 ± 0,01
<i>apoTf n°1</i>	1,44 ± 0,01
<i>apoTf n°2</i>	1,81 ± 0,01
<i>apoTf n°3</i>	1,50 ± 0,01

Le coefficient de variation est similaire entre les tubes vides et les échantillons sondés ce qui indique qu'aucune dégradation sous faisceau n'a été constatée durant l'acquisition des données. De plus, les spectres d'acquisition du complexe Th₂Tf n°1 sont comparés avec et sans prendre en considération le spectre différent (Figure 99). Cette comparaison confirme qu'aucune dégradation de la protéine n'est observée mais plutôt une variation d'intensité du faisceau de rayons X incident ou un problème de synchronisation des différents périphériques et systèmes électroniques mis en jeu dans le processus d'acquisition de données.

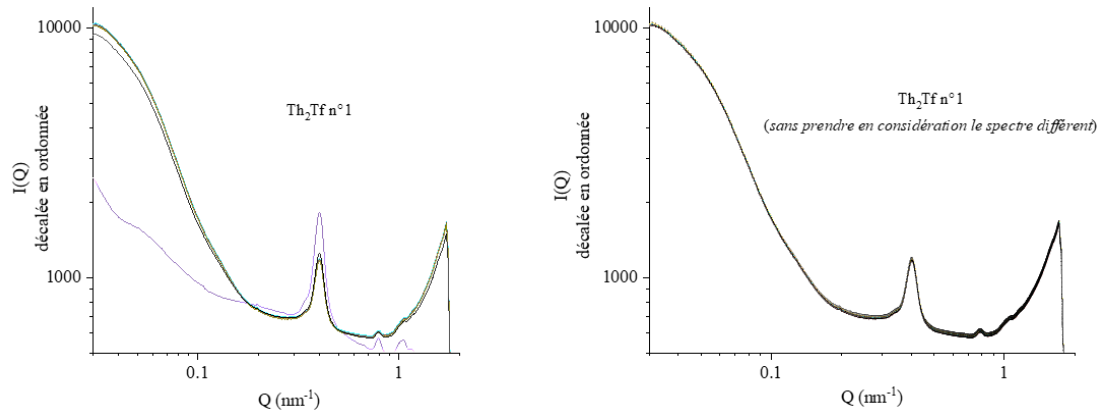


Figure 99 : Comparaison des dix spectres du complexe $\text{Th}_2\text{Tf n}^\circ 1$, ainsi que le spectre moyen, est comparé au complexe $\text{Th}_2\text{Tf n}^\circ 1$ après avoir retiré le spectre différent

Annexe C : Autres méthodes d'analyses des complexes An(IV)-protéine

1. Analyses des échantillons par Infrarouge

Les spectres ATR-FTIR ont été enregistrés sur un instrument Bruker Tensor 27 en utilisant un détecteur au tellurure de mercure et de cadmium (MCT) refroidi à l'azote. Un cristal de diamant à six réflexions est utilisé comme unité de réflexion. Pour l'acquisition, 50 μ L sont placés dans une cellule micro-volume directement posée sur le cristal. Les spectres sont acquis avec une résolution de 4 cm^{-1} et 1024 balayages sont moyennés pour chaque échantillon. L'ouverture de la fente pour le faisceau incident est optimisée à 3 mm. Pour les échantillons contenant du plutonium, un module spécifique a été utilisé (Figure 100).

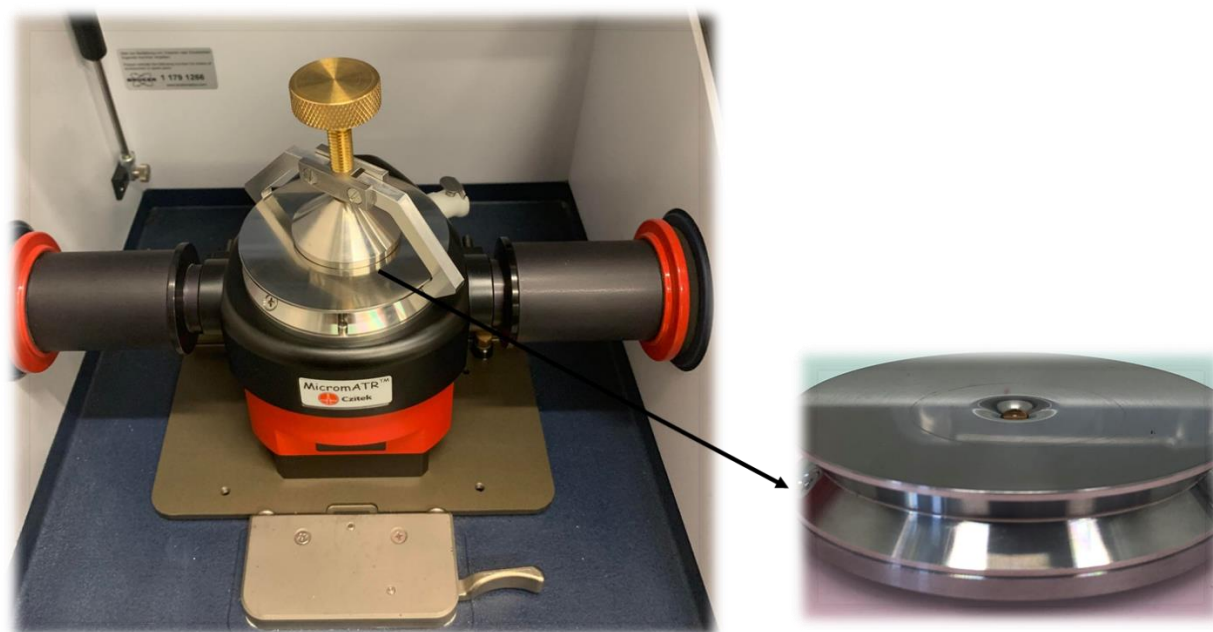


Figure 100 : Module ATR multi-réflexion diamant utilisé lors de l'acquisition d'un échantillon contenant du Pu

L'échantillon de plutonium est placé dans la cavité, au contact du diamant sur le support aimanté. L'échantillon est ensuite confiné avec un cône en acier. Ce cône possède une surface interne en téflon afin de limiter les interactions avec le métal du cône. Un système de fixation avec une pince est rajouté afin de maintenir le cône perpendiculairement au module et de rendre le système amovible. Ce support s'aimante sur le module IR et l'acquisition peut être réalisée. Toutefois les blancs de mesure doivent être effectués avant d'analyser l'échantillon contenant le plutonium.

2. Analyses des échantillons par UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible des échantillons ont été enregistrés dans la région des longueurs d'onde 200-1100 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis Agilent Cary 60 à faisceau unique et d'une cuvette en quartz de petit volume et de 10 mm de trajet optique.

Pour les échantillons contenant du plutonium, cette acquisition est effectuée directement en boîte à gant. Pour ce faire, un porte-cuve est placé en boîte à gant et relié au spectrophotomètre par des fibres optiques, comme illustré en Figure 101.

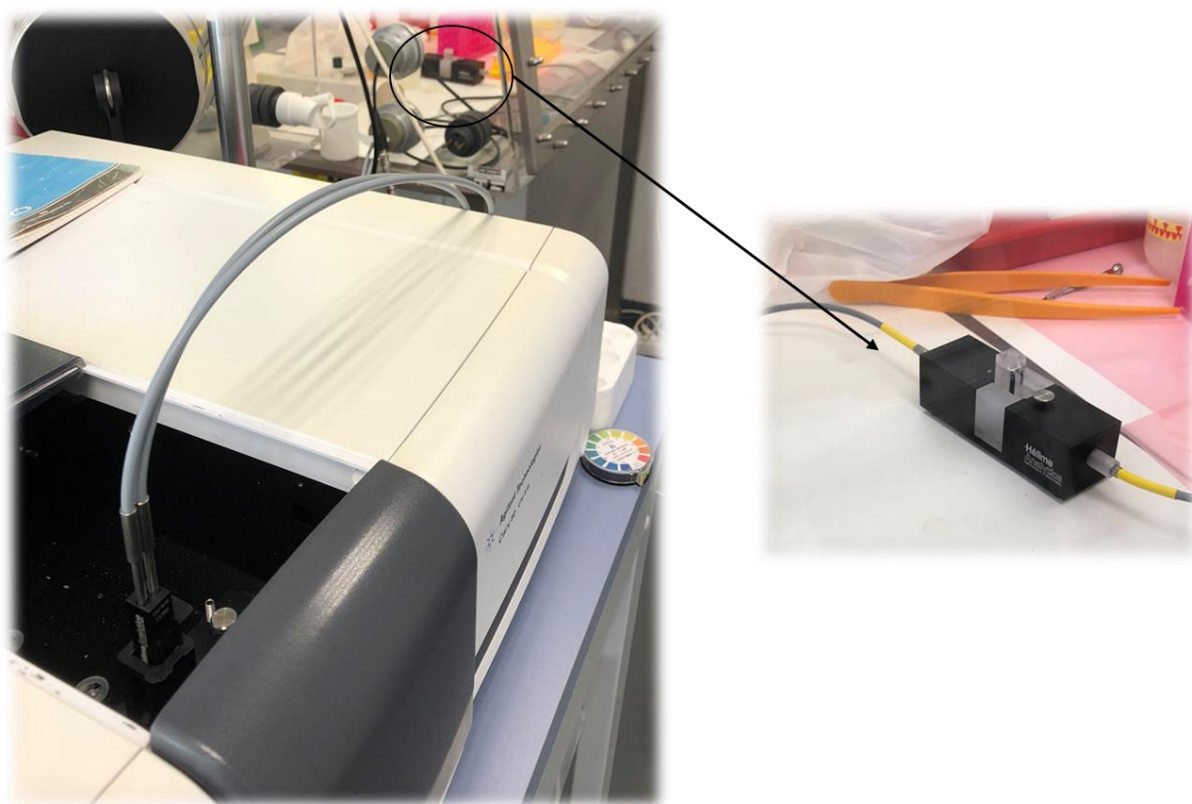


Figure 101 : Photographie d'acquisition d'un spectre UV-Visible d'un échantillon contenant du Pu

Annexe D : Données complémentaires de l'étude des complexes An(IV)-ferritine

1. Description de la ferritine utilisée

La ferritine de la rate de cheval est composée de 24 sous-unités de deux types différents : lourde (H) et légère (L). Dans le foie et dans la rate, la sous-unité L domine (jusqu'à 90 %).

a) Séquence de la sous-unité H

Longueur : 182 acides-aminés ; Masse (Da) : 21,269

TTAFPSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELHASVYVYLSMSFYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHEE
REHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDQDDWENGLKAMECALHLEKNVNESLLELHKLATD
KNDPHLCDFLETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRRMGAPESGMAEYLFDKHTLGECDES

b) Séquence de la sous-unité L

Longueur : 175 acides-aminés ; Masse (Da) : 19,978

SSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLYLRASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVCHFFRELAEEKREGA
ERLLKMQNQRGGRALFQDLQKPSQDEWGTTLDAMKAAIVLEKSLNQALLDLHALGSAQAD
PHLCDFLESHFLDEEVKLIKMGDHLTNIQRLVGSQAGLGEYLFERLTLKHD

M : Methionine	H : Histidine	I : Isoleucine	Y : Tyrosine
S : Serine	K : Lysine	R : Arginine	L : Leucine
Q : Glutamine	E : Glutamic acid	N : Asparagine	D : Aspartic acid
P : Proline	T : Threonine	C : Cysteine	F : Phenylalanine

2. Minéralisation et dosage par ICP-MS/MS

Les étapes de minéralisation et de dosage par ICP-MS/MS (Agilent 8800, Tokyo, Japon) ont été réalisées par le Dr. Marta Garcia Cortes et le Dr. Carole Bresson au laboratoire du Service d'Etudes Analytiques et de Réactivité des Surfaces du CEA Saclay.

a) Minéralisation et dosage du Fe présent dans la ferritine par ICP-MS/MS

Les échantillons de la ferritine pour la réalisation de la courbe de charge ont été digérés dans des tubes en polypropylène de 15 mL, à température ambiante pendant 48 h, avec 1 mL de HCl 34-37% (Plasmasure plus degré, SCP Science) et 1 mL de HNO₃ 67-70% (Plasmasure plus degré, SCP Science). Les échantillons digérés sont ensuite évaporés à sec à 95 °C à l'aide d'un bloc chauffant (≈3 h). Enfin, 10 mL de HNO₃ à 2% sont ajoutés aux tubes placés dans le bain à ultrasons pendant 3 minutes. Les échantillons ont été analysés par ICP-MS/MS (Agilent 8800, Tokyo, Japon). La détection du Fe est réalisée en introduisant de l'hélium dans la cellule de collision/réaction à un débit de 4 mL min⁻¹ (détection sur la masse ⁵⁶Fe => ⁵⁶Fe) et en réglant la discrimination de l'énergie cinétique (KED) à 5V. Les transitions ⁵⁴Fe => ⁵⁴Fe, ⁵⁷Fe => ⁵⁷Fe sont également surveillées, mais seul l'isotope ⁵⁶Fe est utilisé pour quantifier la teneur en fer de la ferritine. La quantification de la teneur en fer des échantillons de la ferritine (Tableau 31) est effectuée après étalonnage externe avec des étalons de Fe dans HNO₃ 2% préparés à partir de solutions étalons de Fe ICP-MS (SPEX CertiPrep, Inc.). Les conditions de fonctionnement ont été optimisées quotidiennement à l'aide d'une solution de réglage.

Tableau 31 : Quantification du fer dans la ferritine stockée (stock-F) par ICP-MS/MS

Milieu tampon	[F] (mg/mL)	[F] (M)	[Fe] (M)	[Fe] (µg/mL)	Fe/F
MES - NaCl	1,07	2,24.10 ⁻⁶	1,16.10 ⁻³	65	517 ± 26

b) Minéralisation et dosage du Th par ICP-MS/MS

Les surnageants ont été digérés dans des tubes en polypropylène de 15 mL à température ambiante pendant 48 h avec 1 mL de HCl 34-37% (Plasmasure plus degré, SCP Science) et 1 mL de HNO₃ 67-70% (Plasmasure plus degré, SCP Science). Les échantillons digérés sont ensuite évaporés à sec à 95 °C à l'aide d'un bloc chauffant (≈3 h). Enfin, 10 mL de HNO₃ à 2% sont ajoutés aux tubes et placés dans le bain à ultrasons pendant 3 minutes. Ensuite, 1 mL de cette solution est diluée à 10 mL avec du HNO₃ à 2% (Suprapure).

Les échantillons ont été analysés par ICP-MS/MS (Agilent 8800, Tokyo, Japon). La détection simultanée de Fe et Th est effectuée en introduisant He dans la cellule de collision/réaction à un débit de 4 mL min⁻¹ et KED = 5V (détection sur la masse ⁵⁶Fe => ⁵⁶Fe et ²³²Th => ²³²Th pour Fe et Th, respectivement). Les transitions ⁵⁴Fe => ⁵⁴Fe, ⁵⁷Fe => ⁵⁷Fe sont également surveillées, mais seul l'isotope ⁵⁶Fe est utilisé pour déterminer le rapport Th/Fe. Les conditions d'opération ont été optimisées quotidiennement en utilisant une solution d'accord. La détermination des rapports molaires Th/Fe est effectuée avec un étalonnage externe et des étalons de Th et de Fe préparés à partir de solutions étalons ICP-MS à élément unique (SPEX CertiPrep, Inc.). Des solutions à concentration constante de Fe (égale à celle des échantillons) et à concentration croissante de Th ont été préparées dans HNO₃ 2%, ce qui a permis d'obtenir une gamme Th/Fe de 0 à 3,4. Un blanc analytique constitué de carbonate de thorium dans du MES sans protéine a été préparé dans les mêmes conditions. Dans le filtrat de cet échantillon, 99% du Th initial est mesuré, ce qui montre que le filtre n'adsorbe pas le Th.

c) Tableaux récapitulatifs des données obtenues par ICP-MS/MS

Les Tableau 32 et Tableau 33 regroupent les données de préparation et de mesures par ICP-MS/MS de la courbe de charge de la ferritine par le Th(IV).

Tableau 32 : Préparation de la courbe de charge de Th(IV)-F : rapports molaires correspondant à chaque point abscisse de la courbe. Un triplicata a été réalisé pour chaque point. Le rapport moyen F:Th a été utilisé pour l'abscisse de la courbe de charge

Th/Fe ratio	Th/F ratio	average ratio Th/Fe	average ratio Th/F	Th/Fe standard deviation	Th/F standard deviation
8,89	4596	8,86	4583	0,03	13
8,86	4582				
8,84	4569				
6,86	3545	6,94	3586	0,07	37
6,99	3615				
6,96	3599				
6,00	3104	5,90	3050	0,24	123
5,63	2909				
6,07	3136				
5,00	2585	4,95	2560	0,04	23
4,95	2557				
4,91	2540				
3,98	2060	3,97	2050	0,03	16
3,98	2060				
3,93	2034				
3,01	1556	3,00	1551	0,01	4
3,00	1550				
2,99	1548				
2,01	1038	2,00	1033	0,02	13
2,02	1043				
1,97	1019				
1,52	788	1,52	786	0,02	8
1,53	792				
1,50	777				
0,99	510	0,99	510	0,00	1
0,98	509				
0,99	510				
0,49	255	0,49	251	0,01	5
0,48	246				
0,49	252				

Tableau 33 : Mesures de Th et Fe par ICP-MS/MS et UV-Vis pour le dernier point de la courbe

Th/Fe	Th/F	average ratio	average ratio	Th:Fe standard	Th:F	
5,33	2757	5,45	2818	0,10	53	<i>UV - Vis</i>
5,50	2846					
5,52	2852					
4,98	2574	5,54	2866	0,74	383	<i>ICP-MS</i>
6,38	3299					
5,27	2724					
5,77	2985	5,50	2843	0,33	171	
5,13	2653					
5,59	2892					
4,27	2207	4,28	2211	0,12	65	
4,41	2278					
4,16	2149					
3,51	1814	3,38	1750	0,19	100	
3,16	1634					
3,48	1801					
2,33	1203	2,09	1082	0,37	189	
2,28	1178					
1,67	864					
0,83	431	1,02	528	0,18	93	
1,04	537					
1,19	616					
0,90	466	0,93	483	0,33	173	
1,28	664					
0,62	320					
0,26	137	0,27	139	0,02	8	
0,29	148					
0,25	132					
0,07	34	0,05	28	0,01	5	
0,05	25					
0,05	25					

3. Calcul des modèles moléculaires

Tous les calculs des modèles moléculaires par MD et DFT ont été effectués au Zentrum für Informationdienste und Hochleistungrechnen de la Technische Universität Dresden Universität Dresden, Allemagne, par le Pr. Satoru Tsushima.

a) Réalisation des modèles F-Pu calculés par dynamique moléculaire

Les simulations MD ont été réalisées à l'aide du progiciel AMBER 1555 avec le champ de force ff99SB appliqué sur la protéine. Pour Pu^{4+} , les paramètres de type 12-6-4 LJ développés par Merz et ses collaborateurs sont employés (P. Li, Song et Merz, 2015). Pour les ions carbonates, des paramètres supplémentaires sont employés (Kerisit et Liu, 2014). L'état de protonation de la protéine a été ajusté pour modéliser un pH de 7,4. Des ions Na^+ ont été ajoutés pour rendre le système électrostatiquement neutre.

La trajectoire MD a été enregistrée par pas de 50 ps. Les simulations ont été réalisées avec deux structures initiales différentes (simulations A et B) pendant 150 ns de temps de simulation MD. Pour les deux simulations, les positions des 6 atomes de Pu par rapport à celles de la protéine ont atteint l'équilibre vers le milieu de la simulation de 150 ns. Par conséquent, la dernière trajectoire à 75 ns a été utilisée pour l'échantillonnage statistique afin de garantir les structures équilibrées. La RMSD (Root Mean Square Derivate) des deux simulations est indiquée dans le Chapitre 2.

Dans les deux simulations, chaque environnement proche des atomes de plutonium a été isolé et leur structure est représentée dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Structure et interaction locale de chaque plutonium dans les deux simulations calculées par simulation MD. Dans toutes les images, le plutonium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.

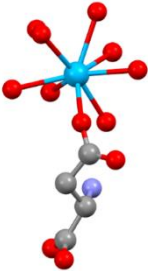
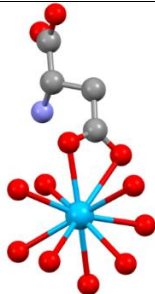
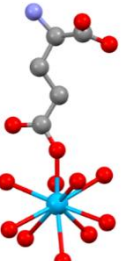
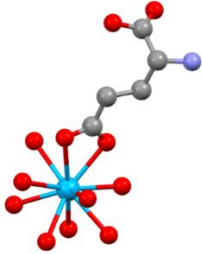
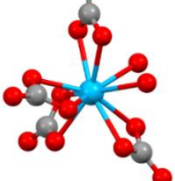
	<i>Simulation A</i>	<i>Simulation B</i>
<p>Pu 1</p> <p>A : 1 Asp (1 O) + 1 carb (2 O) + 7 Eau (7 O)</p> <p>B : 4 Glu (7 O) + 3 Eau (3 O)</p>		
<p>Pu 2</p> <p>A : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p> <p>B : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p>		
<p>Pu 3</p> <p>A : 1 Asp (1 O) + 1 Glu (2 O) + 7 Eau (7 O)</p> <p>B : 1 Asp (1 O) + 1 Glu (1 O) + 1 carb (2 O) + 6 Eau (6 O)</p>		
<p>Pu 4</p> <p>A : 1 Glu (2 O) + 8 Eau (8 O)</p> <p>B : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p>		
<p>Pu 5</p> <p>A : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p> <p>B : 2 carb (4 O) + 6 Eau (6 O)</p>		
<p>Pu 6</p> <p>A : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p> <p>B : 1 carb (2 O) + 8 Eau (8 O)</p>		

b) Réalisation des modèles de thorium calculés par DFT :

Les calculs de théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) sur les interactions de Th(IV) avec les résidus d'acides aminés ainsi qu'avec les ligands carbonates ont été réalisés au niveau B3LYP dans l'eau grâce à l'utilisation du modèle de continuum polarisable de type conducteur (CPCM) en utilisant le code Gaussian16. Les potentiels de noyau effectifs de type Stuttgart (petit noyau ECP dans le cas de Th) et les ensembles de base correspondants ont été utilisés sur tous les éléments, à l'exception de l'hydrogène. Pour H, l'ensemble de base tout-électron de qualité triple-zeta a été utilisé.

Le Tableau 35 regroupe la structure locale calculée par DFT, de chaque complexe de thorium avec un groupement aspartate ou glutamate dans des deux types d'interaction : monodente et bidente.

Tableau 35 : Structure et interaction locale du Th avec des acides aminés. Le thorium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.

<p>Th 2 1 Asp monodente (1 O) + 8 Eau (8 O)</p>		<p>Th 1 1 Asp bidente (2 O) + 8 Eau (8 O)</p>	
<p>Th 4 1 Glu monodente (1 O) + 9 Eau (9 O)</p>		<p>Th 3 1 Glu bidente (2 O) + 8 Eau (8 O)</p>	
<p>Th-carb 4 carbonates (8 O) + 2 Eau (2 O)</p>			

Annexe E : Données complémentaires de l'étude des complexes $An(IV)_2Tf$

1. Calculs de modèles moléculaires

Tous les calculs des modèles moléculaires par MD ont été effectués au Zentrum für Informationdienste und Hochleistungsrechnen de la Technische Universität Dresden Universität Dresden, Allemagne, par le Pr. Satoru Tsushima.

Les calculs ont été effectués sur Pu_2 -Tf incorporant un nombre différent de CO_3^{2-} (0 à 3) autour des centres Pu. La structure de départ a été prise de Ce_2 -Tf (PDB : 1FCK) (H. M. Baker et al., 2000). Les atomes manquants, y compris l'hydrogène, ont été ajoutés et les états de protonation ont été ajustés pour imiter le pH physiologique (pH 7,4). Les paramètres de Lennard-Jones de type 12-6-4 pour Pu^{4+} ont été repris de Metz (Metz, Kästner, Sokol, Keal et Sherwood, 2014) comme dans l'étude précédente sur la ferritine. Les calculs ont été effectués pour un temps de simulation de 100 ns.

Le Tableau 36 regroupe la structure locale calculée par MD, de chaque Pu dans les lobes de chaque modèle de la transferrine.

Tableau 36 : Structure et interaction locale de chaque plutonium dans les modèles Pu₂Tf (1carb), Pu₂Tf (2carb) et Pu₂Tf (3carb). Dans toutes les images, le plutonium est représenté par des boules bleues, le carbone par des boules grises, l'oxygène par des boules rouges et l'azote par des boules violettes.

	<i>Lobe N</i>	<i>Lobe C</i>
<p>Pu₂Tf (1carb)</p> <p>Lobe N : 1 Glu (1 O) + 1 Ser (1 O) + 3 Eau (3 O) + 1 Asp (2 O) + 1 carb (2 O)</p> <p>Lobe C : 1 Ala (1 O) + 1 Pro (1 O) + 4 Eau (4 O) + 1 Asp (2 O) + 1 carb (2 O)</p>		
<p>Pu₂Tf (2carb)</p> <p>Lobe N : 4 Eau (4 O) + 1 Asp (2 O) + 2 carb (4 O)</p> <p>Lobe C : 1 Thr (1 O) + 1 Eau (1 O) + 1 Asp (2 O) + 2 carb (4 O)</p>		
<p>Pu₂Tf (3carb)</p> <p>Lobe N : 1 Asp (1 O) + 2 Eau (2 O) + 3 carb (6 O)</p> <p>Lobe C : 2 Eau (2 O) + 1 Asp (2 O) + 3 carb (6 O)</p>		

2. Spectrophotométrie UV-Visible de la complexation d'un sidérophore avec Pu₂Tf

Les spectres d'absorption des différents complexes analysés par UV-Visible, à pH physiologique, sont présentés Figure 102. Sur cette figure, la comparaison a été réalisée entre les spectres du complexe Pu₂Tf (ligne rouge), l'apotransferrine (ligne noire), la DFOB (ligne orange), le complexe Pu-DFOB (ligne rose) et le complexe de Pu₂Tf-DFOB (ligne bleue). Pour le complexe Pu₂Tf-DFOB, la DFOB a été ajoutée avec une stœchiométrie de 10 : 1. Après 24h, ce complexe a été rincé, plusieurs fois, afin d'éliminer la DFOB libre en solution. Les spectres contenant la protéine ont été normalisés par rapport à la bande d'absorption à 278 nm.

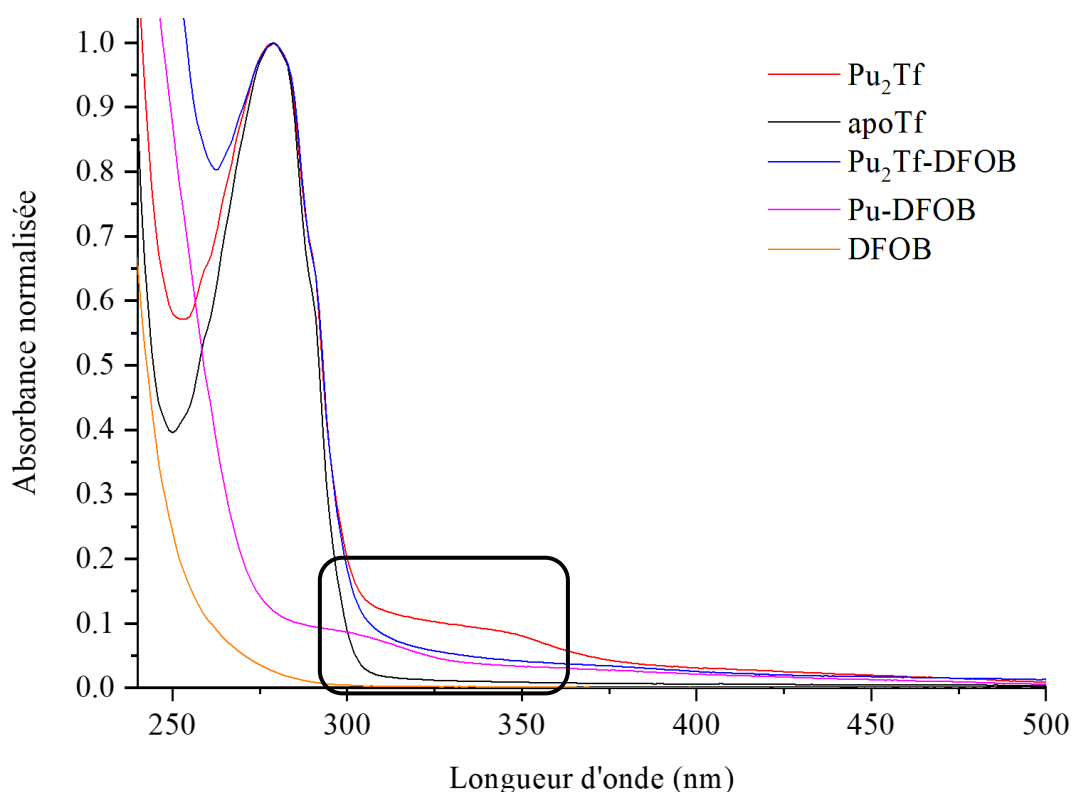


Figure 102 : Spectrophotométrie des complexes Pu₂Tf (ligne rouge), Pu-DFOB (ligne rose), DFOB libre (ligne orange), apotransferrine (ligne noire) et Pu₂Tf-DFOB (ligne bleue), à pH physiologique. Les spectres contenant la protéine sont normalisés sur la bande caractéristique à 280 nm. Les spectres de la DFOB libre et Pu-DFOB sont normalisés par la concentration de DFOB par rapport au complexe Pu₂Tf-DFOB.

La comparaison des spectres dans la zone entre 300 et 350 nm (encadrée en noir) correspond soit à la formation d'un complexe ternaire entre le Pu(IV), la transferrine et la DFOB, soit à une moyenne des spectres des complexes Pu-DFOB et Pu₂Tf.

Résumé :

L'acquisition d'informations structurales sur les complexes d'actinides avec les protéines permet d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques de contamination. Notre étude porte sur le plutonium ainsi que sur son analogue thorium (au degré d'oxydation +IV), dont le comportement présente des similitudes avec l'homéostasie du fer. Une première partie de mon travail a eu pour objectif de décrire les modes d'interaction entre Pu/Th et la ferritine qui régule le stockage du fer dans les cellules. La ferritine est composée d'un cœur ferrique d'oxo-hydroxo de Fe(III) entouré d'un anneau protéique. Les mesures XAS (EXAFS) couplées à de la modélisation ont permis d'identifier les interactions entre Pu/Th et la ferritine mais aussi de déterminer la structure des sites de complexation. Le deuxième axe de recherche a porté sur la complexation de Pu/Th par la transferrine dont le rôle est le transport du fer sérique vers les cellules. Les mesures XAS (EXAFS) couplées à de la modélisation ont permis de montrer que Pu/Th(IV) interagissent avec les deux sites de complexation du fer dans la protéine. Dans ces conditions, la modification de la structure tertiaire de la protéine a été analysée par SAXS. Cette dernière paraît être en conformation ouverte lorsque deux cations Pu/Th lui sont liés alors que dans le cas du Fe(III) elle adopte une conformation fermée. La conformation de la transferrine (fermée) est essentielle à sa reconnaissance par la protéine réceptrice à la surface cellulaire afin d'y être internalisée.

Mots clés :

Plutonium, transferrine, ferritine, métalloprotéine, XAS

Abstract:

The acquisition of structural information on actinide complexes with proteins allows to improve the understanding of biological mechanisms of contamination. Our study focuses on plutonium and its analogue thorium (at oxidation state +IV), whose behaviour shares some similarities with the homeostasis of iron. The first part of my work aimed at describing the interaction modes between Pu/Th and ferritin which regulates the storage of iron in cells. Ferritin is composed of a ferric core of Fe(III) oxo-hydroxo surrounded by a protein ring. XAS measurements (EXAFS) coupled with modelling allowed to identify the interactions between Pu/Th and ferritin but also to determine the structure of the complexation sites. The second axis of research focused on the complexation of Pu/Th by transferrin whose role is the transport of serum iron into the cells. XAS measurements (EXAFS) coupled with modelling have shown that Pu/Th(IV) interact with the two iron complexation sites in the protein. Under these conditions, the modification of the tertiary structure of the protein was analysed by SAXS. The protein appears to be in an open conformation when two Pu/Th cations are bound to it, whereas in the case of Fe(III) it adopts a closed conformation. The closed conformation of transferrin is essential for its recognition by the receptor protein on the cell surface to be internalized.

Key words:

Plutonium, transferrin, ferritin, metalloprotein, XAS