Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons

Jeanne Fèvre

▶ **To cite this version:**

Jeanne Fèvre. Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons. Radiochimie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ4050 . tel-03874566

HAL Id: tel-03874566
https://theses.hal.science/tel-03874566

Submitted on 28 Nov 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.

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

THÈSE DE DOCTORAT

Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons

Jeanne Fèvre

Institut de Chimie de Nice (ICN)

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Chimie de l'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Dr. Christophe DI GIORGIO
Co-dirigée par : Pr. Christophe DEN AUWER
Soutenue le : 4 octobre 2022

Devant le jury, composé de :
Dr. Nicolas TSAPIS, Rapporteur, Institut Galien Paris-Saclay, Châtenay Malabry
Dr. Jean AUPIAIS, Rapporteur, CEA DAM DIF, Bruyère le Chatel
Dr. Georges CARLE, Examinateur, TIRO-MATOs, Université Côte d'Azur, Nice
Dr. Anne VAN DER MEEREN, Examinatrice, CEA DRF LRT, Bruyère le Chatel
Dr. Christophe DI GIORGIO, Directeur de thèse, ICN, Université Côte d'Azur, Nice
Pr. Christophe DEN AUWER, Co-Directeur de thèse, ICN, Université Côte d'Azur, Nice

AGENCE INNOVATION DÉFENSE

Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons

Composition du jury :

Rapporteurs

Dr. Nicolas TSAPIS, Rapporteur, Institut Galien Paris-Saclay, Châtenay Malabry
Dr. Jean AUPIAIS, Rapporteur, CEA DAM DIF, Bruyère le Chatel

Examinateurs

Dr. Georges CARLE, Examinateur, TIRO-MATOs, Université Côte d'Azur, Nice (Président du jury)
Dr. Anne VAN DER MEEREN, Examinatrice, CEA DRF LRT, Bruyère le Chatel

Encadrement de la thèse

Dr. Christophe DI GIORGIO, Directeur de thèse, ICN, Université Côte d'Azur, Nice
Pr. Christophe DEN AUWER, Co-Directeur de thèse, ICN, Université Côte d'Azur, Nice

Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons

Une exposition massive des populations aux actinides et au plutonium en particulier pourrait intervenir suite à l'inhalation, ou à l'entrée dans l'organisme, de petites particules dispersées par le vent après un accident (explosion dans l'industrie nucléaire, acte de guerre…). La rétention et le devenir des particules inhalées dépendent de leur taille et de leur forme physico-chimique. En règle générale, plus elles sont petites et moins solubles, plus elles sont dangereuses, car elles vont atteindre les alvéoles pulmonaires et seront principalement retenues pendant de longues périodes (décennies) dans les macrophages alvéolaires qui vont constituer de véritables sanctuaires vis-à-vis de ces radioéléments. Quant à la fraction soluble, capable de passer dans la circulation, ou en cas de blessures, le Pu(IV) (degré d'oxydation en milieu biologique) sera rapidement transféré et stocké dans le foie et les os où la dose délivrée pendant de longues périodes contribuera à divers effets délétères (cancers notamment). A l'heure actuelle, le seul traitement approuvé par la pharmacopée (en France notamment) et la FDA (Food and Drug Administration, aux Etats Unis) pour traiter une contamination interne par des actinides est l'administration, par voie intraveineuse (i.v), de sels de Diéthylène Triamine Pentaacétate (DTPA). L'efficacité de ce traitement reste surtout limitée aux formes solubles circulantes du Pu. De plus, la courte biodisponibilité du DTPA empêche cette thérapie par chélation d'exercer un effet réel sur les principaux compartiments de séquestration biologique (poumons, os, foie). Pour surmonter cette limitation et fournir une approche complémentaire à la thérapie de décorporation par le DTPA, nous développons des analogues polymériques du DTPA, basés sur un polyéthylèneimine (PEI) commercial, pour cibler indirectement ces sites de rétention. Ce travail de thèse fait suite à une thèse dans laquelle nous avons démontré que le PEI-MC (analogue polymérique structurel du DTPA) et le PEI-MP (analogue phosphonate) étaient capables, *in vitro*, de complexer le Th(IV), le Pu(IV) et l'U(VI) avec des efficacités comparables à celle du DTPA. Cette thèse constitue une première étude concernant les capacités de décontamination du PEI-MC et du PEI-MP vis-à-vis du Th(IV), utilisé comme analogue du Pu(IV), et incorporé sous forme soluble dans une matrice d'hydroxyapatite ou sous forme colloïdale (nanoparticules de Th) dans des macrophages afin de mimer au mieux des contaminations osseuses ou pulmonaires. La forte affinité du PEI-MP pour un des constituants majoritaires de la matrice osseuse, l'hydroxyapatite (HAp), son absence de cytotoxicité sur les cellules constitutives de l'os (ostéocytes et ostéoblastes), ainsi que des études thermodynamiques et cinétiques sur la décontamination de HAp, permettent d'envisager le développement du PEI-MP comme un candidat sérieux pour la décontamination du Pu(IV) séquestré au sein du tissus osseux. D'autre part, en combinant deux techniques (MET et ICP-MS) nous avons réalisé un suivi *in cellulo* des étapes de la phagocytose liées à la contamination de macrophages par des nanoparticules de thorium. Nous avons ensuite évalué l'efficacité de chélation de nos molécules vis-à-vis de ces formes insolubles à l'aide d'expériences *in vitro* (mise en contact avec les nanoparticules) et *in cellulo* (sur des macrophages contaminés). Ces résultats préliminaires mettent en évidence des paramètres importants liés à la contamination des macrophages par les actinides tels que la vitesse d'internalisation des nanoparticules de Th et l'effet des chélates en fonction de la dose et du temps. Globalement, cette thèse, a permis de mettre en place une méthodologie rigoureuse qui permet maintenant de tester ces polymères chélatants en conditions physiologiques sur leur(s) cible(s) biologique(s) réelle(s) : os, poumons voire foie qui agissent tous les trois comme des sites de rétention vis-à-vis des actinides en cas de contamination.

Mots-clés : actinides ; décorporation ; polymères chélatants ; DTPA ; PEI-MP ; PEI-MC

Chelating polymers for targeted decorporation of actinides: application to the bones and lungs

Human exposure to actinides and plutonium in particular can occur through the inhalation, or entry into the body, of small particles dispersed by the wind after an accident (incident in the nuclear industry or act of war …). The retention and the fate of the inhaled particles depend on their size and physicochemical form. Generally, the smallest and less soluble particles are the most dangerous, because they are capable of reaching the lung alveoli and will be mainly retained for long periods (decades) by the alveolar macrophages, which will act as sanctuaries for these radioelements. For the soluble fraction, capable of reaching the circulation, or in case of wounding, Pu(IV) (biological oxidation state) will be transferred very fast and stored in the liver and bones where the dose delivered over very long periods will contribute to various deleterious effects (cancers in particular).

Currently the only treatment approved by the pharmacopoeia (in France especially) and the FDA (Food and Drug Administration, in the United States) to treat internal contamination by actinides is the intravenous (i.v.) administration of Diethylene Triamine Pentaacetate (DTPA) salts. However, the effectiveness of DTPA is mainly confined to circulating actinides (soluble forms). Furthermore, the short biodisponibility of DTPA prevents this chelation therapy from having a real effect on the main biological sequestration compartments (lungs, bones, liver).

To overcome this limitation and to provide a complementary approach to the (DTPA) decorporation therapy, our group has ben developing polymeric analogues of DTPA, based on a commercial polyethyleneimine (PEI), to indirectly target these retention sites. In a previous project we have demonstrated that PEI-MC (a structural polymeric analog of DTPA) and PEI-MP (phosphonate analog) are able, *in vitro*, of complexing Th(IV), Pu(IV) and U(VI) with efficiencies comparable to that of DTPA. This project is a first study of the decontamination capacities of PEI-MC and PEI-MP towards Th(IV), used as an a surrogate of Pu(IV), and incorporated in soluble form in a hydroxyapatite matrix or in colloidal form in macrophages in order to mimic as well as possible bone or pulmonary contaminations.

The high affinity of PEI-MP for one of the major constituents of the bone matrix, hydroxyapatite (HAp), its absence of cytotoxicity toward bone constitutive cells (osteocytes and osteoblasts), as well as thermodynamic and kinetic studies on the decontamination of HAp, make it possible to consider the development of PEI-MP as a serious candidate for the decontamination of Pu(IV) sequestered within the bone tissue. On the other hand, by combining two techniques (TEM and ICP-MS), we carried out an *in cellulo* follow-up of the phagocytosis steps related to the contamination of macrophages by thorium nanoparticles. We then evaluated the chelation efficiency of our molecules towards these insoluble forms using *in vitro* (contact with nanoparticles) and *in cellulo* (on contaminated macrophages) experiments. These preliminary results highlight important parameters related to the contamination of macrophages by actinides such as the internalization rate of Th nanoparticles and the effect of chelates as a function of dose and time.

Overall, this thesis has allowed to set up a rigorous methodology which allows now to test these chelating polymers under physiological conditions on their real biological target(s): bones, lungs and even liver which all three act as retention sites for actinides in case of contamination.

Keywords: actinides; decorporation; chelating polymers; DTPA; PEI-MP; PEI-MC

Table des matières

Liste des abréviations **5**

Liste des figures **9**

Liste des tableaux **13**

Introduction **15**

Chapitre I : Etat de l'art, toxicité d'une contamination par inhalation ou blessure par des actinides et agents décorporants **21**

A. Introduction générale sur les actinides 23

I Généralités sur les actinides 23

II Le thorium 25

III Le plutonium 27

B. Toxicité des actinides 31

I Les principaux modes d'exposition : généralités 31

a. L'inhalation : généralités 33

b. Contamination par blessures 40

II La contamination par le Th : données épidémiologiques 45

a. Inhalation de Th 45

b. Le Th après injection, au niveau osseux 47

III La contamination par le Pu 48

a. Inhalation de Pu 49

b. Contamination de l'os par le plutonium 51

c. Etude d'un cas concret de contamination au Pu : le cas des travailleurs de Mayak 52

IV Conclusion sur la toxicité du Th et du Pu 59

C. Agents chélatants pour la décontamination des actinides 60

I Généralités 60

II Focus sur le DTPA 62

a. Utilisation classique 62

b. Formes particulières du DTPA 62

III Les analogues de sidérophores 66

a. Les catécholamides 67

b. Les hydroxypyridinones 68

IV Les macromolécules chélatantes 70

a. Les polymères chélatants 70

b. Les calix [n] arènes 72

V Les nanoparticules chélatantes 73

a. Les nanoparticules fonctionnalisées par le DTPA 73
b. Les nanoparticules chélatantes à base de N-triméthyl chitosan 74
c. Les nanoparticules à base de polyéthylène glycol 76
VI Méthodes de décorporation invasives 77
a. Le lavage broncho alvéolaire 77
b. L'excision de la blessure 77
D. Une stratégie de décontamination insuffisante à l'heure actuelle 79
I Les principaux verrous à l'utilisation du DTPA 79
II Notre projet : une stratégie complémentaire au DTPA 80
III Conclusion 85
Chapitre II : Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons. 87
A. Application au tissu osseux 89
I Anatomie et remodelage du tissu osseux 89
II Les agents de ciblage de l'os 93
a. Les tétracyclines 93
b. Les bisphosphonates et polyphosphonates 94
c. Les polymères ciblant l'os 97
III Effet des polymères chélatants sur une matrice minérale (HAp) biomimétique de l'os en cas de contamination par des actinides (Th, Pu) 102
a. Affinité des molécules chélatantes vis-à-vis de la HAp 102
b. Contamination de la matrice osseuse et caractérisation physico-chimique du complexe HAp-Th 103
c. Décontamination de la matrice osseuse par des molécules chélatantes 108
d. Tests de cytotoxicité sur les cellules osseuses 115
IV Conclusions 119
B. Application aux poumons 120
I Les macrophages alvéolaires, de véritables sanctuaires de séquestration des actinides ……..120
II Etude *in vitro* du système polymère chélatant/NPs de Th 125
a. Synthèse des NPs de Th 125
b. EXAFS des nanoparticules de thorium 128
c. Etude thermodynamique de l'équilibre Th colloïdal – Th soluble en présence de molécules chélatantes. 130
III Suivi de la phagocytose par des macrophages 264.7 des NPs de Th par imagerie MET et ICP-MS. 135
a. Evaluation de la capacité d'internalisation et du temps requis pour la phagocytose ……..135
b. Les différentes phases de la phagocytose et le trafic intracellulaire 138

IV Evaluation de la viabilité des macrophages RAW 264.7 en présence des NPs de Th ou des chélates 141
a. Viabilité des macrophages en présence de NPs 141
b. Viabilité des macrophages en présence des chélates 141
V Test de décontamination sur macrophages RAW 264.7 146
a. Etudes de la viabilité cellulaire en fonction du traitement per-internalisation ou post-internalisation des NPs de thorium 148
b. Effet du traitement per-internalisation NPs 150
c. Effet du traitement post-internalisation NPs 155
VI Conclusion 160
Chapitre III : Partie expérimentale 163
A. Réactifs et analyses 165
B. Synthèses des polymères chélatants 168
I Synthèse du PEI-MC 168
II Synthèse du PEI-MP 169
III Détermination de la formule brute des molécules chélatantes (PEI-MC et PEI-MP) 170
C. Partie expérimentale : application au tissu osseux 172
I Effet des polymères chélatants sur une matrice minérale (HAp) biomimétique de l'os en cas de contamination par des actinides (Th, Pu). 172
a. Analyse thermogravimétrique de l'affinité des polymères pour la HAp 172
b. Contamination de la matrice osseuse 172
II Décontamination de la matrice osseuse par des molécules chélatantes 173
a. Aspects thermodynamiques 173
b. EXAFS de la HAp-Th, PEI-MP-Th et PEI-MP-Th-HAp 174
c. Suivi cinétique 178
III Cytotoxicité des molécules chélatantes 178
D. Partie expérimentale : application aux poumons 180
I Synthèse des nanoparticules de thorium 180
a. Protocole 180
b. Préparation des échantillons MET 180
c. Analyse DLS 181
d. Analyse EXAFS des nanoparticules de thorium 181
II Etude thermodynamique et cinétique de l'équilibre Th colloïdal (NPs) – Th soluble en présence de molécules chélatantes. 181
a. Protocole de dilution des nanoparticules de Th 181
b. Protocole de l'étude thermodynamique de l'équilibre Th sous forme colloïdale (NPs) *vs* forme soluble en présence de molécules chélatantes 182
III Suivi de la phagocytose 183

a. Protocole générale de culture cellulaire 183
b. Etudes préliminaires ICP-MS 184
c. Protocole de suivi de la phagocytose 185
IV Test de cytotoxicité 187
a. Formule de calcul de la cytotoxicité 187
b. Cytotoxicité des nanoparticules de thorium 189
c. Cytotoxicité des molécules chélatantes 190
V Test de décontamination sur macrophages RAW 264.7 191
a. Expérience de per-internalisation 191
b. Expérience de post-internalisation 192
Conclusion et perspectives 193
Références 201
Annexes 227

Liste des abréviations

η : Rendement

AA : Acide Aminé

AI : Région Alvéolaire Interstitielle

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATG : Analyse ThermoGravimétrique

BB : Région Bronchiolaire

bb : Région bronchique

BP(s) : Bisphophonate (s)

Bq : Becquerel

CAM : Groupe catécholamide

CE_{50} : Concentration Efficace à 50 %

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique

DAMA : Diamètre aérodynamique médian en activité

DL_{50}(30) : Dose nécessaire pour que 50 % de la population animale testée meure, au bout de 30 jours

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DOTMP : l'acide 10,13-dioxo-1,4,7-triazacyclopentadecane-4,7,10- tri(méthylène phosphonique)

DTPA : l'acide diéthylène triamine penta acétique

DTPMP : l'acide diethylène triamine pentaméthylène phosphonique

EDTA : l'acide éthylènediaminetétraacétique

EDTMP : l'acide éthylènediaminetétraméthylène phosphonique

ESH : Electrode standard à hydrogène

ET : Région extrathoracique

EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure

HAp : Hydroxyapatite

HEDP : l'acide 1-hydroxyéthane 1,1-diphosphonique

HOPO : Unités hydroxypyridones

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

i.v : Intraveineuse

MET : Microscopie électronique en transmission

MOx : Mélange d'OXyde d'uranium et d'OXyde de plutonium

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium

NPs : Nanoparticules

NRBC : Nucléaire, Radiologique, Biologique, et Chimique

NTA : l'acide nitrilotriacétique

OA : Oligopeptide dAcides

PBq : Pétabecquerel

PEG : Polyéthylène Glycol

PEI-MC : Polyéthylèneimine MéthylCarboxylate

PEI-MP : Polyéthylèneimine MéthylPhosphonate

ppb : Partie par milliard

ppm : Partie par million

RPMI : milieu de culture, Roswell Park Memorial Institute

Sv : Sievert

TBS : Tris Buffer Saline

TMC : N-Triméthyl Chitosan

TPP : Tripolyphosphate

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme d'orbitales moléculaires de l'uranyle. *24*
Figure 2 : Diagramme de spéciation du thorium en milieu aqueux non complexant ([NaCl] : 0,1 M, [Th^{4+}] : 10^{-8} M). *26*
Figure 3 : Réactions nucléaires conduisant à la formation de différents isotopes du plutonium et d'actinides mineurs.[7] *27*
Figure 4 : Diagramme de Latimer du Pu en milieu HNO_3 1 M à 25°C. *29*
Figure 5 : Spéciation du plutonium (IV) dans l'eau ([Pu] = 2,5 mM) à 25 °C. *30*
Figure 6 : Les principales voies d'entrée, de transfert et d'excrétion des radionucléides dans le corps.[13] *31*
Figure 7 : Répartition du mode d'exposition dans chacun des quatre groupes indépendants.[16] *33*
Figure 8 : Diagramme schématique montrant les zones de déposition des particules en fonction de leur taille au sein des poumons.[18] *34*
Figure 9 : Les régions anatomiques du système respiratoire selon le modèle CIPR 66.[19] *35*
Figure 10 : Distribution des particules dans les différents compartiments du système respiratoire en fonction de leur diamètre aérodynamique pour un homme adulte caucasien *36*
Figure 11 : Pourcentage de la fraction inhalée transférée dans le sang en fonction du DAMA. *38*
Figure 12 : Modèle à compartiments représentant le transport de particules en fonction du temps à partir de chaque région des voies respiratoires dans le modèle CIPR. *39*
Figure 13 : Structure du tissus osseux *43*
Figure 14 : Le modèle CIPR pour les éléments dits « affins de la surface osseuse » ou « Pu like » : Th, Np, Pu, Am et Cm. *44*
Figure 15 : Concentration dans l'air des particules alpha au sein de l'usine radiochimique et du site de production du plutonium. *53*
Figure 16 : Plutonium au sein du parenchyme pulmonaire (histoautoradiographie conventionnelle).[54] *54*
Figure 17 : Pourcentage d'incidence des fibroses pulmonaires a) chez des travailleurs exposés au rayonnement gamma externe b) et chez des travailleurs exposés au rayonnement alpha interne du à la contamination par des aérosols de particules de plutonium *55*
Figure 18 : Plutonium dans le tissus osseux (autoradiographie).[67] *57*

Figure 19: Structures chimiques de différents agents chélatants (polyaminocarboxylates et hydroxypyridones) pour la décorporation du plutonium (adaptée de Fattal & al.[78]). 60
Figure 20 : Formule topologique de différents dérivés lipophiles du DTPA dont le C_{22}TT…. 65
Figure 21 : Quelques exemples de sidérophores bactériens et de leurs fonctions chélatantes caractéristiques. 66
Figure 22 : Formule topologique du 3,4,3-LICAM (S) et du 3,4,3-LICAM (C). 67
Figure 23 : Formule topologique du a) 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et du b) 5-LIO(Me-3,2-HOPO). 69
Figure 24 : Structure a) du polymère de départ b) du PEI-MC c) de son analogue monomérique le DTPA d) du PEI-MP e) et de son analogue monomérique le DTPMP..... 71
Figure 25 : Structure du 1,3,5-OCH3-2,4,6-OCH2COOH-ptertbutylcalix [6]arène..... 72
Figure 26 : Schéma de synthèse des nanoparticules de N-triméthylchitosan réticulées au DTPMP..... 75
Figure 27 : Structures chimiques des polymères chélatants porteurs de fonctions carboxyliques ou phosphoniques et de leurs analogues moléculaires de référence..... 81
Figure 28 : Le déroulement d'un cycle de remodelage osseux 90
Figure 29 : Organisation du tissu osseux 91
Figure 30 : Pont entre les oxygènes du groupement phosphates et les cations Ca^{2+} présents au sein de la matrice osseuse. 98
Figure 31 : Thermogrammes de la HAp (blanc, en noir), HAp … PEI-MP (en bleu), HAp…PEI-MC (en vert) et HAp... DTPA (en rouge) dans une gamme de température de 100 à 700 °C montrant la perte de masse due à la dégradation thermique des chélates sorbés sur HAp..... 103
Figure 32 : Spectre EXAFS du complexe HAp-Th au seuil L_{III} du thorium. La courbe ajustée est en pointillés..... 106
Figure 33 : Courbes dose/réponse HAp…Th (5 mg, 0,7 % Th) en fonction de la concentration en chélate (1-mer) dans 1,5 mL TBS à j_8..... 109
Figure 34 : Spectre EXAFS du complexe PEI-MP…Th (en bleu clair), et du complexe PEI-MP…Th/HAp (en bleu foncé) au seuil L_{III} du thorium. Les courbes ajustées sont en pointillés. 111
Figure 35 : Cinétique de décontamination, sur 21 jours, de HAp…Th (5 mg, 0,7 % Th) en présence de chélate (6,3 mM en 1-mer) dans 1,5 mL TBS..... 114
Figure 36 : Tests de cytotoxicité sur a) les cellules SAOS-2 et b) les cellules MLO-A5 exposées à des concentrations croissantes de molécules chélatantes pendant 24 h ou 48 h. 117

Figure 37 : Trajet des actinides en cas de contamination par inhalation (figure traduite de l'ICRP66).[19] 120
Figure 38 : a) Cliché MET et grossissement des nanoparticules de type oxo-hydroxo de thorium et b) histogramme de taille (en nombre) réalisé sur la totalité des nanoparticules du cliché a. 126
Figure 39 : Corrélogrammes des nanoparticules de thorium de type oxo-hydroxo (à gauche) et oxyde (à droite) obtenues après calcination (redispersées dans l'eau distillée). 127
Figure 40 : (a) Spectre EXAFS du ThO_2 (noir), des nanoparticules de Th oxo (rouge) et oxo-hydroxo (vert) et (b) leur transformée de Fourier respective. 129
Figure 41 : Courbes dose/réponse Th NPs (20,0 ± 2,0 µg) en fonction de la concentration en chélate (1-mer) dans 1,5 mL de TBS à j_7. a) DTPA (rouge) et PEI-MC (vert) b) PEI-MP (bleu).. 132
Figure 42 : Cliché MET de nanoparticules de Th en présence de PEI-MC ([PEI-MC] : 10 mM). 134
Figure 43 : Cliché MET des cellules RAW 264.7 exposées aux NPs de Th pendant 1 h. 136
Figure 44 : Clichés MET des cellules RAW 264.7 exposées aux NPs de Th a) pendant 30 min b) Zoom sur une vésicule de phagocytose. 138
Figure 45 : Clichés MET des cellules RAW264.7 exposées aux NPs de Th a) pendant 3 h b) Zoom sur une vésicule de phagocytose. 139
Figure 46 : Zoom sur une vésicule de phagocytose de cellule RAW 264.7 exposée aux NPs de Th pendant 4 h. 139
Figure 47 : Cliché MET des cellules RAW264.7 exposées aux NPs de Th pendant plus de 5 h. 140
Figure 48 : Tests de cytotoxicité sur macrophages RAW 264.7 a) PEI-MC et DTPA b) PEI-MP et DTPMP 143
Figure 49 : Tests de cytotoxicité sur les cellules RAW 264.7 pour une concentration de 5 mM en PEI-MC, DTPA, PEI-MP et DTPMP à différents temps d'exposition 145
Figure 50 : Représentation schématique des expériences de décontamination des NPs de Th par les chélates. 148
Figure 51 : Cytotoxicité des chélates à j_5 sur les macrophages contaminés par les NPs de Th en conditions per-internalisation NPs (ajout des chélates 30 minutes après contamination sans rinçage) et en conditions post-internalisation des NPs (ajout 1 h après contamination et rinçage). 149

Figure 52 : Courbes de dosage du Th non internalisé en fonction du temps pour une concentration en chélates de 5 mM dans 1 mL de RPMI et une quantité de Th de 2,60 ± 0,04 µg. 152
Figure 53 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium extracellulaire ainsi que le pourcentage moyen de viabilité cellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en PEI-MC, DTPA, PEI-MP ou DTPMP, à 1 h et à 24 h. 156
Figure 54 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium extracellulaire ainsi que le pourcentage moyen de viabilité cellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en PEI-MP ou DTPMP, à différents temps (1 h, 1 j, 2 j, 3 j, 4 j, 5 j). 158
Figure 55 : Schéma de synthèse du PEI-MC 168
Figure 56 : Schéma de synthèse du PEI-MP..... 169
Figure 57 : Formules brutes du monomère de PEI-MC et de PEI-MP. 171
Figure 58 : Spectre d'absorption X..... 175
Figure 59 : Concentration mesurée en Th par ICP-MS en fonction de la concentration théorique..... 182
Figure 60 : Concentration en Th mesurée par ICP-MS dans différents milieux pour une même concentration initiale. 184
Figure 61 : Pourcentage de thorium dans le milieu extracellulaire en fonction du temps d'incubation des NPs de thorium avec les cellules RAW 264.7..... 186
Figure 62 : Pourcentage de thorium présent dans le milieu extracellulaire après 1 h d'incubation des nanoparticules de Th avec les cellules RAW 264.7..... 187
Figure 63 : Test de cytotoxicité des nanoparticules de thorium pour 500 µL de solution de nanoparticules de Th (Th : 2,5 ± 0,1 µg en masse)..... 190

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les éléments de la famille des actinides. 23
Tableau 2 : Etats d'oxydation et configuration électronique des premiers éléments des actinides, en gras le degré d'oxydation le plus stable obtenu en conditions aqueuses, en italique les autres degrés d'oxydation possibles (spécifiques aux conditions du milieu).[2] 24
Tableau 3 : Répartition des actinides dans le sang et dans les principaux organes de rétention après leur injection sous formes solubles (ICRP Publications 48, 67 et 69).[25–29] 41
Tableau 4 : Effet de la taille sur le pourcentage de tissu pulmonaire irradié pour un même dépôt pulmonaire (activité) après inhalation de $^{239}PuO_2$ (aérosol monodispersé). 50
Tableau 5 : Agents décorporant du plutonium (adaptée de Fattal & al.[78]). 61
Tableau 6 : Résultats de la décorporation pulmonaire du plutonium (PuO_2) par administration de Ca-DTPA sous forme de poudre chez le rat.[86] 63
Tableau 7 : Données biocinétiques et constantes d'équilibres du thorium et du plutonium ... 83
Tableau 8: Vue d'ensemble des principales classes de molécules ciblant l'os ainsi que leurs principaux avantages et inconvénients. 96
Tableau 9 : Temps de demi-vie de résidence et biodistribution (durant les 4 premières heures) dans les organes de complexes PEI-MP-^{99m}Tc de différents poids moléculaires injectés via intraveineuse (i.v) à des babouins. 99
Tableau 10 : Temps de demi-vie de résidence et biodistribution (entre 2 et 3 h post injection) dans les organes de complexes PEI-MP-^{117m}Sn de différents poids moléculaires injectés via intraveineuse (iv) à des babouins. 100
Tableau 11 : Paramètres structurels obtenus par le meilleur ajustement du spectre EXAFS de la HAp-Th en conditions pseudophysiologiques.[a] 107
Tableau 12 : Paramètres des courbes dose/réponse pour le complexe DTPA-HAp-Th et PEI-MP-HAp-Th. 109
Tableau 13 : Paramètres structurels obtenus par le meilleur ajustement des spectres EXAFS des systèmes PEI-MP…Th et PEI-MP…Th/HAp en conditions pseudophysiologiques .[a] 112
Tableau 14 : Effet de l'administration cumulée d'une dose de PEI-MP. 115
Tableau 15 : Paramètres des courbes dose/réponse pour le complexe DTPA-NPs Th et PEI-MC- NPs Th. 131

Tableau 16 : Paramètres d'ajustement des courbes de dosage du Th non internalisé pour NPs-Th-Cellules (blanc, sans chélates), PEI-MC-NPs-Th-Cellules ; DTPA-NPs-Th-Cellules ; PEI-MP-NPs-Th-Cellules ; DTPMP-NPs-Th-Cellules. *151*

Introduction

Une contamination par les actinides peut survenir suite à un incident dans l'industrie nucléaire, un acte malveillant visant une centrale nucléaire ou l'explosion d'une bombe sale. La contamination par des actinides est un sujet de préoccupation majeure car ces radioéléments présentent à la fois une toxicité chimique et radiologique (émetteurs α).

L'exposition massive des populations au plutonium, un des éléments emblématiques de la série des actinides, peut se faire par l'inhalation de petites particules dispersées par le vent et la poussière après un accident (explosion dans l'industrie nucléaire, acte de guerre, terrorisme...). Ils font d'ailleurs partie intégrante de la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique).

En outre, et même si elle demeure limitée à une faible partie de la population, les actinides sont couramment manipulés par les travailleurs de l'industrie nucléaire, en amont et en aval du cycle du combustible, ce qui les exposent à une éventuelle contamination cutanée.

L'inhalation et la contamination par blessures représentent ainsi les deux voies d'exposition majeures à ces agents radiologiques.

La rétention et le devenir de ces particules inhalées dépendent de leur taille et de leur forme physico-chimique. En règle générale, plus elles sont petites et moins solubles, plus elles sont dangereuses, car elles vont atteindre les alvéoles pulmonaires et seront principalement retenues pendant de très longues périodes (décennies) dans les macrophages alvéolaires pulmonaires. Quant à la fraction soluble, capable de passer dans la circulation, ou en cas de blessures, le Pu sera très rapidement transféré et stocké dans le foie et les os où la dose délivrée contribuera à divers cancers.

Des contre-mesures existent, notamment avec des injections i.v de diéthylène triamine penta acétate (DTPA) sous forme calcique ou zincique mais leur efficacité reste surtout limitée aux formes solubles circulantes du Pu. De plus, la courte biodisponibilité du DTPA empêche cette thérapie chélatrice d'exercer un effet réel sur les trois compartiments de séquestration biologique mentionnés ci-dessus (poumons, os, foie).

Par ailleurs, afin de limiter l'impact d'une contamination, et d'élaborer des stratégies de prévention et au besoin de décontamination, les interactions de ces radioéléments avec l'Homme doivent être mieux comprises, or malgré un nombre élevé d'études, à l'heure actuelle, des interrogations subsistent sur des points clés, notamment le devenir exact des particules insolubles piégées au sein des macrophages alvéolaires.

Pour surmonter cette limitation et fournir une approche complémentaire à la thérapie de décorporation du diéthylène triamine penta acétique acide (DTPA), nous développons des analogues polymériques du DTPA, basés sur un polyéthylèneimine (PEI) commercial, pour cibler indirectement ces sites de rétention. Cette thèse constitue, quant à elle, une première étude concernant les capacités de décontamination de ces polymères chélatants vis-à-vis du Th(IV), utilisé comme analogue du Pu(IV), et incorporé sous formes solubles et/ou colloïdales (pour l'approche pulmonaire) dans une matrice d'hydroxyapatite ou dans des macrophages afin de mimer au plus près les modèles osseux et pulmonaires ciblés par les actinides en cas de contamination réelle.

Ce sujet de thèse pluridisciplinaire s'articule autour de deux parties :

La première partie de cette thèse sera consacrée à la décorporation osseuse c'est-à-dire à l'étude de l'efficacité de nos polymères chélatants et notamment du PEI-MP (phosphonate) vis-à-vis d'une matrice osseuse contaminée. Ce dernier a été spécialement développé pour cibler la matrice osseuse. Ainsi, une matrice d'étude osseuse constituée d'Hydroxyapatite (HAp), principale composante minérale de l'os a pu être contaminée de manière uniforme avec du thorium (IV). La spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) a permis d'élucider la spéciation du thorium au sein de cette matrice et de s'assurer de sa chimisorption au sein de la HAp. Par analyse thermogravimétrique (ATG), l'affinité des polymères pour la HAp a pu être évaluée. Les courbes de charges et de cinétique liées à la décontamination de la matrice osseuse ont pu être obtenues. Enfin la cytotoxicité de nos polymères a pu être évaluée sur des cellules constitutives de l'os (ostéoblastes et ostéocytes).

La deuxième partie est quant à elle basée sur la décorporation pulmonaire de particules insolubles de thorium par des polymères chélatants. Elle s'articule en plusieurs points.

Afin de mimer les particules insolubles de PuO_2 séquestrées au sein des macrophages alvéolaires et travailler dans des conditions les plus proches d'une situation réelle, une synthèse de nanoparticules de thorium (NPs) insolubles a pu être réalisée. L'analyse par Microscopie Electronique en Transmission (MET) a permis d'analyser leur aspect (forme, taille, polydispersité). Leur spéciation a été analysée par spectroscopie EXAFS. La capacité de nos polymères à déplacer l'équilibre « solide-liquide » et donc à « solubiliser » le Th au sein de ce système a été évaluée. Cette étude a été réalisée grâce au dosage du Th dans les différentes fractions au moyen d'ICP-MS. Enfin des tests biologiques sur macrophages RAW 264.7 (monocytes de rats) ont été réalisés. Un suivi, *in cellulo*, de l'internalisation de ces nanoparticules a permis de visualiser les différentes étapes de phagocytose et l'évolution des nanoparticules à l'intérieur des macrophages afin de permettre une meilleure compréhension du processus d'internalisation (localisation interne finale) et de mettre en évidence une éventuelle excrétion. Ce suivi a été réalisé par microscopie MET couplée à un dosage du Th non internalisé par ICP-MS pour s'affranchir des biais éventuellement provoqués par les différentes étapes de lavage nécessaires à la culture cellulaire. Une dernière partie a consisté à mettre au point un test sur des macrophages contaminés par les nanoparticules de Th et traités par nos polymères chélatants. L'imagerie MET a permis de visualiser qualitativement ces expériences tandis que des mesures du Th « excrété » (déterminé par ICP-MS) ont permis d'obtenir une analyse quantitative de la capacité de nos polymères à décontaminer le Th *in cellulo*. Cette étude a, par ailleurs, été complétée par l'évaluation de la cytotoxicité de nos polymères chélatants sur les macrophages.

Ce mémoire de thèse est articulé autour de trois chapitres :

Le premier présente les deux éléments majeurs de notre étude : le thorium et le plutonium, leur distribution en cas de contamination par inhalation ou de contamination par blessure, leur toxicité (détaillée de façon épidémiologique dans la mesure du possible) ainsi que les états de l'art sur les agents de décorporation actuels. Cette dernière partie met notamment en avant l'insuffisance des moyens de décontamination à l'heure actuelle, et la nécessité d'une stratégie complémentaire à celle du DTPA.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'utilisation de nos polymères (PEI-MP et PEI-MC) sur la décontamination du Th soluble au sein d'une matrice osseuse, et de particules de thorium insolubles au sein des macrophages.

Une première étude s'attache à mesurer l'efficacité de décontamination de nos polymères sur une matrice minérale osseuse (HAp) contaminée au thorium, avec notamment une étude détaillée sur les profils thermodynamiques et cinétiques de cette décontamination. La deuxième étude est consacrée aux particules insolubles de Th (NPs de Th), notamment à leur comportement face à nos polymères chélatants. Une étude détaillée sur la phagocytose (capacité d'internalisation, phases de la phagocytose et trafic intracellulaire) par les macrophages RAW 264.7 des NPs de thorium y est notamment présentée. Enfin une première approche de tests de décontamination *in cellulo* par nos polymères chélatants, de particules insolubles de thorium, y est proposée.

Le troisième chapitre rassemble l'ensemble des méthodologies et protocoles mis en place au sein de cette thèse.

Enfin une conclusion de ce travail ainsi que des perspectives sont proposées.

Chapitre I : Etat de l’art, toxicité d’une contamination par inhalation ou blessure par des actinides et agents décorporants

A. Introduction générale sur les actinides

I Généralités sur les actinides

Les actinides représentent une famille de 14 éléments du bas du tableau périodique de Mendeleïev. Ils s'échelonnent du thorium, Z = 90, au lawrencium, Z =103, (Tableau 1) et, correspondent au remplissage des électrons situés dans les orbitales 5f (de configuration électronique générale [Rn] $5f^n6d^m7s^2$). Les isotopes dont le numéro atomique est supérieur à 83 (bismuth) étant tous radioactifs (atomes instables naturellement), tous les éléments de la famille des actinides sont des radioéléments.

Tableau 1 : Les éléments de la famille des actinides.

^{90}Th	**^{91}Pa**	**^{92}U**	**^{93}Np**	**^{94}Pu**	**^{95}Am**	**^{96}Cm**	**^{97}Bk**	**^{98}Cf**	**^{99}Es**	**^{100}Fm**	**^{101}Md**	**^{102}No**	**^{103}Lr**

Souvent comparés aux lanthanides, étant donné leur structure électronique analogue ([Xe]$4f^n5d^m6s^2$ pour les lanthanides) il est important de noter que les 1^{ers} éléments de la série des actinides possèdent des propriétés bien différentes des 1^{ers} éléments de la famille des lanthanides.[1] Il est admis que les premiers éléments de la famille des actinides (jusqu'à l'américium) possèdent des propriétés identiques à celles de l'uranium. En effet, bien que possédant comme les lanthanides des orbitales f très localisées, dues à l'écrantage réalisé respectivement par les orbitales $5s^2$ et $5p^6$ pour les lanthanides et $6s^2$et $6p^6$ pour les actinides, les électrons de la couche 5f, moins localisés que ceux des couches 4f, sont à des niveaux d'énergies proches des orbitales 7s, 7p et 6d, permettant des hybridations entre ces différentes orbitales (Figure 1).

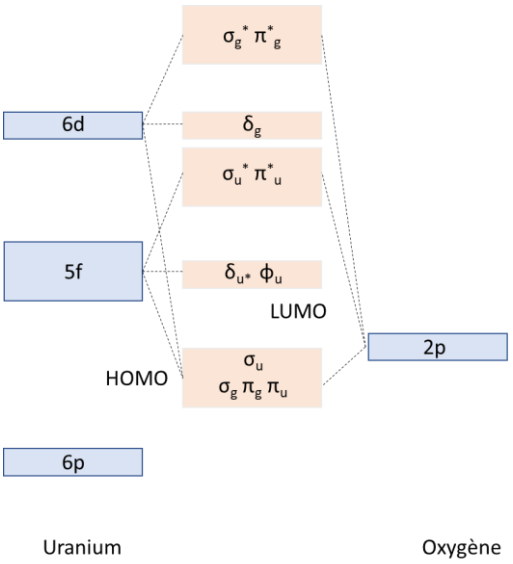


Figure 1 : Diagramme d'orbitales moléculaires de l'uranyle.

Ainsi ils participent à la formation de liaisons chimiques avec les ligands, entrainant par conséquent un grand nombre d'états d'oxydation (+II à +VII) (Tableau 2). Par ce caractère, ils sont donc plus proches des métaux de transitions.

Tableau 2 : Etats d'oxydation et configuration électronique des premiers éléments des actinides, en gras le degré d'oxydation le plus stable obtenu en solutions aqueuses, en italique les autres degrés d'oxydation possibles (spécifiques aux conditions du milieu).[2]

Eléments	Configuration électronique	Etats d'oxydation
Th	[Rn] $6d^2 7s^2$	**+IV**
Pa	[Rn] $5f^2 6d^1 7s^2$	*+IV*, **+V**
U	[Rn] $5f^3 6d^1 7s^2$	*+III*, *+IV*, *+V*, **+VI**
Np	[Rn] $5f^4 6d^1 7s^2$	*+III*, *+IV*, **+V**, *+VI*, *+VII*
Pu	[Rn] $5f^6 7s^2$	*+III*, **+IV**, *+V*, *+VI*, *+VII*,

Nous allons nous intéresser particulièrement aux premiers éléments de la série des actinides, et plus particulièrement au thorium (Z = 90) et au plutonium (Z = 94).

Le Th est rencontré principalement à un degré d'oxydation +IV (sauf conditions extrêmes). Le grand nombre d'états d'oxydation du Pu(+III à +VII) lui confère une chimie en solution particulièrement riche. Ils sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse, formant facilement des réseaux macromoléculaires insolubles appelés formes colloïdales.

II Le thorium

Le thorium est le premier élément de la série des actinides. De numéro atomique 90, il a été identifié en 1829 par le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius, qui le nomme ainsi d'après Thor, le dieu du tonnerre dans la mythologie nordique.

Dans la nature, il est retrouvé presque exclusivement sous forme d'un seul isotope : le thorium 232, dont la demi-vie est très longue $14{,}05 \pm 0{,}06 \times 10^9$ années soit environ 3 fois l'âge de la Terre.[3]

Il est le plus souvent retrouvé au sein de la monazite, un minéral constitué principalement de phosphate. On estime que les ressources actuelles en thorium sont d'environ 6,2 millions de tonnes avec une concentration dans la croute terrestre comprise entre 10 et 15 ppm.[4] Cela reste néanmoins une estimation approximative. En effet, malgré son abondance, au sein de la croute terrestre, environ 3 fois supérieure à celle de l'uranium, ce métal n'est pas d'une haute importance stratégique. Le thorium n'étant pas fissile (éléments qui sont susceptibles de subir une fission, quelque soit l'énergie des neutrons qui les percutent) en lui-même, il n'est donc pas utilisable, tel quel, dans un réacteur à neutrons thermiques. Néanmoins, il peut, par absorption d'un neutron, se transmuter en uranium-233, qui est un excellent isotope fissile *via* la séquence de réaction suivante :

$$^{232}_{90}Th(n,\gamma) \rightarrow {}^{233}_{90}Th \xrightarrow{\beta^-} {}^{233}_{91}Pa \xrightarrow{\beta^-} {}^{233}_{92}U$$

La fission de l'uranium-233 produit des neutrons, permettant de recommencer le cycle. Ce cycle de réaction est connu sous le nom de cycle du combustible nucléaire au thorium.

Même si le Th n'est, à l'heure actuelle, pas un métal d'importance stratégique, il pourrait être amené à le devenir dans les décennies qui viennent.

En effet, en raison de la rapide déplétion des ressources en uranium, le thorium-232 est envisagé comme une solution viable pour le futur du nucléaire. La Chine vient notamment d'achever la construction de son premier réacteur nucléaire à sels fondus qui fonctionne au thorium. Une start-up française, NAAREA, développe actuellement des réacteurs à sels fondus qu'elle compte alimenter avec du thorium.

Sa chimie en solution est moins complexe que pour d'autres éléments de la famille des actinides comme le plutonium en raison de sa présence uniquement au degré d'oxydation +IV. Etant le plus large cation tétravalent de la série des actinides, le $Th^{4+}_{(aq)}$ est aussi le moins hydrolysable.[3] En raison de sa taille, il est moins hydrolysable que beaucoup de cations multichargés tel que le Fe (III), il est donc possible de l'étudier pour une large gamme de concentrations à des valeurs de pH allant jusqu'à 4. Néanmoins il a tendance à subir des réactions de polynucléation et de formation de colloïdes au-delà de pH : 4. La Figure 2 présente l'hydrolyse du Th.

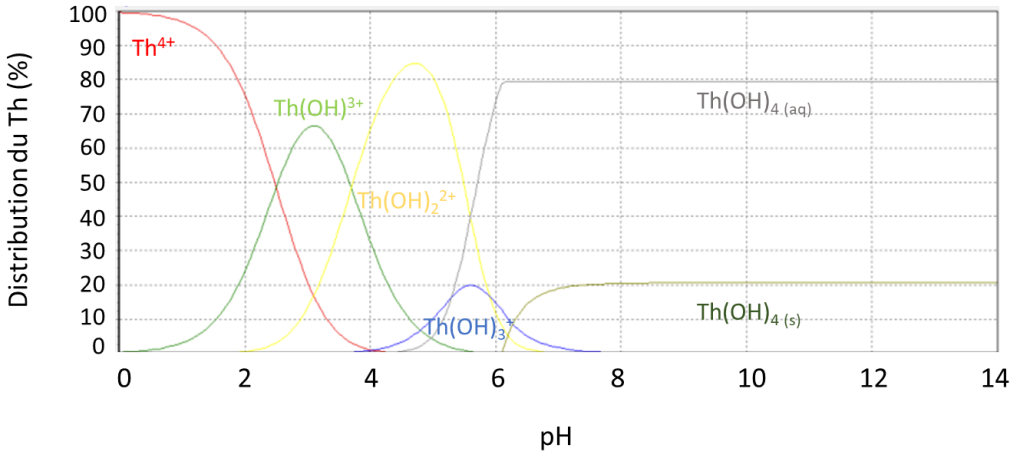


Figure 2 : Diagramme de spéciation du thorium en milieu aqueux non complexant ([NaCl] : 0,1 M, $[Th^{4+}]$: 10^{-8} M).

III Le plutonium

Elément central de la « course à la bombe », le plutonium a été découvert en 1940 par G.T. Seaborg à Berkeley.

Contrairement au thorium, c'est un métal considéré comme principalement produit par l'Homme au sein des réacteurs nucléaires. Il n'est en effet pas présent en quantité pondérable à l'état naturel et est donc considéré comme principalement d'origine anthropogénique.[5] De faibles quantités d'isotopes dit « naturels » sont retrouvées : du Pu-244 et Pu-239, issus de l'explosion des supernovas, et du Pu-239 issu de la fission spontanée de l'uranium-238. Les activités nucléaires humaines comme les tests atmosphériques des armes nucléaires, le retraitement du fuel, et les incidents nucléaires sont la principale source de Pu dans l'environnement.[6] Le plutonium est produit dans les réacteurs nucléaires par les réactions nucléaires présentées en Figure 3.

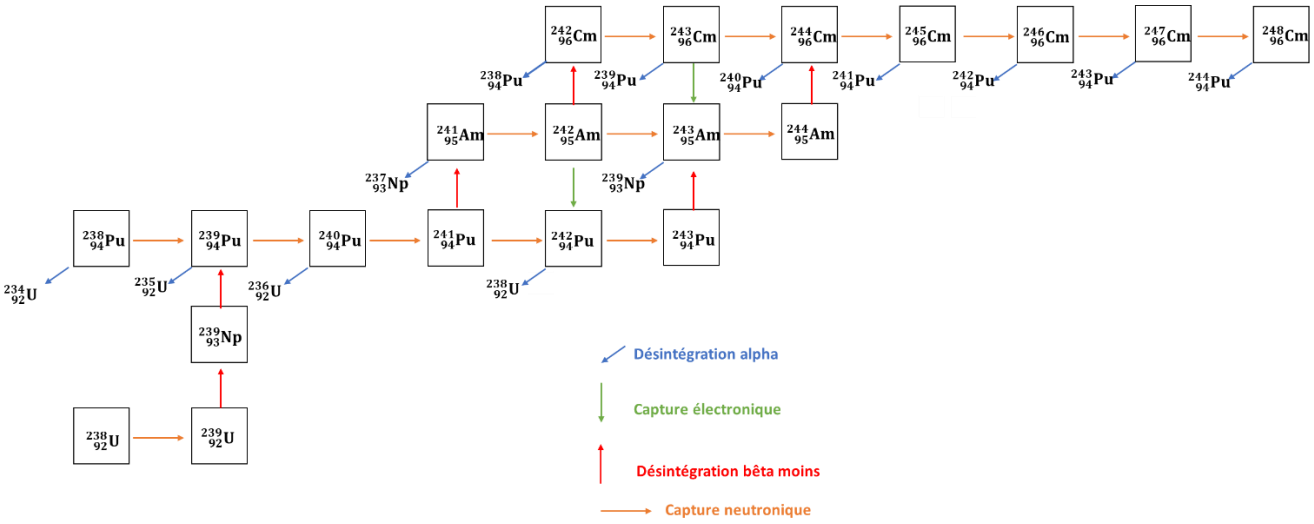


Figure 3 : Réactions nucléaires conduisant à la formation de différents isotopes du plutonium et d'actinides mineurs.[7]

La production de plutonium de qualité militaire a pour but d'obtenir du Pu avec une abondance en Pu-239 élevée, en effet ce dernier est fissile alors que les isotopes 240 et 242 du plutonium ne le sont pas.

Au sein des réacteurs nucléaires, le Pu-239 est produit suivant le schéma de désintégration suivant :

$$^{238}U + {}^{1}n \longrightarrow {}^{239}U \xrightarrow[23,5m]{\beta^-} {}^{239}Np \xrightarrow[2,35j]{\beta^-} {}^{239}Pu \xrightarrow[2,41 \times 10^4 \text{ ans}]{\alpha}$$

La fission du Pu-239 *via* l'émission d'une particule produit une grande quantité d'énergie (2,3 x 10^7 $kWh.kg^{-1}$), en faisant une arme atomique de choix. Entre 1945 et 1975, les essais nucléaires atmosphériques ont disséminé environ 13 PBq de Pu-239 et Pu-240 dont 80 % dans l'hémisphère Nord.[8] Néanmoins, depuis 1963, la plupart des pays réalisent désormais ces essais de façon « souterraine ». La principale contribution à l'augmentation du stock de plutonium dans les années à venir sera probablement celle d'origine civile. En effet, l'accroissement de l'utilisation d'énergie produite par les centrales nucléaires génère du combustible usagé contenant du plutonium (principalement Pu-239 et Pu-240). Des solutions permettent néanmoins la diminution de ce stock de Pu comme le recyclage du combustible usagé pour son utilisation sous forme de combustible « mélange d'Oxydes » (MOx). Ce combustible composé à 90 % d'uranium appauvri et d'environ 10 % en masse de plutonium[9] est produit uniquement par l'usine française Melox (du groupe Orano). A l'heure actuelle, vingt-quatre réacteurs français sont autorisés à utiliser du MOx comme combustible.[10]

Le plutonium a une chimie riche, comme la plupart des 1ers éléments de la série des actinides, on peut le retrouver sous plusieurs degrés d'oxydation : de +III à +VII. En milieu aqueux, on le retrouve sous des degrés d'oxydation allant essentiellement de +III à +VI : Pu^{3+}, Pu^{4+}, PuO_2^+ et PuO_2^{2+}.

Il possède notamment la particularité de pouvoir coexister sous ses 4 degrés d'oxydation (Figure 4) simultanément en milieu acide, due à la propension de Pu(IV) et Pu(V) à la dismutation.

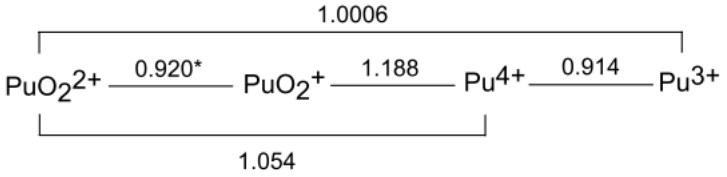


Figure 4 : Diagramme de Latimer du Pu en milieu HNO_3 1 M à 25°C. Les potentiels sont exprimés en V par rapport à l'ESH.[5]

Le plutonium est très sensible à l'hydrolyse. Les complexes hydroxo formés, peuvent donner lieu à la formation de réseaux macromoléculaires colloïdales, quasiment inertes à toute réaction chimique et particulièrement insolubles.[5] La Figure 5 présente l'hydrolyse du plutonium.

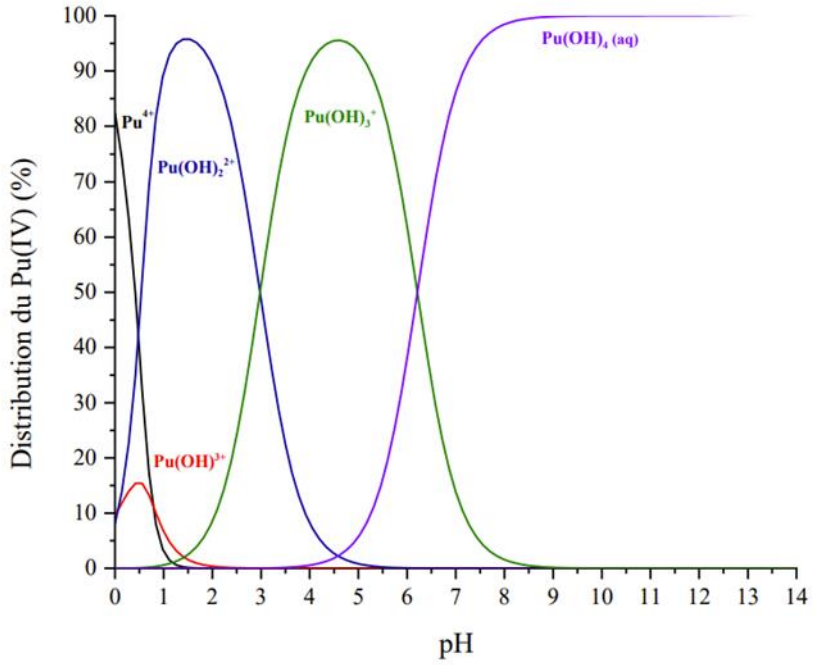


Figure 5 : Spéciation du plutonium (IV) dans l'eau ([Pu] = 2,5 mM) à 25 °C. Ce calcul a été réalisé à l'aide du logiciel JChess©. La précipitation du Pu n'a pas été prise en compte.[11]

On observe une hydrolyse rapide du plutonium, à pH 1, presque l'intégralité du Pu^{4+} est sous forme d'hydroxydes.

La connaissance de la spéciation du plutonium est primordiale. En effet, comme tous les actinides, le plutonium n'est pas métabolisé par les organismes vivants. Sa radioactivité fait de lui un élément toxique. A titre d'exemple la demi-vie de Pu-239 est suffisamment courte (24 065 ans) pour qu'un microgramme de matière subisse plus de 2000 désintégrations par seconde mais assez longue pour permettre à ce microgramme de se désintégrer à un taux approximativement constant pendant des milliers d'années.[12] Sa biodistribution va notamment dépendre de sa spéciation. La plupart des formes chimiques du plutonium sont peu solubles et vont ainsi se retrouver piéger dans des organes de rétention (poumons, foie, os, reins…).

B. Toxicité des actinides

I Les principaux modes d'exposition : généralités

L'accumulation de données sur la biodistribution des actinides au sein du corps humain a commencé avec le projet Manhattan à la fin des années 1940. Principalement focalisées sur le plutonium dans un 1er temps, des données ont ensuite été obtenues sur l'uranium, le thorium…

En fonction du mode de contamination (Figure 6), la voie biologique suivie par les actinides au sein du corps sera différente. Il existe 4 voies principales d'entrée et routes d'excrétion.

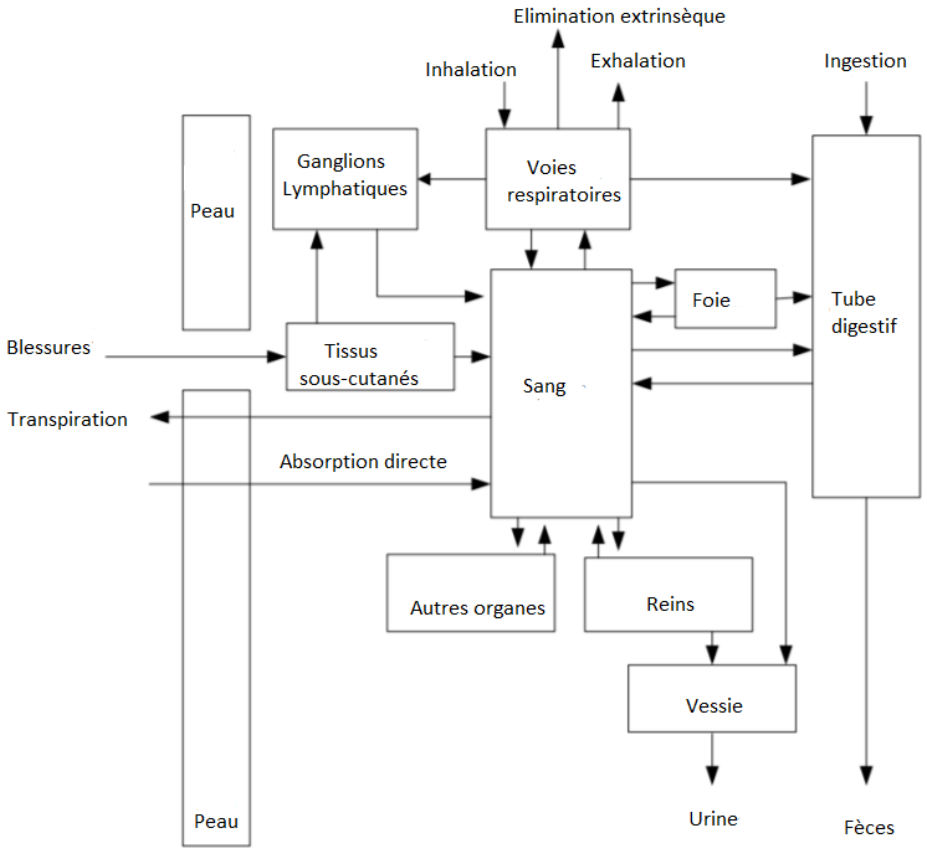


Figure 6 : Les principales voies d'entrée, de transfert et d'excrétion des radionucléides dans le corps.[13]

Chaque voie de contamination a un impact radiologique différent dépendant de la quantité absorbée, et de la biocinétique du radioélément (caractérisée par sa biodistribution au sein du corps, sa rétention au niveau des organes et son excrétion).

La contamination interne par des émetteurs alpha comme le plutonium présente un défi majeur notamment dans la mise au point et l'application de contre-mesures. En effet, contrairement à une exposition externe à des rayons gamma, une contamination interne conduit, dans un 1er temps, au dépôt d'élément radioactif au sein du site de contamination (poumons en cas d'inhalation ou site de la blessure dans les autres cas), puis par la suite, au sein de tissus « cibles » qui retiennent ces éléments, occasionnant une exposition sur le long terme. Malgré les mesures de protection actuelles, les travailleurs du nucléaire restent exposés à un risque de contamination à différents stades du combustible nucléaire : préparation et recyclage du combustible, démantèlement des réacteurs… Différents cas de contamination ont été recensés comme à Hanford (1976),[14] Mayak (1948-1992)[15] ou encore plus récemment à Marcoule.

Une partie des incidents de contamination touchant les travailleurs du nucléaire en France est consignée dans le rapport CEA-R-6097 « Exposition aux actinides : bilan des injections de Ca-DTPA dans les centres CEA-COGEMA », exposant 548 cas des centres CEA-AREVA entre 1970 et 2003.[16] Le CEA-AREVA a conclu que les deux processus majoritaires en cas de contamination par des actinides sont l'inhalation et la contamination par blessures (81 % du total des cas) (Figure 7).

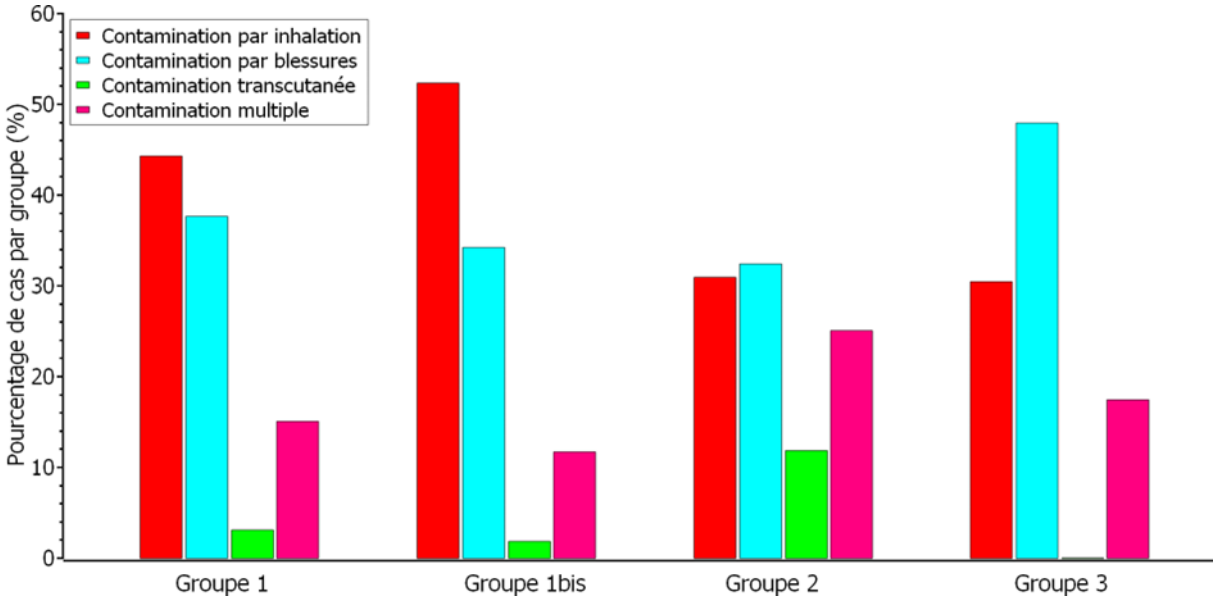


Figure 7 : Répartition du mode d'exposition dans chacun des quatre groupes indépendants.[16]

a. L'inhalation : généralités

L'inhalation est la principale voie d'entrée des radionucléides dans le corps, que ce soit sous forme de poussières, de gaz ou d'aérosols. Elle représente en effet une voie d'entrée majeure des fines particules d'actinides et donc du plutonium en cas de dissémination après une explosion. L'appareil respiratoire est alors largement impacté lors de l'inhalation de particules d'oxydes d'actinides. La distribution des particules d'actinides au sein des poumons et leur transfert au sein de la circulation générale dépendent de nombreux facteurs que nous allons aborder ci-dessous.

Le paramètre de taille le plus souvent considéré est le diamètre aérodynamique médian en activité (DAMA). Il est particulièrement important pour déterminer si les particules seront déposées en profondeur dans la région alvéolaire.[17] Nous nous intéresserons ici principalement aux particules de taille nanométriques (< 1 µm). En effet, ce sont elles qui vont se retrouver piégées, le plus profondément, dans les alvéoles pulmonaires, où elles vont délivrer leur toxicité (Figure 8). Elles deviennent dès lors peu accessibles aux traitements de décontamination classiques.

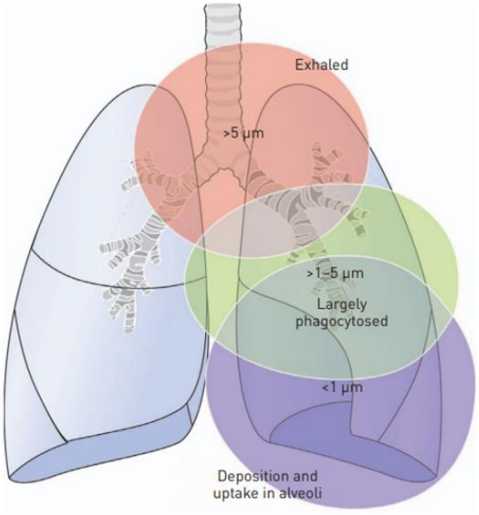


Figure 8 : Diagramme schématique montrant les zones de déposition des particules en fonction de leur taille au sein des poumons.[18]

i) Distribution des particules au sein de l'appareil respiratoire en fonction de la taille

Comme le montre la Figure 9, la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) considère quatre principales régions anatomiques au sein de l'appareil respiratoire :

- ET : Compartiment extra thoracique, comprenant le nez antérieur (ET_1) et le nez postérieur, le pharynx et le larynx (ET_2)

- BB : Région bronchique,

- bb : Région bronchiolaire

- AI : Région alvéolo-interstitielle

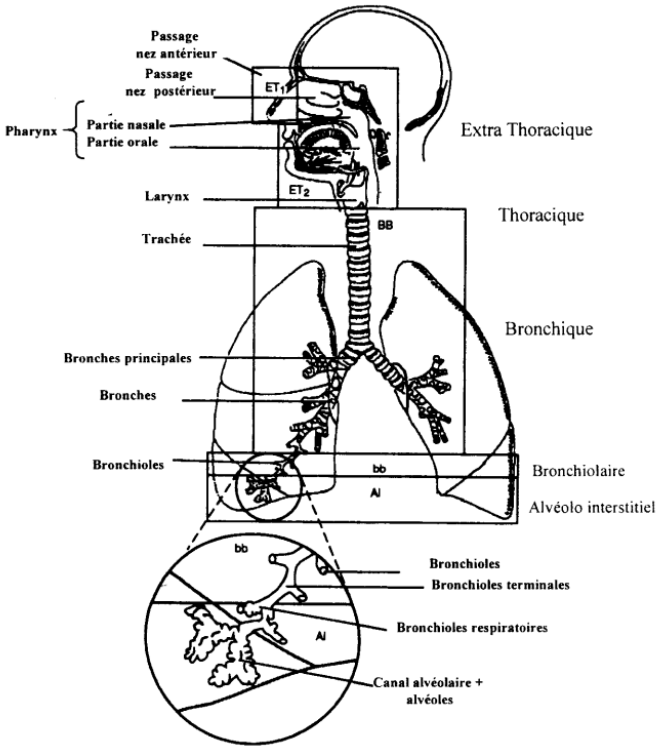


Figure 9 : Les régions anatomiques du système respiratoire selon le modèle CIPR 66.[19]

Le modèle développé par la CIPR considère les différents compartiments du tractus respiratoire comme des filtres successifs durant l'inspiration et l'expiration. Ce modèle permet d'évaluer les fractions d'aérosols déposées dans chacune des parties de l'appareil respiratoire en fonction du DAMA des particules (Figure 10).

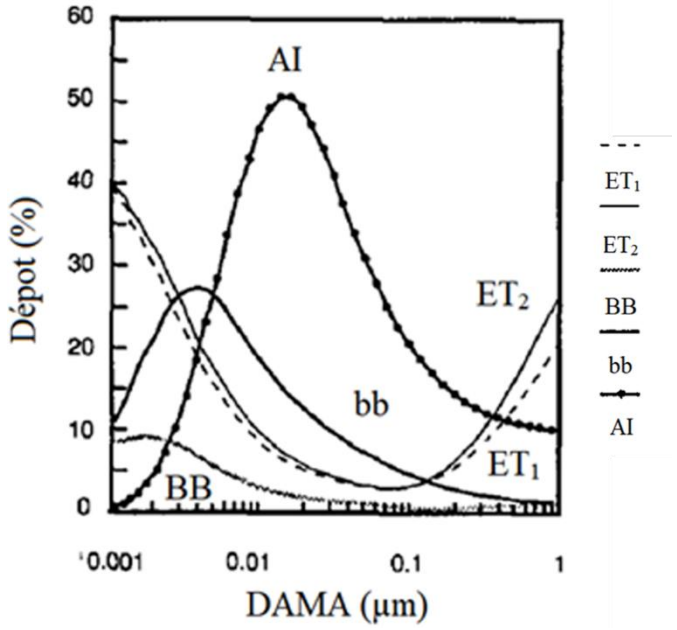


Figure 10 : Distribution des particules dans les différents compartiments du système respiratoire en fonction de leur diamètre aérodynamique pour un homme adulte caucasien (avec une respiration moyenne de 1,2 $m^3.h^{-1}$).[20]

Les agglomérats de nanoparticules avec un diamètre de l'ordre du micron se comportent comme des particules fines et montrent un faible dépôt, ils se retrouvent principalement contenus dans la partie extra thoracique (ET_1 et ET_2).

Les nanoparticules de l'ordre de la dizaine de nanomètres (5-100 nm) vont se retrouver distribuées dans la région alvéolaire interstitielle (AI). Les particules centrées vers 3 nm sont principalement dispersées au niveau des bronchioles (bb). En dessous de 3 nm, les nanoparticules sont localisées dans les bronches (BB) pour ~ 10 % tandis que le reste est excrété vers le compartiment extra-thoracique où elles pourront être expirées lors des mouvements respiratoires. Globalement, on voit quand même que c'est la zone alvéolaire interstitielle (AI) qui retient la fraction la plus importante et ce, sur une plage assez large.

Après inhalation, une fois déposés au sein du compartiment cible, les radionucléides peuvent être transférés vers le sang, pour être éventuellement excrétés, par 2 mécanismes distincts : i) la diffusion de certaines formes chimiques après dissolution des particules ii) le transport des particules vers les espaces endovasculaires.

ii) L'excrétion des particules

Le phénomène de transport de particules directement vers le compartiment sanguin n'est pas pris en compte par la CIPR car il n'a été rapporté qu'après inhalation de particules ultrafines d'oxydes d'actinides.[21,22]

La cinétique d'excrétion des particules radioactives ayant pénétrées le système respiratoire est particulièrement importante puisqu'elle définit les doses délivrées au sein des tissus pulmonaires mais aussi aux autres organes (os, foie) qui seront atteints après le transfert des radionucléides dans le sang ou au sein du tractus gastro-intestinal.

Dans le cas de la diffusion de certaines formes chimiques après dissolution, le taux de transfert des poumons vers le système sanguin est directement déterminé par la solubilité du composé. A partir de données humaines et animales et afin de comparer les coefficients de dose, la commission internationale de protection radiologique (CIPR 66) a classé les particules en 3 types, en fonction du taux de transfert des poumons vers la circulation sanguine : rapide (F), modéré (M), et lent (S). En règle générale, on associe les types F et M par défaut pour les cas non spécifiés.

Ainsi, alors que l'élimination des particules de type F ou M va plutôt avoir lieu de manière prépondérante par dissolution des particules, l'élimination des particules de type S va reposer principalement sur le transport des particules d'actinides vers les espaces endovasculaires. Les composés de type F et M vont donc principalement exposer leur toxicité vers les organes cibles (foie, os) atteints *via* le sang, tandis que les composés faiblement transférables, dits de type S (pour la plupart des oxydes et hydroxydes), resteront longtemps au sein du site de contamination primaire. La Figure 11 permet d'estimer le pourcentage, en activité, de la fraction inhalée qui est transférée dans le sang en fonction du diamètre aérodynamique médian et du type (F, M ou S).

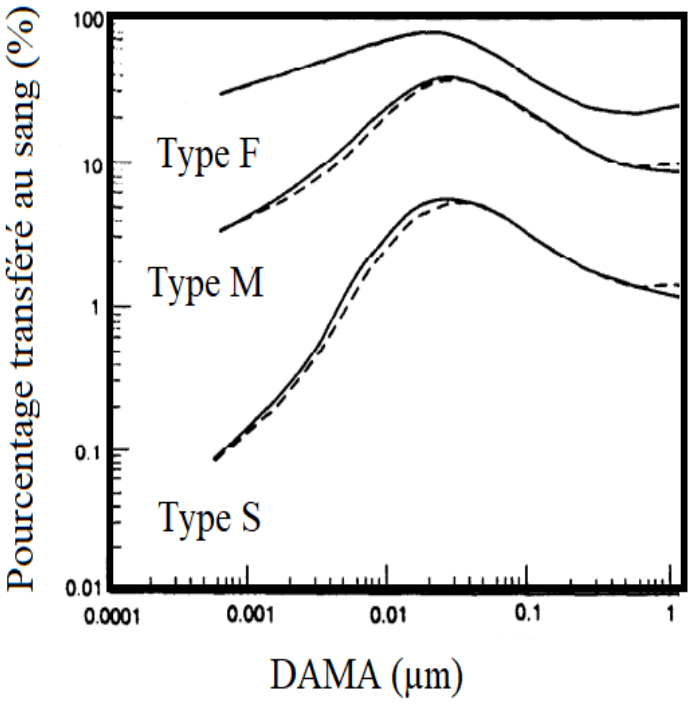


Figure 11 : Pourcentage de la fraction inhalée transférée dans le sang en fonction du DAMA. En trait plein, dans le cas d'un travailleur, en pointillés dans le cas d'un individu mâle. [19]

Les particules d'oxydes d'actinides, rencontrées notamment en cas de contamination accidentelle, sont essentiellement considérées comme des particules de type S, dû à leur formation à haute température, et seront donc éliminées préférentiellement par transport. Ce transport correspond à la migration des particules séquestrées au sein de l'appareil respiratoire vers le compartiment gastro-intestinal *via* le pharynx, vers les nodules lymphatiques *via* les canaux lymphatiques, ou d'un compartiment du tractus respiratoire vers un autre. Les principaux mécanismes impliqués dans ce transport sont liés à la migration des macrophages ayant phagocytés ces particules et/ou à la remontée du mucus sous l'action des cellules ciliées. La Figure 12 présente les différents compartiments du système respiratoire ainsi que les transferts existants entre chaque compartiment pour une particule de type S.

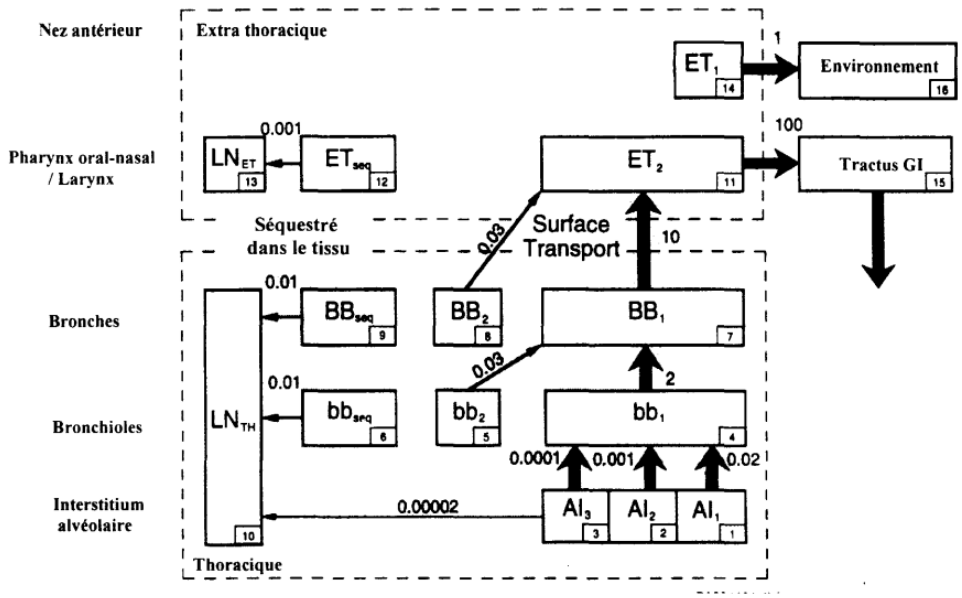


Figure 12 : Modèle à compartiments représentant le transport de particules en fonction du temps à partir de chaque région des voies respiratoires dans le modèle CIPR. Le long des flèches est indiqué la fraction (en pourcentage) du dépôt, dans chaque compartiment, qui est éliminée chaque jour. Ce modèle décrit la rétention et la clairance de particules de type insoluble (type S).[23]

Dans ce modèle, de nouveaux compartiments sont définis par rapport au modèle précèdent, afin de prendre en compte un mode de transport à la surface épithéliale (*via* le mucus qui tapisse les surfaces) et par voie lymphatique (en pénétrant les espaces interstitiels pour rejoindre la lymphe et les ganglions lymphatiques). Au sein des voies respiratoires revêtues d'un épithélium cilié (des fosses nasales aux bronchioles), les particules inhalées sont rapidement éliminées par remontée trachéobronchique même si la clairance est plus faible dans les compartiments plus petits (bronchioles). La clairance est plus lente dans les compartiments alvéolaires (Figure 12), dépourvus de cils à leur surface : au sein de ces compartiments ce sont les macrophages qui tapissent la surface qui assurent principalement la clairance des particules *via* le transport des particules. Une partie sera éliminée par transport, *via* remontée du mucus, jusqu'au sein des voies respiratoires supérieures et avalée, une petite fraction sera séquestrée au sein des macrophages alvéolaires, lesquels vont rejoindre les ganglions lymphatiques thoraciques, cette fraction aura donc une clairance lente.

Enfin il est admis que certains macrophages peuvent être retenus au sein des tissus conjonctifs pulmonaires, les particules ingérées vont alors se dissoudre lentement dans le temps.

b. Contamination par blessures

En cas de blessure, le risque de contamination est accru. En effet, la rupture de l'épiderme réduit son rôle de barrière protectrice et la brèche vasculaire va permettre une entrée rapide de l'actinide dans la circulation sanguine. Les produits très solubles vont rentrer rapidement dans la circulation générale (l'absorption est en générale complète après 24 h). Pour les produits modérément ou faiblement solubles, de type particules et/ou agrégats, l'entrée dans la circulation sanguine se fera graduellement. Des blessures peuvent aussi être occasionnées par des solutions acides d'actinides comme ce fut le cas à Rocky Flats en 1964[24] (plutonium) et à Hanford[14] (solution acide d'américium) en 1976 endommageant doublement l'épiderme.

Le modèle de la CIPR est utilisé pour décrire ce transfert en fonction de la forme physico-chimique. Ce modèle permet de faire la distinction entre quatre formes physico-chimiques (solubles, colloïdales, particulaires, fragments) afin de prédire les zones de rétention des actinides.

Après passage dans la circulation et en fonction de sa nature, le modèle d'entrée est couplé au modèle systémique afin d'obtenir une prédiction du pourcentage de rétention au sein des tissus. Le Tableau 3 présente un résumé de quelques paramètres biocinétiques pour le Th, Pu et U après entrée dans le sang *via* injection, cas le plus proche d'une contamination à travers une peau lésée.

Tableau 3 : Répartition des actinides dans le sang et dans les principaux organes de rétention après leur injection sous formes solubles (ICRP Publications 48, 67 et 69).[25–29]

Actinides	**Thorium**	**Plutonium**	**Uranium**
Forme chimique	Th^{4+}	Pu^{4+}	UO_2^{2+}
Temps de résidence dans le sang	10 % 1 jour 0,3 % 10 jours	< 1 % 1 jour	25 % 5 mins
Complexe dans le sang	100 % Transferrine	100 % Transferrine	50 % HCO_3^- 30 % Transferrine 20 % globules rouges
Organes/sites de rétention			
Squelette	**70 %**	**50 %**	10-15 %
Foie	5 %	30 %	-
Reins	3 %	-	15-25 %
Tissus mous	4 %	10 %	5 %
Urines	4-6 % 5 jours	0,4 % en 1 jour	65 % en 1 jour
Excrétion	**7-9 % en 20 jours**	**1,4 % en 14 jours**	70 % en 6 jours

Ainsi on voit que le plutonium se répartit majoritairement (80 %) dans deux sites : le squelette (50 %) et le foie (30 %). Le thorium quant à lui présente un tropisme marqué pour les os (70 %).

Bien sûr, ces modèles sont en évolution constante mais ils fournissent des outils permettant de mieux appréhender la contamination par les actinides.

Il apparait ainsi clairement que le squelette est un site de dépôt des actinides (i.v): les os possèdent des sites et ligands ayant une affinité pour les actinides.[30–32] Au regard du squelette, les actinides sont classés en deux catégories : ceux ciblant la surface osseuse comme le thorium, le plutonium ou l'américium, et ceux ciblant plutôt le volume osseux tel que l'uranium.[33]

Les actinides ciblant la surface osseuse dit « Pu-like elements » diffusent moins au sein de l'os, le volume cortical et trabéculaire ne sont donc pas divisés en deux compartiments : échangeable et non échangeable (contrairement au modèle « Ca-like » auquel appartient l'uranium) au vu de la lenteur des échanges.

Le modèle biocinétique pour le thorium et le plutonium est le modèle CIPR 67 (1993) : biocinétique générique pour l'os (Figure 14).[34] Selon ce modèle, le squelette est subdivisé en os cortical et os trabéculaire, chacun de ces compartiments étant subdivisés en : cavités, surface et volume.

L'os cortical est plus dense et entoure la moelle osseuse, il est également appelé os compact. Il est peu poreux et constitue la couche externe de l'os Il est organisé en ostéons, unité de base du compartiment osseux. Au centre de chaque ostéon, le canal de Havers regroupe les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et des nerfs qui permettent la vascularisation et l'innervation du tissu osseux. Des lamelles successives de matrices osseuses concentriques se succèdent et renferment le réseau lacuno-canaliculaire, qui entoure les ostéocytes (cellules du tissus osseux ayant perdu la faculté de produire du tissu osseux).

L'os trabéculaire, quant à lui, aussi appelé os spongieux, a une structure en nid d'abeille. Il est recouvert par l'os compact et est intercalé sous forme de travées autour de cavités remplies de moelle osseuse rouge (siège de l'hématopoïèse, processus par lequel les cellules souches prolifèrent et se différencient en cellules sanguines notamment). Les ostéoblastes (cellules dont la fonction principale est la synthèse de la matrice osseuse) recouvrent les travées et c'est aussi le lieu de positionnement des ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse) en cas de résorption (Figure 13). Il est plus vascularisé que l'os cortical.

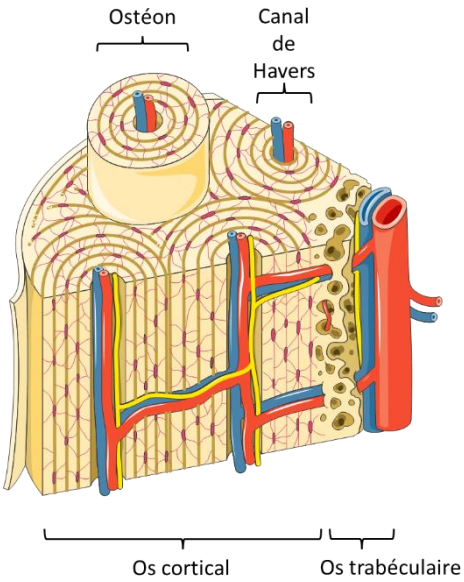


Figure 13 : Structure du tissus osseux (image issue de Servier Medical ART).

Le transfert de l'activité, de l'os cortical ou trabéculaire, aux autres compartiments dépend du « turn-over » de l'os cortical et trabéculaire. Ce « turn-over » est de 3 et 19 % par an respectivement. L'activité est transférée de la surface au volume lors de la formation osseuse ou à la moelle osseuse par résorption osseuse. Après avoir atteint le volume osseux, les actinides peuvent retourner directement dans le plasma *via* la surface osseuse ou être retenus au sein du volume cortical ou trabéculaire non échangeable, puis être transférés dans le système sanguin au cours du temps *via* le remodelage osseux. L'activité va alors être redistribuée selon le même modèle que lors de son 1er passage par le sang.

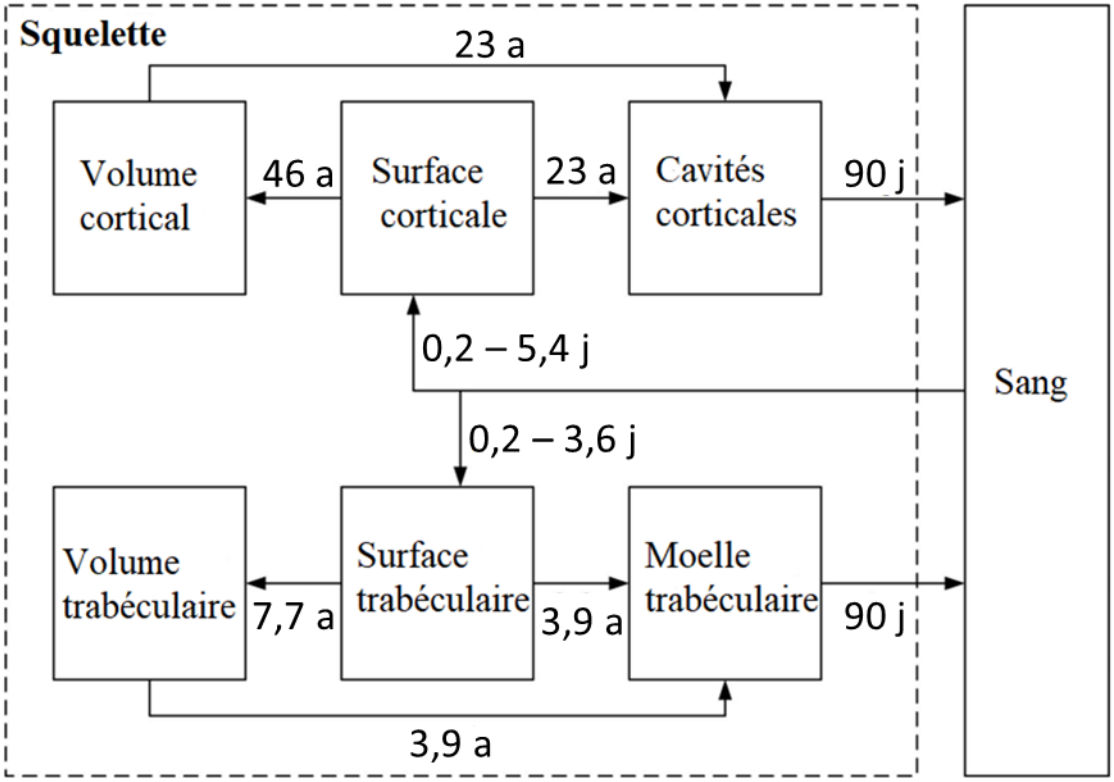


Figure 14 : Le modèle CIPR pour les éléments dits « affins de la surface osseuse » ou « Pu like » : Th, Np, Pu, Am et Cm. Sur les flèches sont indiqués les temps de « demi-vie » moyens chez l'adulte pour le transfert d'un compartiment à l'autre.[33]

Ainsi, le plutonium, initialement déposé sur la surface osseuse, est ensuite redistribué dans le temps. Il est alors soit relargué dans la circulation *via* l'activité ostéoclastique et éliminé (seulement pour une petite fraction), soit redéposé sur une nouvelle surface osseuse,[35] soit enfoui lors de processus d'apposition et de formation de l'os.[36–38] S'il est enfoui dans l'os, le plutonium peut y être retenu durant de longues périodes jusqu'à son relargage lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes associés au remodelage osseux.

II La contamination par le Th : données épidémiologiques

L'exposition de la population générale au thorium reste limitée due à sa faible présence dans l'environnement. Cependant, les travailleurs peuvent recevoir des doses non négligeables notamment ceux travaillant dans l'extraction du minerai.[39] En effet, certains minerais comme la monazite sont d'importantes sources de lanthanides notamment le lanthane et le cérium. Or la monazite contient 3 à 10 % de thorium (sous forme d'oxydes).[40] D'autre part, si les centrales à sels fondus de thorium venaient à se développer, le risque lié à son exposition croîtrait en proportion.

Peu de données sont à l'heure actuelle disponibles, les effets sur la santé et la toxicité du thorium ayant fait l'objet de très peu d'études, ou d'études anciennes comme c'est le cas sur le Thorothrast ®,[41] un produit de contraste contenant une suspension d'oxydes de Th utilisé jusque dans les années cinquante... Ici sont rassemblées quelques données .

a. Inhalation de Th

L'absorption du Th après inhalation dépend de sa nature chimique (soluble/insoluble), de sa forme physico-chimique initiale et de la taille des particules et de son isotopie.

Une étude[42] menée sur des rats, après inhalation de Th sous forme soluble (citrate ou chlorure), montre une répartition du Th principalement localisée au niveau des poumons (jusqu'à 83 % dans les voies respiratoires inférieures, c'est-à-dire en dessous de la bifurcation de la trachée). Par ailleurs, la nature chimique induit des différences. Environ deux fois plus de Th-234 est absorbé au niveau des poumons des rats exposés au citrate de thorium soluble (33 %) par rapport au chlorure de thorium soluble (19 %). Toutefois, en dépit de la différence initiale d'absorption, le thorium présente le même profil de distribution et d'excrétion, quelle que soit la forme initiale du Th (citrate ou chlorure). La forme chimique induit ici une répartition similaire au sein des organes mais une différence des degrés d'absorption, mettant en avant la difficulté de classer seulement les composés entre solubles et insolubles et la nécessité de la constante évolution du modèle CIPR.

Il apparait néanmoins que quelle que soit la forme chimique, dans le cas d'une contamination par inhalation, le Th se retrouve principalement au niveau des voies respiratoires inférieures. Cette étude souligne aussi l'importance du mode de contamination (*via* une blessure (simulée par injection) ou *via* inhalation), en effet, la comparaison d'études de Thomas *& al.*[43] et de Boecker *& al.*[44] montrait une distribution différente entre le chlorure de thorium (administré par inhalation) et le citrate de thorium (administré par injection) bien plus significative que dans cette étude, cette différence serait donc principalement liée à leur mode de contamination.

Selon la modélisation de la CIPR, les organes contribuant de façon majoritaire à la dose efficace (≥ 10 %) après inhalation de thorium sont les suivants :

- type M : moelle osseuse (21 %), surface osseuse (60 %), gonades (10 %).

- type S : poumons (40 %), moelle osseuse (14 %), surface osseuse (36 %).

Par exemple, dans le cas du dioxyde de thorium (particule de type S), l'absorption est plus faible (1 à 5 % après 1 jour) mais il a tendance à rester pour une longue période au sein des poumons (68-73 % du thorium-232 est encore présent après 1 jour et 15-30 % après 21 mois). On observera principalement un transfert de la trachée aux bronchioles (1-10 jours) puis des alvéoles pulmonaires au sang (au-delà de 100 jours).[45] Le Th peut ainsi rester plusieurs mois dans les tissus pulmonaires, dont les alvéoles. Au sein de ces alvéoles il va être phagocyté par les macrophages alvéolaires et y demeurer, conduisant à des inflammations et à des dommages tissulaires.

Pour les particules les plus grosses, le Th est principalement éliminé par des mécanismes de clairance ciliaire puis avalé et excrété dans les fèces.

Enfin, la période radioactive notablement différente entre deux isotopes du Th peut affecter sa demi-vie biologique.[46] Le Th-232 semble retenu au niveau des poumons plus longtemps que le Th-230. Ainsi la demi-vie biologique du Th-232 est de 5,3 ans quand elle est de 1,4 an pour le Th-230 pour des gens vivant près de mines d'uranium. Des différences sont observées pour des gens vivants plus loin des mines avec des demi-vies de 2,6 et 1 ans respectivement. De telles différences peuvent être dues à la durée d'exposition et/ou à la taille des particules inhalées.

b. Le Th après injection, au niveau osseux

Dans le cas d'une contamination par le Th suite à une blessure, donc *via* la circulation, le compartiment osseux constitue une cible privilégiée. Le thorium est en effet reconnu comme une substance ostéotropique et a une rétention prolongée au niveau du squelette.[29]

Les études suivantes ont été réalisées avec du Th administré sous forme injectable, afin de mimer une contamination par blessures.

L'étude précédente (inhalation) menée avec l'administration de citrate de thorium a également été réalisée par injection intraveineuse (i.v) afin d'étudier les différences de distribution du Th en fonction du mode d'exposition.[43] Sans surprise, le thorium est principalement retrouvé au niveau osseux. Cependant, l'étude montre que la distribution du Th est affectée par sa concentration initiale injectée. Une concentration initiale élevée ($6x10^{-3}$ g/kg contre $6x10^{-6}$ g/kg pour la concentration la plus faible) conduit en effet à une variation dans la biodistribution avec dans ce cas, un dépôt majoritaire du Th au sein du foie. Le constat est le même pour une étude menée par Peter-Witt *& al.*,[47] concernant l'injection intraveineuse de Th-234. Au-delà d'une concentration critique de thorium, située entre 10^{-7} et 10^{-6} M le thorium s'hydrolyse, devient colloïdal et se distribue principalement dans les organes du système réticulo-endothélial. En dessous de cette concentration, le thorium est distribué principalement au compartiment osseux

Une autre étude réalisée sur des chiens (beagles[25]) montrent que, après une injection intraveineuse de citrate de thorium, 70 % se dépose au niveau du squelette. Sur le long terme (> 100 jours), le thorium est retenu à 80 % dans les os, le reste se distribuant principalement dans les tissus mous avec des concentrations plus élevées dans le foie et les reins. Ceci confirme donc les résultats de l'étude précédente réalisée sur les rats. L'étude montre également que la diminution de la quantité de thorium est plus rapide au niveau des tissus mous qu'au niveau des tissus osseux.

Des comparaisons[48] notamment entre la distribution du thorium au sein des organes après une exposition au thorium à des concentrations environnementales entre l'humain et le beagle suggèrent que le beagle peut être un bon modèle expérimental au regard de la distribution sur le long terme au sein du corps.

Des données sur le comportement du Th au sein du corps humain ont pu être obtenues grâce à l'utilisation du Thorotrast ®, utilisé comme produit de contraste jusque dans les années 50. Il apparait qu'après une injection de Thorotrast ®, 97 % du Th est pris en charge par le système réticuloendothélial et distribué au foie (59 %), à la rate (29 %), à la moelle osseuse (9 %) et au squelette (2 %).[49] Le pourcentage élevé de thorium retrouvé au niveau du foie peut s'expliquer par la forme colloïdale du Thorotrast ® contrairement aux études effectuées avec du thorium soluble.

Une autre étude[50] basée sur l'analyse du Th au sein d'un individu ayant reçu du Thorothrast ® 36 ans avant sa mort a permis d'obtenir plus de précision quant à la localisation du Th au sein du squelette. Il apparait en effet que, 60 à 80 % de l'activité demeure localisée dans la moelle rouge (où les cellules du sang sont produites) lorsque l'os en contient. Quand l'os contient de la moelle jaune (surtout composée de graisse) seulement 40 % de l'activité totale au sein de l'os reste située au sein de cette moelle.

Les injections de Thorotrast ® ont notamment été associées à l'apparition de leucémie, de cirrhose du foie et d'anémie aplasique et ont depuis été interdites.

III La contamination par le Pu

« Plutonium has a quite extraordinary relationship with people. They made it, and it kills them »
Ian Hacking

Contrairement au thorium, le plutonium a toujours été un élément de préoccupation majeure. En effet, une contamination interne peut survenir à la suite de rejets accidentels d'une centrale nucléaire. De plus son activité spécifique est bien plus élevée que celle du thorium.

Une liste répertoriant un certain nombre de radioéléments, dont l'américium et le plutonium, pouvant être utilisés en tant qu'éléments radiologiques dispersibles a d'ailleurs été établie.

Le plutonium fait, par ailleurs, partie de la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique), un acte malveillant utilisant des radioéléments pouvant être envisagé, notamment depuis les attentats du 11 septembre 2001.

Ainsi, lors d'un sommet sur le nucléaire en 2016, Barack Obama a déclaré « There is no doubt that if these madmen ever got their hands on a nuclear bomb or nuclear material they most certainly would use it to kill as many innocent people as possible ».

L'exposition à ces agents radioactifs peut certes intervenir au cours d'un incident industriel, mais également suite à un acte de malveillance (terrorisme) et peut donc toucher une part importante de la population en dehors d'éventuels travailleurs du domaine.

a. Inhalation de Pu

La rétention de particules de plutonium, en cas de contamination par inhalation, au sein des différents compartiments pulmonaires est le résultat d'interactions physiques, chimiques et biologiques complexes. La rétention des aérosols radioactifs au sein de l'appareil respiratoire est, comme déjà vu, déterminée principalement par la taille des particules (CIPR 1994, CIPR 1979), tandis que l'excrétion, notamment le transfert du plutonium dans le système sanguin est déterminée par la forme chimique du plutonium inhalé.[19,51,52]

Les propriétés chimiques de la majorité des composés du plutonium (oxydes, colloïdes) le rendent peu soluble dans les fluides « humains » (sang, urines…). Selon la CIPR, à partir de données humaines et animales, les deux types de solubilités rencontrées pour le Pu-239 sont le type S (absorption sanguine lente) plutôt associé aux oxydes, et le type M (absorption sanguine moyenne), pour les cas non spécifiés par défaut. Les particules d'oxydes de Pu (type S) seront donc éliminées très lentement avec une demi-vie biologique d'environ 500-1000 jours, principalement par transport.

Selon la modélisation de la CIPR, les organes contribuant principalement à la dose efficace en cas de contamination par inhalation (contribution ≥ 10 %) sont les suivants :

-Type M : foie (33 %), moelle osseuse (18 %), surface osseuse (31 %).

-Type S : poumons (67 %), foie (12 %), surface osseuse (11 %).

La fraction de Pu déposée dans les poumons, dépend fortement de la forme chimique inhalée.

Ainsi sur le long terme, des années après la 1ère inhalation, si le Pu a été inhalé sous sa forme nitrate (soluble), on en retrouve 1-3 % retenu dans les poumons alors que pour du dioxyde de plutonium (insoluble), le taux monte à 20-40 %.[53] Ces données concordent avec la modélisation CIPR.

Au sein des poumons, le plutonium peut être retenu au sein des macrophages alvéolaires, ainsi que dans des tissus interstitiels et des tissus cicatriciels[54–56] et peut parfois conduire à l'apparition, de pneumonies et/ou de fibroses pulmonaires (lésion des poumons caractérisée par la présence d'un excès de tissu conjonctif fibreux). Le développement de fibroses pulmonaires a été observé chez de nombreuses espèces (rat, souris, chien)[57–59] tout comme chez les humains.[54,60,61]

Comme le montre le Tableau 4, la taille des particules d'oxyde de plutonium inhalées, influence également la surface de poumon irradiée puisque le parcours dans la matière vivante des rayonnements alpha émis par le plutonium est d'environ 40 µm. Pour une activité de 600 Bq d'oxyde de plutonium-239, la fraction du poumon irradiée varie de 0,03 % à 30 % si la taille des particules varie de 1 µm à 0,1 µm.[62] L'inhalation de nanoparticules de thorium est donc particulièrement délétère.

Tableau 4 : Effet de la taille sur le pourcentage de tissu pulmonaire irradié pour un même dépôt pulmonaire (activité) après inhalation de $^{239}PuO_2$ (aérosol monodispersé).

Diamètre des particules (µm)	Nombre de particules	Activité par particule (mBq)	Cellules irradiées	Fraction du poumon irradiée (%)
0,1	$5,4 \times 10^7$	0,01	3×10^7	30
0,3	$2,0 \times 10^6$	0,4	$1,3 \times 10^6$	1
0,7	$1,8 \times 10^5$	3	$1,2 \times 10^5$	0,1
1,0	$5,4 \times 10^4$	11	$3,6 \times 10^4$	0,03

b. Contamination de l'os par le plutonium

Dans les centrales modernes qui utilisent notamment le MOx, les contaminations à travers de la peau saine sont faibles. En effet les travailleurs sont protégés et décontaminés après chaque journée de travail. Une contamination peut néanmoins avoir lieu à travers une blessure. Dans ce cas, la fraction absorbée du Pu (et son transport) dépend notamment de la taille de la blessure (lacération, incision) et de la forme chimique du plutonium. Les composés avec une faible solubilité, comme les oxydes de plutonium, peuvent rester « capturés », au niveau de la blessure, dans la cicatrice et ne jamais atteindre le système sanguin. Tandis que le Pu-239 sous forme nitrate (ou citrate), plus soluble, est facilement absorbé et va être transféré rapidement dans le sang et déposé au niveau des organes (dans les minutes ou les heures suivant la contamination).

Stover *& al.*[63] dans une étude comparable à celle effectuée avec le Th-228, ont étudié la distribution de Pu(IV) après injection chez des beagles. Bien que la majorité du plutonium soit retrouvée au niveau du squelette (jusqu'à 66 %, 44 jours après l'injection), une quantité non négligeable est aussi retrouvée au sein des tissus mous, notamment le foie (22 %, 44 jours après l'injection). Ces résultats sont très similaires à ceux des études précédentes.[64]

Ces deux études[25,63] permettent notamment de comparer la distribution du Th et du Pu. En effet, ils ont, tous les deux, été injectés au degré d'oxydation +IV, en tampon citrate, à des concentrations similaires, au même pH et à des doses équivalentes en milliers de becquerel (même si le nombre d'atomes de Pu et de Th diffèrent). Après 22 jours, on observe des taux d'excrétion du même ordre de grandeur (environ 10 %) et des taux de rétention similaires (de l'ordre de 80 % après une année, principalement au sein du squelette). Il est cependant intéressant de remarquer que les modes d'excrétion différent : l) l'excrétion fécale est majoritaire dans le cas du Pu (contrairement au Th où on observe principalement une excrétion urinaire) ; 2) le rapport excrétion fécale/urinaire diminue au cours du temps pour le Pu alors qu'il augmente pour le Th ; 3) la clairance rénale du Th est plus de 100 fois plus élevée que celle du Pu.

Alors que la majeure partie du Pu qui n'est pas dans le squelette est déposée au niveau du foie, on observe un dépôt plus diffus pour le Th (foie, reins…). Là où le Pu est excrété à un taux similaire pour le foie et les os, le Th est excrété plus rapidement des tissus mous que des os.

Ainsi même si le thorium demeure un analogue du plutonium, et si la répartition reste similaire entre le thorium et le plutonium, les différences mentionnées précédemment soulignent le fait de considérer cette approche avec précaution.

Des études plus récentes notamment celle de Griffiths & *al.*[65] ont permis d'étudier la distribution du plutonium en cas de blessures. Une incision est réalisée sur la patte arrière, et l'animal (ici le rat) est contaminé par une solution de MOx (contenant une fraction de Pu insoluble) ou de nitrate de plutonium (Pu soluble). On observe que les MOx vont principalement rester au niveau du site de la blessure (jusqu'à 98 % après 7 jours), le reste, faible, se distribuant au squelette et au foie. Le nitrate de plutonium, va être plus facilement transféré au compartiment sanguin puis redistribué, et retrouvé principalement au niveau du squelette et du foie.

c. Etude d'un cas concret de contamination au Pu : le cas des travailleurs de Mayak

Peu de données épidémiologiques sont disponibles pour évaluer les effets d'une contamination au plutonium sur des sujets humains. La cohorte des ouvriers Mayak est la seule, à l'heure actuelle, à fournir des données statistiques significatives sur le risque de mortalité et l'incidence des cancers pulmonaires et hépatiques à la suite d'une exposition au Pu-239.

Dans le contexte de la guerre froide, lors de la course à l'armement nucléaire, le complexe de Mayak a été construit à la hâte entre 1945 et 1948 afin de produire et enrichir en Pu de qualité militaire pour la production de têtes de missiles.[66] Les faibles niveaux de protection, de mécanisation et d'automatisation des procédés dans les premières années de l'ouverture du complexe ont conduit à de hauts niveaux d'émissions d'aérosols de Pu au sein des zones de travail des ouvriers (Figure 15).

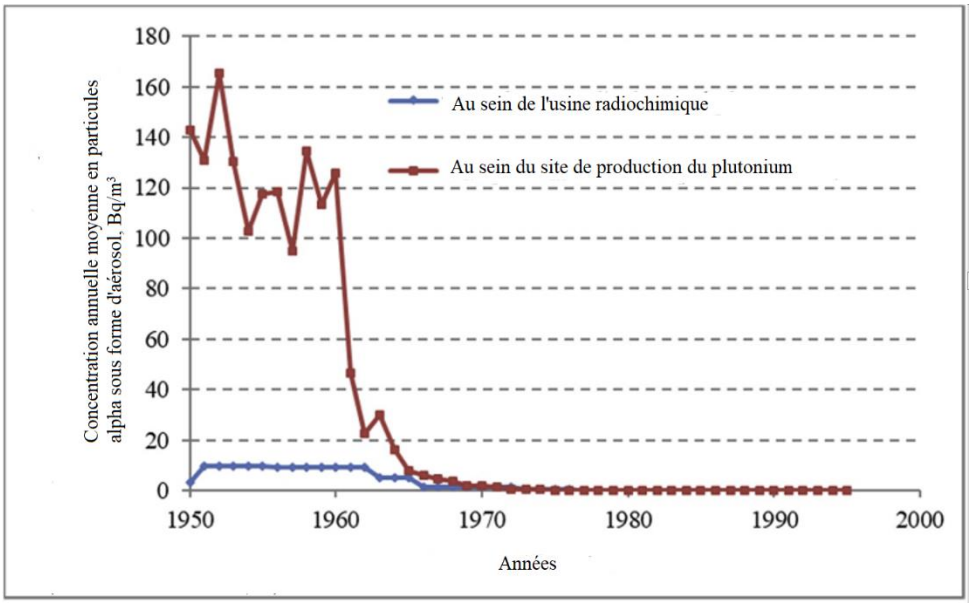


Figure 15 : Concentration dans l'air des particules alpha au sein de l'usine radiochimique et du site de production du plutonium (figure traduite de Romanov & al.[67]).

De nombreux ouvriers ont été contaminés par du Pu principalement *via* l'inhalation (de particules inférieures à 10 µm), qui se sont ensuite accumulées dans les principaux organes de dépôt du Pu (poumons, foie, os).[68–70]

Au sein de la cohorte étudiée, des travailleurs ont développé des fibroses pulmonaires induites par le Pu, entrainant la mort d'une partie des travailleurs (Figure 16).

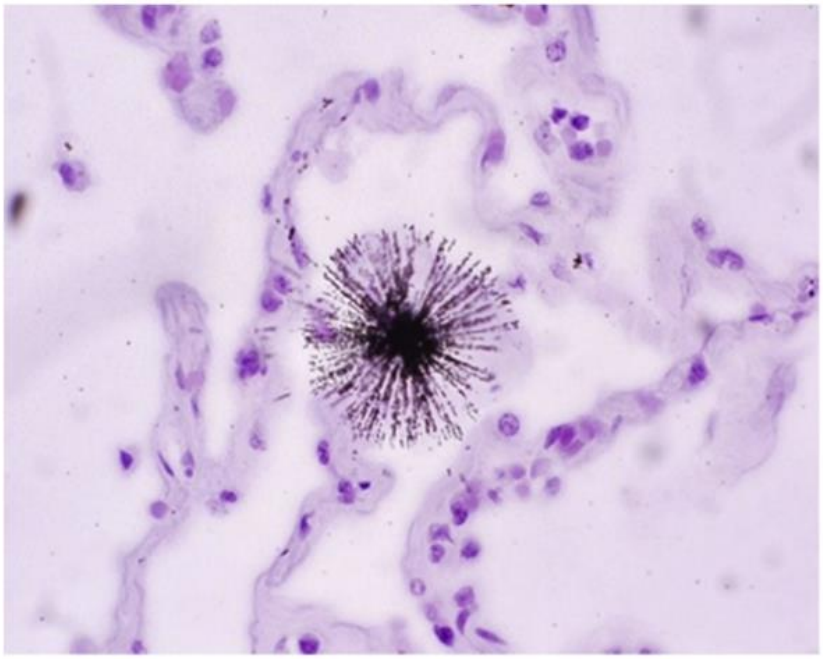
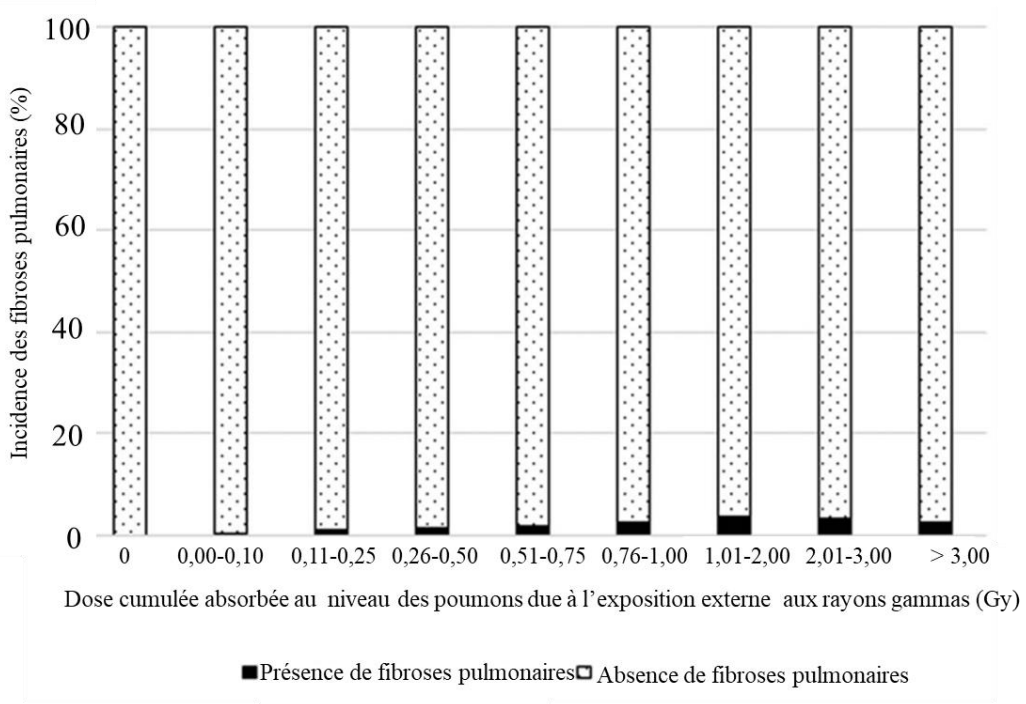


Figure 16 : Plutonium au sein du parenchyme pulmonaire (histoautoradiographie conventionnelle).[54]

L'étude a montré que l'incidence des fibroses pulmonaires augmentait significativement avec la dose de radiations alpha internes due à l'incorporation du Pu-239, et ce, sans lien aucun avec les doses externes reçues de rayonnement gamma (Figure 17).[15]

a)



b)

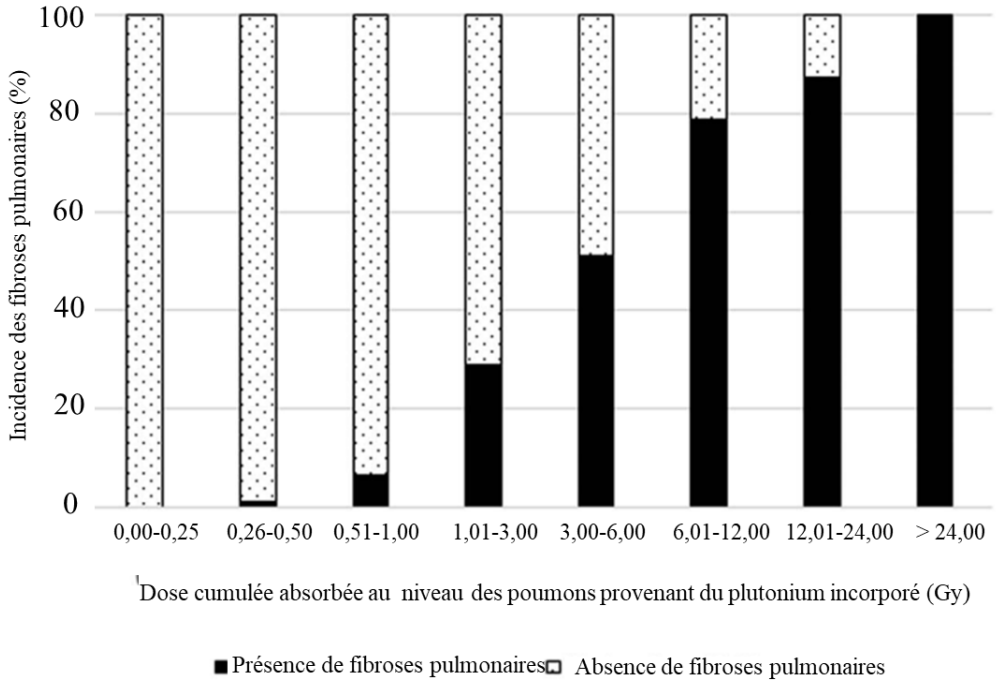


Figure 17 : Pourcentage d'incidence des fibroses pulmonaires a) chez des travailleurs exposés au rayonnement gamma externe b) et chez des travailleurs exposés au rayonnement alpha interne du à la contamination par des aérosols de particules de plutonium (figure traduite de Azizova & al.[15]).

Ces résultats corroborent ceux obtenus lors d'études sur des spécimens de rats[70] et de chiens[71] irradiés. Un autre étude menée sur une cohorte de 326 travailleurs exposés au plutonium (et 194 non exposés au Pu) au sein du site de Rocky Flat obtient d'ailleurs les mêmes conclusions.[60] En comparant la sévérité des anomalies interstitielles observées lors de radiographies pulmonaires, les auteurs ont conclu qu'une exposition cumulée de 10 Sv ou plus augmentait par 5,3 le risque de développer des anomalies de type fibrose pulmonaire par rapport à des individus non exposés (en prenant en compte d'autres facteurs tel que l'âge, le statut fumeur ou non). La fibrose pulmonaire induite par le Pu étant considérée comme un effet déterministe (réaction des tissus après une exposition aux rayonnements alpha ionisant) ayant une dose seuil et augmentant en sévérité avec la dose de radiation.[72,73]

D'autres études sont en cours,[67] en effet, un des principaux avantages de cette cohorte est la mise à disposition de tissus pulmonaires prélevés « post mortem » qui permettront dans un second temps de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition d'un cancer chez les travailleurs exposés à des radiations alpha internes.

Le deuxième principal réservoir de dépôt du Pu étudié dans cette étude est le compartiment osseux.

En effet, la radiométrie post-mortem montre que 90 % de l'activité du Pu, hors zone pulmonaire, est située au niveau du foie (42%) et du squelette (50 %) (Figure 18), 14 ans après la dernière exposition.[74]

Figure 18 : Plutonium dans le tissus osseux (autoradiographie).[67]

En se basant sur une régression linéaire, les auteurs ont estimé que, lors de la contamination initiale, la répartition était plus favorable au foie (50 %) qu'au squelette (38 %). Cependant, la fraction de Pu retrouvée dans le squelette augmente avec le temps (tandis que celle située au sein du foie décroit). De plus, une corrélation entre le rapport de répartition foie/squelette du Pu avec la sévérité des pathologies du foie a été observée. En effet, en cas de pathologies du foie (cirrhose…), les résultats ont montré que ce rapport diminue car la fraction de Pu séquestrée au niveau du foie va migrer vers le squelette.[74–77] Par exemple, vingt-quatre ans après leur dernier contact avec du Pu, les travailleurs ayant un foie « sain » ont environ 42 % de Pu dans le foie et 50 % au niveau du squelette alors que lorsque les travailleurs présentent une pathologie du foie on retrouve jusqu'à 75 % du plutonium au niveau du squelette (et seulement 15 % au niveau du foie).[74] Ainsi, si la personne développe une maladie causant une altération du foie de type cancer, métastase, cirrhose, le plutonium migre hors du foie et on retrouve une grosse partie au sein du squelette.[75,76]

Cette redistribution n'est pas homogène : elle est plus favorable à l'os trabéculaire qui est plus vascularisé que l'os cortical.

Ces données sont amenées à être complétées durant les prochaines années et permettront certainement de fournir des données complémentaires aux modèles CIPR afin notamment de mieux évaluer la dose délivrée aux différents organes.

IV Conclusion sur la toxicité du Th et du Pu

Cette revue bibliographique a permis, en se focalisant sur la biodistribution du Th(IV) et du Pu(IV), d'explorer leur toxicité. Les deux voies d'exposition majeures sont la contamination par inhalation et celle par blessure. En fonction de leur voie d'exposition (inhalation et/ou blessure), les actinides suivront une voie particulière qui affectera spécifiquement certains tissus.

Le poumon est le principal organe de rétention du Pu en cas de contamination par inhalation. Son transfert ultérieur du poumon à la circulation dépendra de la solubilité des composés inhalés. Dans le cas de particules insolubles, les macrophages alvéolaires pulmonaires constituent un compartiment de séquestration au sein duquel le Pu ou le Th peuvent irradier pendant de longues années, causant des dommages aux tissus environnants. En cas de transfert à la circulation sanguine, principalement pour la fraction soluble, ou en cas de contamination par blessure, le Pu sera très rapidement transféré et stocké dans le foie et les os où la dose délivrée contribuera à favoriser l'apparition de divers cancers.

C. Agents chélatants pour la décontamination des actinides

I Généralités

Différents agents chélatants ont été développés pour la décorporation du plutonium. On peut les classer selon leur fonction principale, (i) les polyaminocarboxylates tel que l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA), la molécule de référence dans le traitement d'une contamination au plutonium (ii) les analogues de sidérophores possédant des fonctions chélatantes comme les catécholates (CAM), les groupements hydroxamates et hydroxypyridonates (HOPO). Leurs structures chimiques ainsi que certaines de leurs propriétés importantes sont rassemblées dans le Tableau 5 ainsi que la Figure 19.

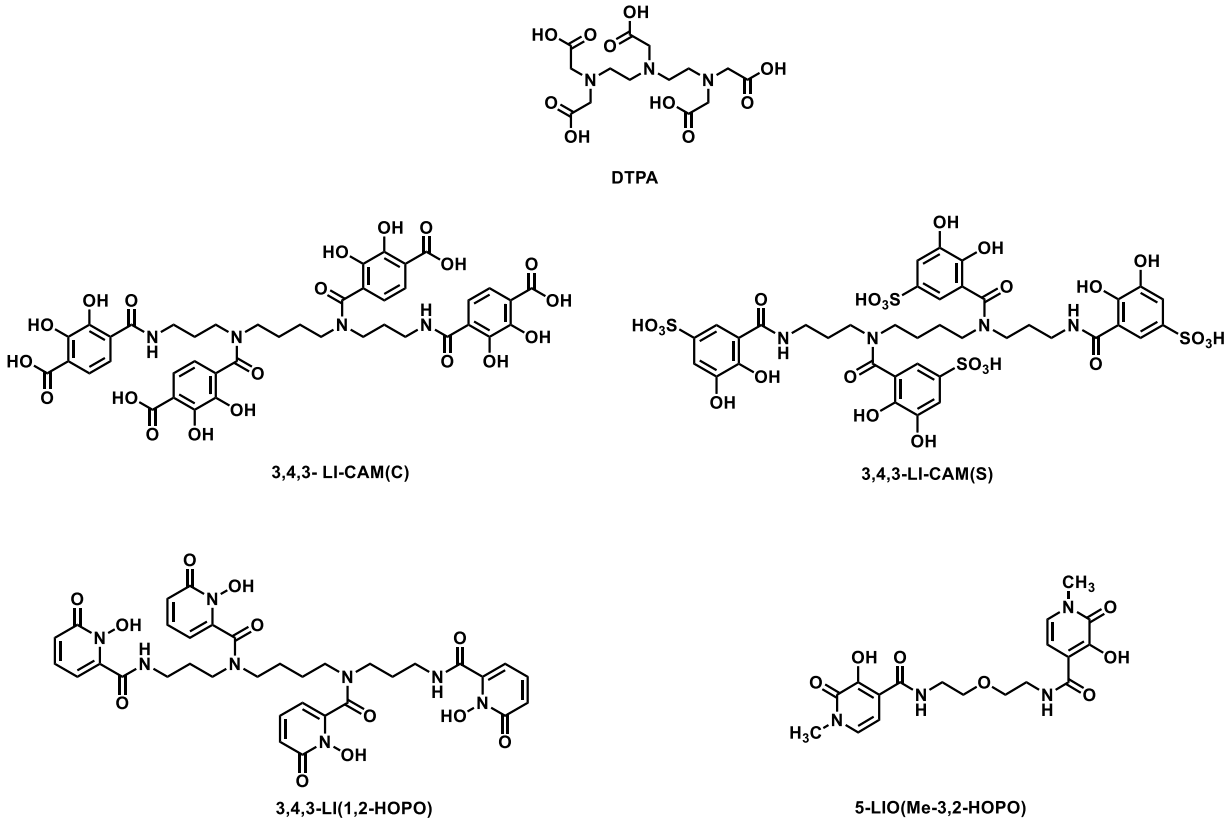


Figure 19: Structures chimiques de différents agents chélatants (polyaminocarboxylates et hydroxypyridones) pour la décorporation du plutonium (adaptée de Fattal & al.[78]).

Tableau 5 : Agents décorporant du plutonium (adapté de Fattal & al.[78]).

Famille du ligand	Agents chélatants	Eléments	Dose administrée	Toxicité et effets secondaires	Stade du développement clinique
Acides polyaminés	**DTPA** **Ca, Zn, Na**	Pu(IV)	1 g par i.v ou inhalation durant 6 j chez l'homme 30 µmol.kg^{-1} et 3,2 µmol.kg^{-1} sous forme liposomale chez le rat	Néphrotoxicité, à hautes doses (>>30 µmol/kg).[79, 80] Pas de toxicité observée aux doses administrées à l'Homme.[81]	Clinique, par administration par voie pulmonaire et parentérale
Sidérophores	**3,4,3- LI-CAM (S)** **3,4,3-LI-CAM(C)**	Pu(IV)	30 µmol.kg^{-1} chez le chien.	Néphrotoxicité	Préclinique
	3,4,3-LI(1,2-HOPO)	Pu(IV), U(VI), peut être utilisé pour les autres actinides	30 µmol.kg^{-1} voie orale ou i.v chez la souris	Toxicité aigüe faible chez la souris et bien toléré à haute dose chez le rat (100-150 µmol.kg^{-1} par jour durant 28 jours).	Phase 1 essai clinique
	5- LIO(Me-3,2-HOPO)	Pu(IV), U(VI), peut être utilisé pour les autres actinides	30 µmol.kg^{-1} voie orale ou i.v chez la souris	Toxicité aigüe faible chez la souris et bien toléré à haute dose chez le rat (100-150 µmol.kg^{-1} par jour durant 28 jours)	Préclinique

II Focus sur le DTPA

a. Utilisation classique

Depuis son développement par la commission de l'énergie atomique des Etats-Unis et son utilisation dans les années 60, le DTPA représente l'agent de thérapie « classique » utilisé en cas de contamination par le plutonium.[82]

Bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché en France (AMM du 12 février 2008),[83] il est administré sous forme de sel calcique, Ca-DTPA (plus précisément $CaNa_3$-DTPA), afin de limiter sa toxicité. On le retrouve aussi parfois administré sous forme de sel zincique, Zn-DTPA. Il est ainsi administré en première intention sous forme de sels calciques,[84] puisqu'il est plus efficace que sa forme zincique , durant les 24 premières heures après une contamination. Par la suite, de façon chronique, il est recommandé d'administrer le DTPA sous forme zincique (même si ce dernier n'a pas d'AMM en France). En effet, cette forme limite la toxicité du DTPA due à la déplétion de métaux endogènes présents à l'état de traces dans l'organisme, l'affinité du DTPA pour le zinc étant plus forte que pour le calcium. L'inhalation de DTPA sous forme nébulisée est autorisée en cas de contamination par inhalation, et l'irrigation par une solution contenant du DTPA est recommandée pour la décontamination de la peau ou en cas de blessures.

Néanmoins, sa très faible demi-vie (90-99 % excrété dans les 24 heures après administration par i.v)[85] et sa faible capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules[85] font de lui un décorporant du plutonium peu efficace en cas de contamination par inhalation. La réussite d'un traitement par le DTPA dépend notamment de la forme physico-chimique du plutonium à décorporer, de la voie d'administration du DTPA, de la durée du traitement, des délais d'administration après une exposition … Ainsi pour espérer observer une efficacité il faut l'administrer rapidement (dans les heures suivant la contamination).

b. Formes particulières du DTPA

Afin de faciliter la décorporation pulmonaire, des complexes Ca-DTPA ont été administrés directement dans le système respiratoire.[86]

Cette méthode d'administration permet un temps de résidence du DTPA plus long au sein des alvéoles pulmonaires et une concentration plus élevée de l'agent décorporant au sein du système respiratoire. Bien qu'efficace sur les formes solubles du Pu (citrate par exemple), cette méthode d'administration s'est révélée inefficace sur les formes insolubles du plutonium séquestrées au sein du site primaire de contamination. (Tableau 6).

Tableau 6 : Résultats de la décorporation pulmonaire du plutonium (PuO_2) par administration de Ca-DTPA sous forme de poudre chez le rat.[86]

Activité alpha totale (%)				
Organes	Poumons	Squelette	Foie	Sang
Témoins	98,3 ± 9,4	2,1 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Ca-DTPA par inhalation	78,5 ± 6,0	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,01

En effet, le Ca-DTPA n'induit pas la phagocytose par les macrophages,[85] limitant ainsi la décorporation du Pu à sa fraction soluble.

D'autres études sur le Ca-DTPA administré par inhalation[87,88] ont montré une augmentation d'efficacité du DTPA administré par inhalation, néanmoins une de ses études porte sur l'inhalation de Pu sous forme de citrates (soluble) et l'autre étude, même si elle concerne du plutonium sous forme insoluble montre une efficacité limitée à la partie transférable du plutonium , avec une inefficacité à décorporer le plutonium séquestré au sein des macrophages.

L'administration de microparticules comme vecteurs de principes actifs a été envisagée dans le cadre de la décorporation pulmonaire du plutonium.[89] Ces particules de tailles micrométriques ont été développées dans le but de cibler les compartiments primaires de rétention du plutonium. Des tailles d'environ 4,5 µm ont été obtenues et il avait été estimé qu'elles devaient ainsi se retrouver à 56 % dans les poumons, avec environ 27 % au niveau des alvéoles pulmonaires. Ces microparticules ont montré une aérosolisation efficace. Néanmoins cette formulation ne s'est montrée efficace que sur le Pu soluble.

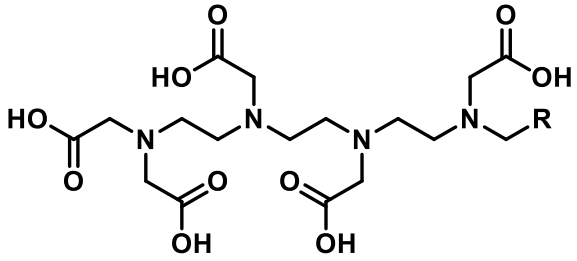
En effet, si on observe bien une augmentation de l'excrétion urinaire du plutonium, liée à l'action du DTPA qui peut chélater le Pu soluble dans le sang avant même qu'il ne se dépose au niveau du squelette ou du foie, l'efficacité au niveau des poumons sur les formes « non circulantes » du Pu reste limitée. Dans ce cas, l'administration « locale » du DTPA n'a pas permis d'augmenter la dissolution des particules de PuO_2 séquestrées au sein des macrophages.

Une autre façon d'améliorer l'efficacité du DTPA est de l'encapsuler à l'intérieur de liposomes (vésicules formées de lipides).[90] Cette formulation du DTPA permet une meilleure pénétration cellulaire du DTPA comparativement au DTPA libre, ainsi qu'un temps de résidence accru du DTPA au sein des tissus, optimisant ainsi la capacité chélatante du DTPA. Des liposomes de DTPA de taille comprise entre 1-10 μm ont permis après injection i.v, d'améliorer l'efficacité par rapport au DTPA « libre » au niveau du foie.[90] Sous cette forme, une fraction du Pu (administré par injection, sous forme polymérique), séquestrée au sein du foie, a pu être éliminée. La distribution subcellulaire du Pu est presque identique à la distribution des phosphatases acides,[91] des glycoprotéines présentes dans les membranes dans les lysosomes, il est suggéré que le Pu est situé au sein des lysosomes et que c'est la fraction intracellulaire du Pu au niveau du foie qui a pu être chélatée et éliminée. Un petit effet est aussi observé au niveau de l'os (inférieur à 5 %). Néanmoins aucun effet n'a été observé sur le plutonium séquestré au niveau des poumons et notamment des macrophages alvéolaires qui constituent un véritable sanctuaire pour le Pu sous ses formes insolubles plus particulièrement.

Afin de cibler de façon passive les compartiments de rétention du Pu, la taille des liposomes a été modifiée. En effet, la biodistribution des liposomes est largement dépendante de leur composition mais aussi de leur taille. Les études de Phan *& al.*[92–94] ont montré que des liposomes de 100 nm modifient grandement la pharmacocinétique du DTPA : on le retrouve ici au niveau du foie principalement, puis des os et de la rate. Sa demi-vie est par ailleurs plus élevée (3 jours au niveau du foie). En effet, leur temps de circulation est prolongé, ce qui permet leur accumulation au sein des organes cibles. Ces liposomes s'avèrent efficace pour augmenter l'élimination du Pu au niveau du foie et du squelette, mais toujours sur une forme soluble, phytate, de plutonium. Par ailleurs aucun résultat n'est reporté pour la fraction du plutonium séquestrée au niveau des poumons.

Ces études sont prometteuses et permettent d'envisager une vectorisation ciblée passive suivant la taille des liposomes. Néanmoins les formes galéniques choisies dans la majorité des études sont administrées par voie intraveineuse, or cela soulève le problème d'un décorporant prêt à l'emploi, rapide à utiliser, d'autant plus que certaines études récentes[95] soulignent l'importance d'un traitement rapide (1 h maximum après la contamination) pour promouvoir une efficacité.

Afin de pouvoir administrer le DTPA de façon orale, des composés « DTPA like » ont été développés.[96] Ces composés sont des acides triéthylène tetramine pentaacétique, avec des chaines alkyles de longueurs différentes (Figure 20).



R = $(CH_2)_6CH_3$
$(CH_2)_{10}CH_3$
$(CH_2)_{14}CH_3$
$(CH_2)_{20}CH_3$

Figure 20 : Formule topologique de différents dérivés lipophiles du DTPA dont le C_{22}TT.

Les composés les plus lipophiles, c'est-à-dire ceux avec la plus longue chaine carbonée comme le C_{22}TT (acide docosyltriéthylènetétramine penta acétique)se sont révélés plus efficaces que leurs homologues inférieurs comme le C_{12}TT pour la décorporation du Pu-239 et de l'Am- 241.[97] Après 30 jours de traitement, le C_{22}TT par voie orale est aussi efficace que le Zn-DTPA par voie injectable pour décorporer le Pu au niveau du foie (67 %). En effet, le C_{22}TT limite la redéposition du Pu-239 éliminé au niveau du foie sur les os, mais une partie du Pu est séquestrée au sein des os, lors du processus normal de remodelage et reste donc inaccessible. Néanmoins, son administration par voie orale pourrait permet de l'administrer facilement à une large partie de la population, ce qui est un avantage non négligeable.

Afin de conclure sur l'utilisation du DTPA dans le cadre de la décorporation du plutonium, une étude comparative[98] a été réalisée sur des formes solubles (citrate et nitrate) et insolubles (MOx) du plutonium, en combinant différentes voies d'administrations (injection, inhalation de poudre de DTPA) sur des rats contaminés par inhalation ou par blessure. Cette étude montre qu'une combinaison d'administration locale permet de réduire la rétention du Pu au sein du site primaire de contamination mais aussi de diminuer sa rétention au sein des sites secondaires (os, foie). Il apparait néanmoins que dans le cas d'une contamination par des MOx, aucun traitement (local ou local + intraveineux) ne s'avère efficace au sein du site primaire de contamination.

III Les analogues de sidérophores

En utilisant une approche biomimétique basée sur les similarités biochimiques observées entre le fer(III) et le plutonium(IV), des analogues de sidérophores ont été développés.

Les sidérophores sont des molécules chélatrices de fer, de faible poids moléculaire (200 à 2000 Da), secrétées par des bactéries afin de capter le fer présent dans leur environnement. Ils se répartissent en 3 grandes familles : les phénolates-catécholates, qui possèdent un groupement acide 2,3-dihydroxybenzoïque, les hydroxamates et les acides hydroxycarboxyliques (Figure 21).

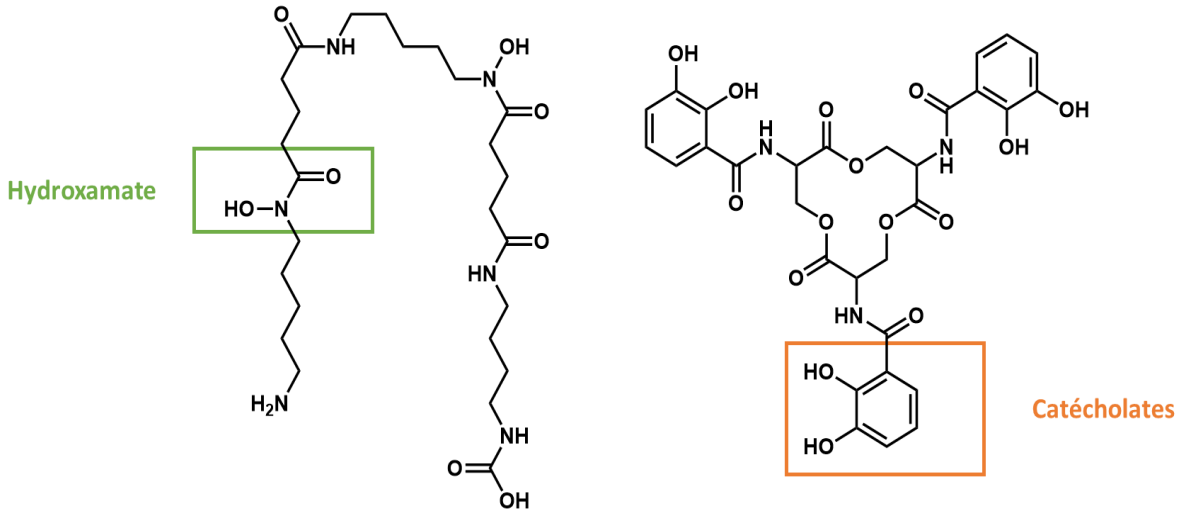
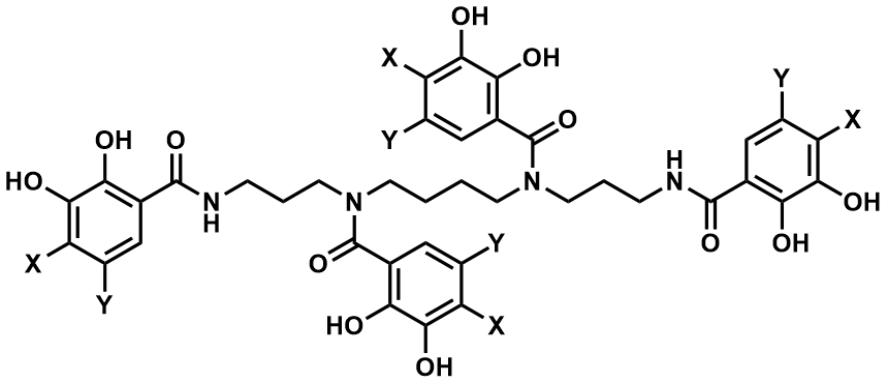


Figure 21 : Quelques exemples de sidérophores bactériens et de leurs fonctions chélatantes caractéristiques.

a. Les catécholamides

Dans la famille des cathécolamides (CAM), les LICAM (LI pour linéaire) ont été étudiés dans la décorporation du plutonium.

Plus précisément, deux molécules ont été principalement étudiées, le 3,4,3-LICAM (S) et le 3,4,3-LICAM (C). Le préfixe 3,4,3 représente le nombre de méthylène entre les atomes d'azote du squelette, les suffixes (S) et (C) indiquent, respectivement, une sulfonation ou une carboxylation de la sous-unité chélatante finale (Figure 22).



Abréviations	X	Y
3,4,3-LICAM (S)	-H	$-SO_3Na$
3,4,3-LICAM (C)	$-CO_2Na$	-H

Figure 22 : Formule topologique du 3,4,3-LICAM (S) et du 3,4,3-LICAM (C).

Malgré des résultats prometteurs,[99] le 3,4,3-LICAM (S) montrant une meilleure efficacité que le complexe $CaNa_3$-DTPA pour la décorporation du plutonium au niveau du squelette (chez la souris), son développement a été rapidement arrêté à cause de sa toxicité rénale chez le chien. C'est donc son équivalent carbonylé, le 3,4,3-LICAM (C) qui a été étudié.

Son affinité pour le Pu est beaucoup plus élevée que le DTPA : en présence de transferrine, il est 500 fois plus efficace que le DTPA[99,100] pour libérer le plutonium complexé à la transferrine (dans le sérum de rat). Les tests sur des rongeurs[101] ont permis de montrer une efficacité supérieure à celle du DTPA au niveau osseux. En injectant des doses de LICAM 30 fois plus faibles que celles de DTPA usuellement prescrites, on obtient une efficacité de décorporation osseuse équivalente. Mais une augmentation du plutonium est constatée au niveau des reins.

Ainsi afin de diminuer la rétention du complexe Pu-LICAM au niveau rénal, Gerasimo & *al.*[102] ont utilisé une bithérapie : LICAM et bicarbonate, ou LICAM et DTPA. En effet, la rétention de ce complexe est pH dépendante. Dans le pH de l'urine (environ pH : 6), le complexe précipite, ayant pour conséquence la rétention du plutonium et une possible obturation mécanique des tubules rénaux. L'alcalinisation de l'urine par l'ajout de bicarbonate, ou de DTPA, permet la solubilisation du complexe et son excrétion dans les 24 h.

L'utilisation du LICAM (C) a aussi été testée sur des rats après inhalation de nitrate de Pu-238, en quantité comparable à celle qui pourrait être inhalée en cas d'accidents sévères.[103] Dans ce cas, le DTPA s'est montré plus efficace que l'utilisation de LICAM (C)

La présence d'effet secondaires au niveau des reins (rétention rénale de l'activité), ainsi que sa faible efficacité de décorporation en cas de contamination au Pu par inhalation ont mis un coup d'arrêt au développement de cette molécule décorporante.

b. Les hydroxypyridinones

Les hydroxypyridonates (HOPOs) (Figure 23) sont des molécules chélatantes octodentate ou tetradentate. Dans cette famille les composés les plus actifs sont le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO). Le préfixe 3,4,3 indique là encore le nombre de méthylène entre les atomes d'azote du squelette. On utilise le préfixe « LI » pour linéaire, et « LIO » pour signifier que dans la chaine polyaminée il y a une liaison « éther ». Ces molécules chélatantes d'actinides sont composées d'une unité hydroxypyridinone reliée à un squelette polyaminé grâce à des liaisons amides. Le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) est basé sur la structure de la spermine (polyamine endogène).

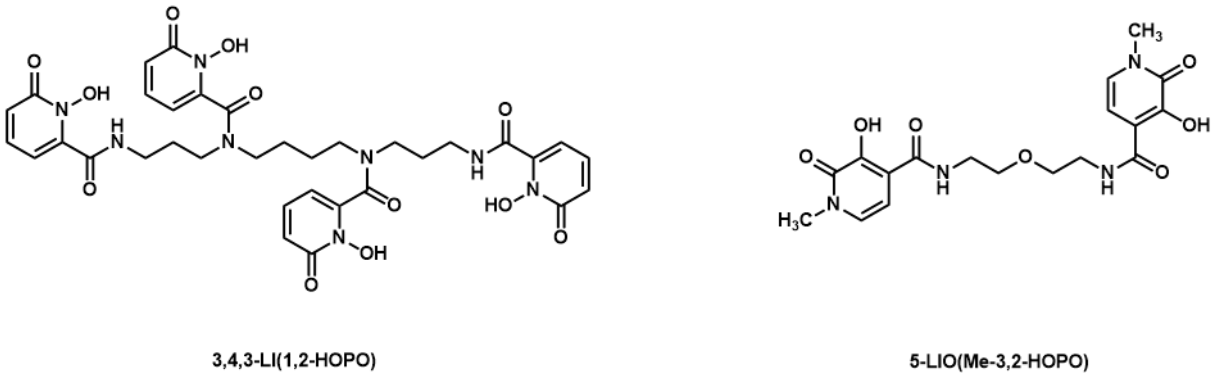


Figure 23 : Formule topologique du a) 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et du b) 5-LIO(Me-3,2-HOPO).

L'étude préliminaire du 3,4,3-LI(1,2-HOPO), abrégé LIHOPO par la suite, et du 5-LIO(Me-3,2-HOPO) a montré une efficacité plus élevée que le $CaNa_3$-DTPA (en quantité équimolaire).

En particulier sur l'excrétion de Pu-238 et de Am-241. Ils se sont révélés notamment efficaces sur les os et les tissus mous. Aucune toxicité n'a été observée sur les rats.

Afin de pouvoir envisager l'application de ce traitement en cas de contamination liée au MOx (mélanges d'oxydes d'uranium et de plutonium), Paquet *& al.*[104] ont réalisé des injections intramusculaires de MOx (contenant 26 % de PuO_2) sur des rats. Le LIHOPO s'est révélé inefficace pour décorporer le plutonium déposé au niveau de la blessure (97 % du plutonium total). Néanmoins, il s'est révélé plus efficace pour décorporer le plutonium « soluble » (après sa translocation dans le sang). En effet dans ce cas, on observe une réduction de plutonium, au niveau des fémurs et des reins, plus élevée que celle observée en utilisant le DTPA.

En administration par voie orale,[105] voie la plus pratique en cas de contamination à grande échelle, le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et le 5-LIO(Me-3,2-HOPO) se sont montrés plus efficaces que l'administration de $CaNa_3$DTPA, notamment au niveau osseux. Le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) se montre par ailleurs plus efficace que le 5-LIO(Me-3,2-HOPO). Cela pourrait être expliqué par sa plus grande hydrophilie, qui semble faciliter l'accès de la molécule au Pu déposé au niveau osseux.

Pour compléter ces études dans l'éventualité d'une mise sur le marché, des études de toxicité ont été réalisées.[106]

L'administration de doses répétées de 3,4,3-LI(1,2-HOPO) et de 5-LIO(Me-3,2-HOPO), par voie orale sur des périodes allant de 7 à 28 jours n'a pas montré de toxicité. De plus, les deux molécules chélatantes ont été évaluées comme étant non génotoxiques.

Plus récemment, les études précliniques se sont focalisées sur le LIHOPO.

Choi *& al.*[107] ont montré sa stabilité au sein de plusieurs matrices biologiques, ce qui est important pour une bonne biodisponibilité orale puisque le composé doit notamment rester stable en milieu acide (milieu gastrique). Les tests Caco-2 montrent une faible perméabilité du LIHOPO. Malgré sa faible perméabilité, le LIHOPO est un composé prometteur pour décorporer les formes solubles du plutonium, en administration par voie orale.[108]

IV Les macromolécules chélatantes

a. Les polymères chélatants

Des polymères chélatants,[109–113] analogues polymériques du DTPA pour le PEI-MC (MéthylCarboxylate) et du DTPMP pour le PEI-MP (MéthylPhosphonate) sont en cours de développement. Ces polymères sont obtenus en fonctionnalisant un PEI (PolyEthylèneImine) commercial de 25 kDa (Figure 24).

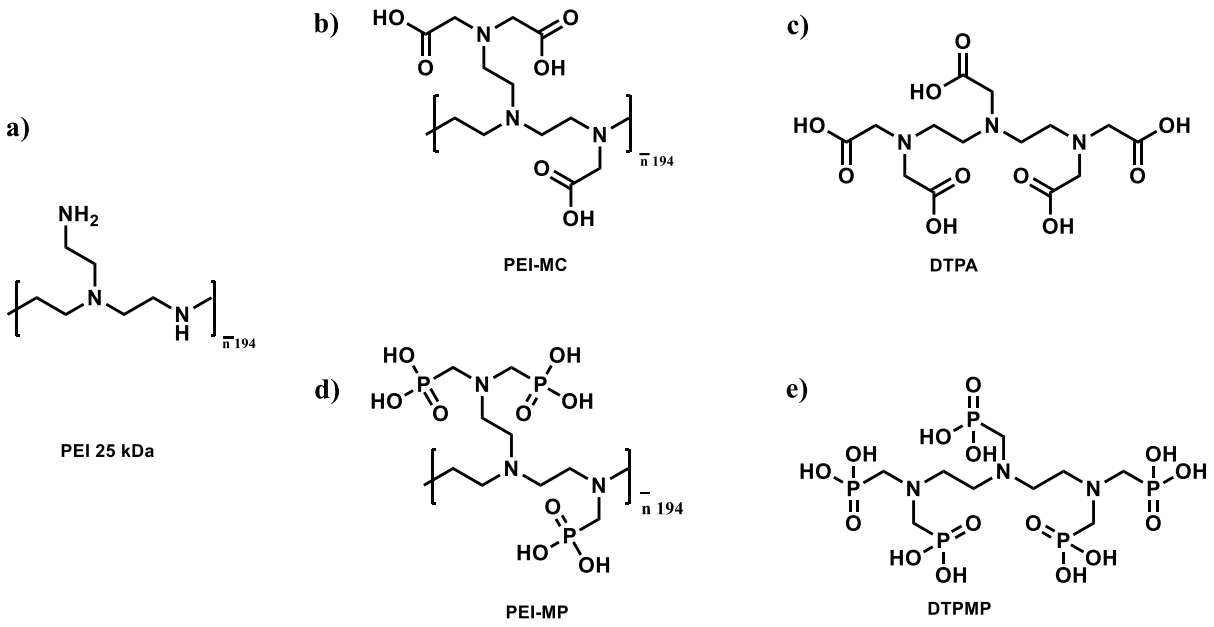


Figure 24 : Structure a) du polymère de départ b) du PEI-MC c) de son analogue monomérique le DTPA d) du PEI-MP e) et de son analogue monomérique le DTPMP (état de protonation arbitraire).

L'affinité du PEI-MC pour de nombreux cations (Ag^{+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}…) a été démontrée par Masotti *& al.* dont une application a été d'utiliser le PEI-MC afin d'extraire ces métaux d'une eau contaminée.[114]

Le poly(éthylèneimine méthylènephosphonate) (PEI-MP) ramifié s'est révélé prometteur dans plusieurs applications de chélation de métaux (Fe^{3+},Pb^{2+}…), mais aussi pour son utilisation en radiothérapie interne (administration des rayons *via* un médicament « vecteur » porteur d'un élément radioactif).[115–118] Dans ce dernier domaine, le PEI-MP a notamment été utilisé conjugué à divers éléments radioactifs (^{99m}Tc, ^{188}Re…) pour son habilité à cibler les tumeurs, principalement les tumeurs osseuses.

Notre équipe a utilisé le PEI-MC et le PEI-MP dans le cadre du traitement d'une exposition aux actinides. Ainsi, la complexation du PEI-MC et du PEI-MP a été étudiée avec l'uranium (VI), le thorium (IV) et le plutonium (IV), tous sous forme soluble, par des études de type dose-réponse et par spectroscopie EXAFS.

Il a été mis en évidence que le PEI-MC et le PEI-MP présentent des efficacités chélatantes comparables à leurs analogues moléculaires respectivement le DTPA et le DTPMP.

Ces analogues polymériques présentent plusieurs avantages par rapport au DTPA et DTPMP : le contrôle de leur taille permet une vectorisation passive vers des compartiments « à cibler », comme les alvéoles pulmonaires ainsi qu'une activation de la phagocytose au niveau des macrophages, leur taux de fonctionnalisation (supérieur à 90 %, mesuré par analyse élémentaire) permet de profiter de l'effet cluster : plus il y a de fonctions chélatantes dans un espace réduit, plus l'efficacité de chélation sera importante.

b. Les calix [n] arènes

Les calix[n]arènes ont été utilisés comme des ligands de métaux pour diverses applications. Les calix [n]arènes sont des ligands macrocycliques constitués d'unités phénoliques liées entre elles par des ponts méthylènes en position ortho. Ils ont la particularité de posséder une cavité lipophile interne (formée par les cycles aromatiques) (Figure 25).

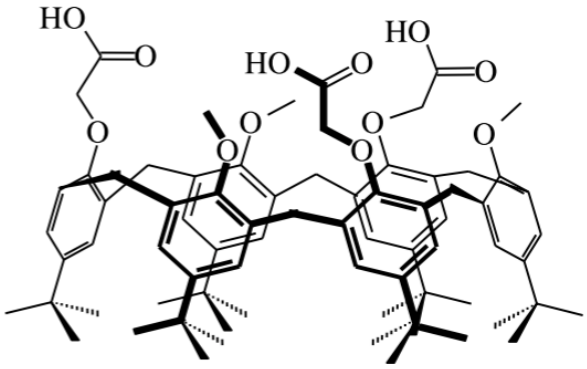


Figure 25 : Structure du 1,3,5-OCH3-2,4,6-OCH2COOH-ptertbutylcalix [6]arène.

Ils ont été utilisés dans un premier temps pour surveiller une éventuelle contamination par les actinides (U , Pu…).[119,120] Pour suivre ou estimer la contamination par un actinide, il est important de contrôler son excrétion, et donc de le chélater sélectivement au sein d'un fluide biologique pour ensuite le quantifier. Suivant le pH des urines, il a été montré que la calix [6] arène est capable de chélater le Pu(IV), *via* un ajout de $NaNO_2$ afin de le maintenir à un degré d'oxydation +IV.

Des études de toxicité ont été réalisées, montrant notamment que des dérivés du calix [6] arène et du calix [8] arène semblent aussi peu toxiques que le glucose.[121] Néanmoins ces études ont été réalisées notamment sur des dérivés sulfonylés du calix [n] arènes, et non sur les calix [6] arènes dont les faces sont fonctionnalisées par des tert-butyles et qui sont ceux qui montrent un profil intéressant pour la décorporation des actinides.

Enfin, fruit d'un projet de collaboration entre l'IRSN et de Cévidra, une crème Calixarène ® (FR0858703A (2008)) a été mise sur le marché en 2018. Cette crème, dont l'ingrédient actif est le calixarène carboxylique (0,75 %), est une crème lavante et décontaminante destinée aux traitements des contaminations externes de radionucléides (U, Pu, Th, Am…). La crème Cevidra® est le seul dispositif médical commercialisé avec une efficacité prouvée scientifiquement dans les études menées par l'IRSN et opérationnellement en décontamination du personnel dans des installations nucléaires. Néanmoins, cette crème n'est utilisable qu'en application externe, dans des cas spécifiques de contamination de la peau. Elle n'est donc pas utilisable pour la décontamination du plutonium lors d'une contamination par inhalation. D'autre part, la synthèse de ces calixarènes carboxyliques, à grande échelle, reste problématique et couteuse.

V Les nanoparticules chélatantes

a. Les nanoparticules fonctionnalisées par le DTPA

Des formulations de nanoparticules de DTPA ont été synthétisées dans le cadre d'une contamination par des actinides par inhalation, blessure ou ingestion. Dans le cadre de la décorporation du ^{241}Am(III), il a été montré qu'elles ne présentaient pas de toxicité ni d'effets secondaires chez le chien (pour des doses allant de 36,5- 72,9 mg/kg de NanoDTPA ™).[122] Ces nanoparticules, administrées par voie orale,[123] montrent une efficacité similaire à celle du Zn-DTPA (i.v) (ici à une dose de 15 mg/kg contre une dose de 60 mg/kg pour les capsules de NanoDTPA™). NanoDTPA™ a été reconnu par l'USFDA en 2011.

D'autres types de formulations[124] comme des nanoparticules de TiO_2 greffées par du DTPA-Pegylé montrent un temps de résidence prolongé du DTPA au sein d'un liquide pulmonaire simulé.

Cet accroissement du temps de résidence semble prometteur puisqu'il devrait permettre une augmentation locale de la concentration en molécules chélatantes mais des études doivent maintenant être effectuées avec le plutonium sous des formes insolubles idéalement.

b. Les nanoparticules chélatantes à base de N-triméthyl chitosan

Le chitosan est un copolymère constitué d'unités glucosamine et N-acétylglucosamine, issu de la désacétylation de la chitine. Biodégradable et présentant une faible toxicité pour le corps humain,[125–127] ses propriétés mucoadhésives[128] lui permettent notamment d'adhérer aux parois cellulaires et d'augmenter son temps de résidence en milieu biologique. Il est d'ailleurs utilisé comme vecteur pour transporter des molécules actives et les délivrer dans des zones cibles, telles que les tumeurs (en bénéficiant de l'effet de perméabilité et de rétention accrue (EPR) ou l'oeil.[129,130]

Il constitue donc un polymère de choix en tant que plateforme pour la formation de nanoparticules fonctionnalisées. Il est souvent retrouvé sous forme de N-triméthyl-chitosan (TMC), la méthylation de ses fonctions amines permet en effet d'augmenter son caractère poly-cationique sur une plus grande gamme de pH, permettant ainsi d'augmenter sa solubilité (le chitosan étant uniquement soluble à pH acide).

De nombreuses études s'intéressent à la formation de nanoparticules à base de chitosan, notamment par réticulation ionotropique grâce à des agents de réticulations. Parmi ces agents de réticulation, le tripolyphosphate (TPP) est non toxique et forme des liaisons ioniques par interactions entre le groupe amine quaternaire chargé positivement et la charge négative des TPP. Ce procédé de réticulation est simple à mettre en œuvre mais la stabilité des formulations est dépendante du pH.[131] Ces nanoparticules ont notamment montré une bonne efficacité de chélation des métaux dans le traitement des eaux contaminées où elles sont utilisées sous forme de résines.[132]

Des nanoparticules de N-triméthyl chitosan (TMC) réticulées au DTPMP ont été utilisées comme approche alternative au TPP (Figure 26) par Léost *& al.*[133]. Le DTPMP joue ici le double rôle d'agent de réticulation et d'agent de chélation.

L'internalisation par les macrophages devrait permettre de libérer l'agent chélatant (DTPMP) et de dégrader la matrice de polysaccharides du TMC.

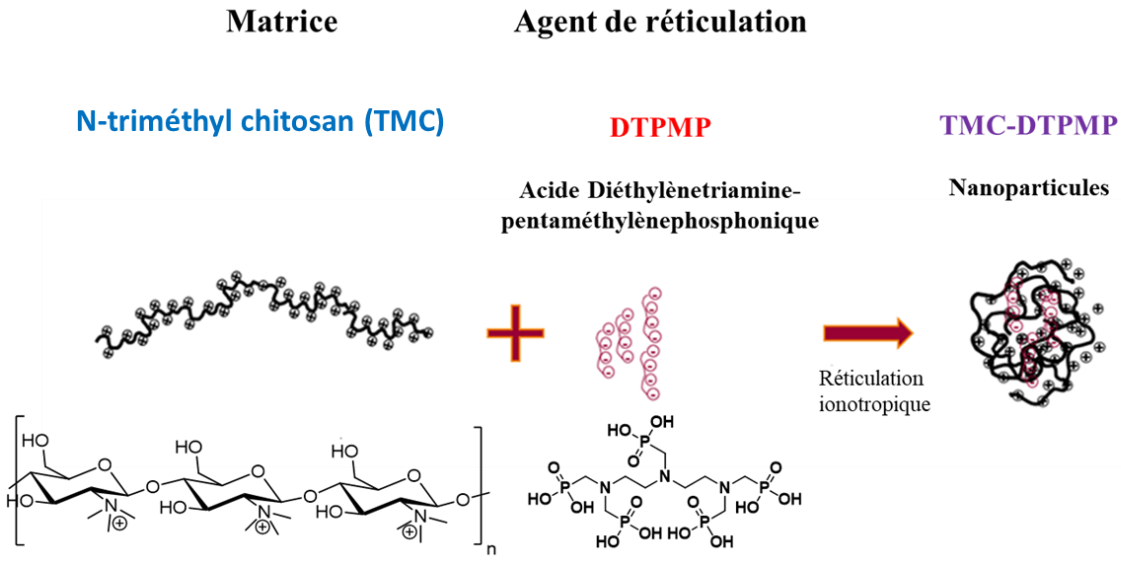


Figure 26 : Schéma de synthèse des nanoparticules de N-triméthylchitosan réticulées au DTPMP.

En ajustant les conditions opératoires, on peut contrôler la taille de ces nanoparticules pour cibler indirectement les alvéoles pulmonaires. Des formulations de TMC présentant un taux de réticulation/fonctionnalisation de 10 % en DTPMP ont été testées en milieu physiologique en présence de Th(IV). Elles présentent une affinité pour le thorium (IV) comparable à celle du DTPMP libre. Testées sur Pu(IV), la spectroscopie EXAFS a permis de mettre en évidence la complexation du Pu(IV) par ces nanoparticules de TMC. Enfin, des tests de cytotoxicité ont montré une internalisation plus conséquente des nanoparticules que des chélateurs libres (DTPA et DTPMP). La matrice polymérique semble se dégrader une fois internalisée par les macrophages, permettant ainsi la libération du ligand chélateur DTPMP.

Récemment, des molécules de LIHOPO ont été encapsulées avec des nanoparticules de chitosan.[134]

Le profil pharmacocinétique de ces molécules au sein de fluide pulmonaires simulés semblent indiquer une libération prolongée, permettant un maintien de la molécule au sein des poumons à une concentration thérapeutique, et donc une réduction du nombre de dose à administrer. Il reste néanmoins à tester leur efficacité sur le thorium et le plutonium.

c. Les nanoparticules à base de polyéthylène glycol

Très récemment, Miao *& al.*[135] ont proposé d'utiliser des nanoparticules de mélanine (MNPs) greffées au polyéthylène glycol (PEG) (MNPs-PEG, 4-10 nm) comme agent de décorporation pour l'uranium et le thorium. Les résultats ont confirmé que les MNPs-PEG peuvent adsorber sélectivement l'U(VI) et le Th(IV) en présence d'un excès de Ni^{2+}, $Zn.^{2+}$, Mn^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+} et Ca^{2+} à pH 4,0 et 7,4.

Dans les cellules NRK-52E (cellules du rein) et AML-12 (cellules du foie), les MNPs-PEG montrent une cytotoxicité acceptable proche de celle du DTPA-$ZnNa_3$. Ce nano-chélateur a pu décorporer le Th(IV) à hauteur de 42,8 % au niveau du foie *in vivo.*

VI Méthodes de décorporation invasives

a. Le lavage broncho alvéolaire

Le lavage bronchoalvéolaire est une méthode d'aide au diagnostic médical. Il consiste à injecter dans les bronches et les alvéoles pulmonaires une solution de liquide physiologique stérile à 37 °C puis à récupérer ce liquide. Dans le cadre de la décontamination pulmonaire d'actinides, il a été détourné de son usage initial afin de tester sa capacité de décorporation notamment vis-à-vis du PuO_2.

Nolibé *& al.*[136] ont notamment démontré l'efficacité du lavage bronchoalvéolaire sur des babouins et des chiens contaminés *via* l'inhalation de particules de PuO_2 . Après un unique lavage, il est possible, avec cependant une grande variabilité individuelle, d'éliminer jusqu'à 28 % de la quantité initiale déposée. Ce taux peut atteindre 50 % après cinq lavages. Cependant, en dépit de sa relative efficacité, le lavage bronchoalvéolaire reste une procédure invasive qui implique les mêmes risques qu'une anesthésie générale, il n'est donc pas adapté au traitement d'une large population et ne reste indiqué que dans un nombre limité de cas.[137]

Dans une étude récente,[138] il est conseillé d'utiliser le lavage bronchoalvéolaire pour éviter les effets déterministes au-dessus de 6 gray (le gray est l'unité qui permet de mesurer la quantité de rayonnement absorbé par un corps exposé à de la radioactivité) et au cas par cas pour des doses plus faibles afin de diminuer le risque d'effets stochastiques.

b. L'excision de la blessure

Le débridement de la blessure ou plus précisément son excision est une solution envisagée pour permettre de retirer la contamination directement au sein du site primaire. Tout comme le lavage bronchoalvéolaire, cette méthode est pratiquée après une stricte évaluation de la balance bénéfice/risque. Lorsque cette excision doit être réalisée de façon chirurgicale, elle doit être faite en présence de personnes compétentes en radioprotection.

Cette méthode a été employée dans plusieurs cas de contaminations accidentelles[139,140] chez l'homme et est en général combinée avec des lavages de la blessure au DTPA et des injections de DTPA, évitant ainsi de futurs dépôts d'actinides dans les organes systémiques.

Ce traitement présente également le désavantage d'être invasif et de ne pas être applicable à une large population.

D. Une stratégie de décontamination insuffisante à l'heure actuelle

I Les principaux verrous à l'utilisation du DTPA

Le DTPA, sous sa forme calcique ou zincique, est à l'heure actuelle le seul traitement de référence dans le cas d'une contamination par les éléments transuraniens (plutonium, américium et curium…). Bien qu'il soit particulièrement adapté à la chélation, dans le cas de formes circulantes, son efficacité reste limitée dans le cas d'une contamination par des formes insolubles d'actinides, et ce, quelle que soit la voie de contamination (inhalation ou blessures). Le DTPA possède en effet une demi-vie faible dans le plasma (environ 90 minutes). Sa biodistribution[141,142] s'en voit donc réduite et il est éliminé rapidement par filtration glomérulaire au niveau des reins.

Ainsi, qu'il soit utilisé *via* inhalation ou injection, dans le cas d'une contamination par des PuO_2, le DTPA aura peu d'efficacité. Les formes peu solubles d'actinides vont se retrouver piégées au sein des grands organes : poumons (et plus particulièrement dans les macrophages alvéolaires) dans le cas d'inhalation ; ou foie, reins et squelette en cas de transfert dans la circulation (dans le cas de blessures par exemple). Ces sites vont agir comme des réservoirs « sanctuaires » et exercer une irradiation interne sur le long terme. Seule la part capable de se dissoudre lentement au cours du temps, relarguée au sein du système sanguin, pourrait être prise en charge par le DTPA. Ce traitement additionnel par i.v peut être réalisé afin de réduire la quantité de Pu, même si dans le cas d'une contamination par des formes insolubles cette fraction représente moins d'un pour cent de la dose retenue (contre 20-30 % pour des formes solubles).[98]

La question d'un traitement complémentaire au DTPA et adapté en vue de diminuer l'activité au sein de ces « réservoirs » demeure donc entière.

II Notre projet : une stratégie complémentaire au DTPA

Ce projet de thèse consiste en l'étude d'une approche basée sur une plateforme polymérique simple et axée sur la problématique liée à une contamination par inhalation et/ou du squelette par le Pu/Th(IV). Nous avons postulé qu'un polymère chélatant pourrait cibler indirectement les principaux sites de rétention des actinides tels que les alvéoles pulmonaires (inhalation) ou le squelette (à condition qu'une affinité pour l'os soit mise en œuvre dans ce cas). Cette stratégie pourrait donc être tout à fait complémentaire à celle d'une thérapie Ca-/Zn-DTPA qui est, comme nous l'avons vue, la seule alternative bien qu'elle ne soit efficace que sur les formes circulantes (solubles) de Pu principalement.

Au cours des dernières années, notre groupe a développé une approche macromoléculaire basée sur un squelette de polyéthylèneimine (PEI) pour la décontamination des actinides.[110–113]

Nous avons ainsi obtenu, après une fonctionnalisation adéquate, des analogues polymériques du DTPA, PEI-MC (PolyEthylene-Imine-MethylCarboxylate, véritable analogue structurel) et PEI-MP (PolyEthylene-Imine-MethylPhosphonate, analogue phosphonate) basés sur un PEI ramifié de 25 kDa disponible dans le commerce (Figure 27). Un polymère entièrement fonctionnalisé peut être représenté par une population polydisperse ayant des masses allant de ~ 5 à 150 kDa.

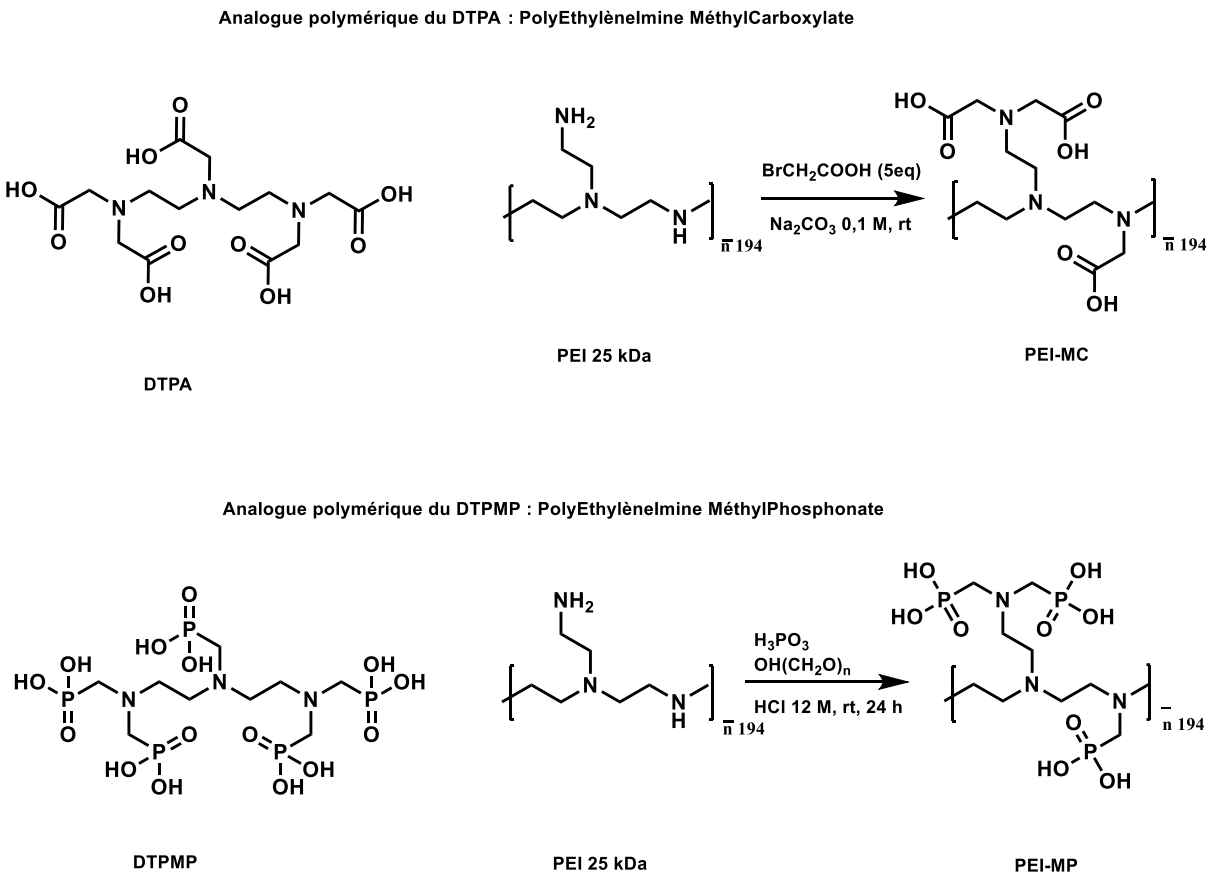


Figure 27 : Structures chimiques des polymères chélatants porteurs de fonctions carboxyliques ou phosphoniques et de leurs analogues moléculaires de référence.

Les synthèses de ces PEI chélatants peuvent être réalisées en une seule étape (voir partie expérimentale § B.I et § B.II), avec des rendements très élevés et sont très bon marché. La purification par ultrafiltration est simple. Trop d'agents chélatants développés jusqu'à présent nécessitent un grand nombre d'étapes de synthèse et de purification fastidieuses. De plus, comme ces composés sont des polyampholytes (voir partie expérimentale § B.III et annexe II), ils se dissolvent facilement dans l'eau, ce qui les rend très faciles à utiliser.

Nous avons clairement démontré la capacité de ces polymères à base de PEI à séquestrer à la fois l'U(VI) (uranyle) et les actinides (IV) (Pu et Th). En effet, dans des conditions (pseudo)physiologiques, les deux polymères présentent une CE_{50} (concentration efficace à 50 %) comparable à celle du DTPA pris comme référence.

La complexation au Pu(IV) a également été démontrée par spectroscopie EXAFS avec les deux polymères, PEI-MC et PEI-MP.[110,113]

L'objectif de cette thèse est maintenant d'étudier leur capacité à extraire du Th(IV) de l'hydroxyapatite (utilisée comme matrice biomimétique simplifiée de l'os) et/ou de macrophages (utilisés comme analogues des macrophages alvéolaires) qui ont préalablement été contaminés.

Dans ce projet, le thorium a été utilisé comme un analogue du plutonium à l'état tétravalent. En effet, ils partagent des caractéristiques physico-chimiques. Même si le plutonium présente plusieurs degrés d'oxydation (+III, +IV, +V, +VI, +VII), l'état le plus stable retrouvé en conditions physiologiques est sous forme +IV. En effet, des ligands stabilisent le plutonium sous cette forme *in vivo*.[3] Le thorium lui, est présent uniquement à l'état d'oxydation +IV avec la configuration électronique [Rn] $7s^0 5f^0 6d^0$, isoélectronique du radon. Le thorium est donc présent en solution sous la forme Th^{4+}.[3] De plus, tout comme le plutonium, le thorium est sensible à l'hydrolyse, il a une forte tendance à former des complexes insolubles de polyhydroxydes et polyoxydes.[3] Le thorium et le plutonium peuvent donc tous les deux être retrouvés sous la forme stable de dioxyde.

Le Tableau 7 rassemble quelques données importantes au regard de l'utilisation du thorium comme analogue du plutonium.

Tableau 7 : Données biocinétiques et constantes d'équilibres du thorium et du plutonium (les constantes de complexation pour le DTPA prennent en compte la compétition avec le NTA).[29,143–145]

Eléments	Thorium	Plutonium
Forme chimique	Th(IV)	Pu(IV)
Rayon ionique	1,048 (Å)	0,962 (Å)
Electronégativité	1,3	1,28
Log K		
EDTA	26,6	25,8 [a]
DTPA	28,96 ± 0,14 [b]	36,36 ± 0,36 [b]

[a] I = 1 M (0,9 M HNO_3 + 0,1 M KNO_3), T = 296 K, 0,12 < pH < 0,92

[b] I = 0,1 M, T = 25 ° C, p_cH = 1,395 (HNO_3)

Ainsi, même si le rayon ionique du plutonium est plus faible que celui du thorium, la similitude des interactions avec des ligands usuels comme l'EDTA et le DTPA nous permettent de considérer que des résultats pour des complexes de Th(IV) sont représentatifs de ceux obtenus avec des complexes de Pu(IV). Bien évidemment il faut aussi garder en tête que les constantes de formation des complexes 1 : 1 de l'EDTA et du Th(IV) et Pu(IV) sont à relativiser en raison d'une détermination par des techniques différentes et à des forces ioniques différentes.

L'utilisation d'un analogue du thorium est rendue nécessaire par la forte activité spécifique du plutonium ($2{,}3x10^9$ $Bq.g^{-1}$ pour le Pu-239 et $4{,}1x10^3$ $Bq.g^{-1}$ pour le Th-232). Néanmoins cette approche doit être considérée avec prudence car l'utilisation d'analogue a des limites.[29]

En effet, le cation Pu(IV) étant plus petit que le cation Th(IV), le Pu(IV) sera donc plus sensible à l'hydrolyse et plus propice à former des complexes ioniques.

Enfin, si les applications industrielles liées au thorium venaient à se développer plus en avant (usines à sels fondus), ce choix prendrait encore plus de sens.

Nous avons décidé dans cette étude de travailler en quantité de matière et non en activité. En effet, la différence entre la demi-vie du Th et celle du Pu (14,05 milliards d'années pour le Th-232 contre 24 065 ans pour le Pu-239) est telle, que travailler avec la même activité de chaque élément produirait un biais au niveau du nombre d'atomes de Th et de Pu.

III Conclusion

Cette revue bibliographique a permis de dresser un panorama des moyens de décorporation disponibles en cas de contamination par le plutonium et le thorium. La contre-mesure la plus utilisée est le DTPA, administré par différentes voies (i.v, inhalation, cutanée). En plus d'être peu spécifique du plutonium, il ne permet pas d'atteindre les compartiments de rétention du Th et du Pu en raison de sa faible biodisponibilité, ni d'agir sur toutes les formes chimiques du Pu, notamment sur les formes insolubles. Même si de nombreux agents de décorporation sont développés à l'heure actuelle, parmi eux citons le LI-HOPO, leur faible spécificité tissulaire et leur faible sélectivité par rapport à l'élément métallique, ainsi que leur toxicité, entravent encore leur développement clinique. Trop d'agents développés actuellement présentent une efficacité largement dépendante de la forme chimique, notamment de la solubilité de l'actinide à décontaminer.

Ainsi, la vectorisation des molécules chélatantes ainsi que l'amélioration de leur biodisponibilité semblent être des paramètres majeurs à contrôler afin d'augmenter leur efficacité thérapeutique, dans le but de proposer une molécule chélatante efficace sur les formes insolubles séquestrées au sein des 3 sites principaux de rétention du plutonium (poumons, foie, os).

Notre but est de proposer une méthode simple, efficace et abordable basée sur une même plateforme : un polymère de polyéthylèneimine. Sur la base de nos études préliminaires, qui montrent leur capacité à chélater les actinides (U(VI), Th(IV) et Pu(IV)) en conditions pseudophysiologiques, nous souhaitons désormais valoriser ces polymères vis-à-vis de deux compartiments majeurs de rétention du plutonium et du thorium : l'os et les poumons.

Chapitre II : Polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides : application à l'os et aux poumons

A. Application au tissu osseux

I Anatomie et remodelage du tissu osseux

Comme nous l'avons vu au cours de la revue bibliographique, l'os constitue un véritable sanctuaire pour les actinides. En effet, en cas de contamination par inhalation, dans le cas de particules solubles, 80 % de l'activité va se retrouver au niveau du foie et de l'os. De même en cas de contamination par blessures, l'os et le foie seront les principaux organes ciblés.

Chez les vertébrés l'os assure des fonctions essentielles à l'organisme et se maintient tout au long de la vie grâce à sa capacité de remodelage. L'os participe à l'homéostasie du calcium et du phosphate, c'est-à-dire à leur équilibre et stabilisation physiologiques. Il est aussi par ailleurs, le siège de la formation des cellules hématopoïétiques.[146]

Un des facteurs les plus importants qui détermine la rétention du plutonium au sein du squelette est le renouvellement (ou remodelage) osseux, le procédé par lequel l'os « ancien » est résorbé par les ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau grâce à l'intervention des ostéoblastes. L'os est en effet remodelé tout au long de la vie au grès des cycles et des événements (fractures…). On considère que l'intégralité du squelette est renouvelée tous les 10 à 20 ans chez l'Homme (4 à 10 % du squelette est renouvelé par an).[147]

Afin de maintenir une bonne structure osseuse, cette balance est strictement contrôlée par des stimuli mécaniques et hormonaux. Le déséquilibre de cette balance (résorption / création) entraine des pathologies comme l'ostéoporose. Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes forment, avec les cellules bordantes et l'apport sanguin par les capillaires, ce que l'on dénomme l'unité fonctionnelle de remodelage osseux.

La Figure 28 présente le déroulement d'un cycle de remodelage osseux.

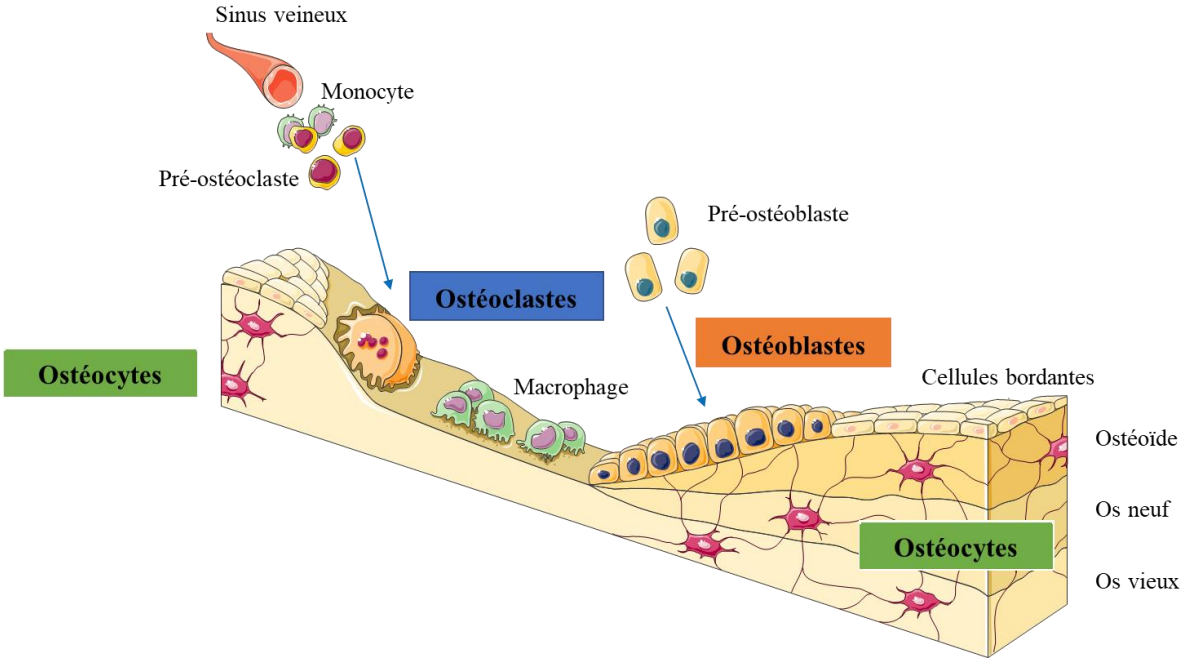


Figure 28 : Le déroulement d'un cycle de remodelage osseux (image issue de Servier medical art).

La première étape de ce cycle de remodelage est le recrutement de précurseurs d'ostéoclastes, puis leur différentiation en ostéoclastes matures qui vont s'attacher à la matrice osseuse afin d'initialiser sa destruction. Ils vont détruire à la fois la partie organique et la partie minérale de la matrice grâce à la sécrétion de protéases (en milieu acide) et vont conduire à la formation de lacunes. Après une courte période appelée phase d'inversion osseuse, la formation osseuse est initiée par le recrutement des ostéoblastes qui vont combler la lacune formée. Enfin, la phase terminale du remodelage, la plus longue, forme la nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes. Les ostéoblastes synthétisent alors la nouvelle matrice osseuse. Au cours du processus de minéralisation par les ostéoblastes, une partie de ces derniers s'emmure dans la matrice qu'ils viennent de synthétiser et se différencient alors en ostéocytes. Les ostéocytes représentent la majorité des cellules osseuses puisqu'ils constituent 95 % des cellules de l'os.[148,149] Par ailleurs, leur durée de vie peut atteindre plusieurs décennies chez l'homme. De nombreux travaux ont mis en évidence leur rôle de chef d'orchestre du remodelage osseux.[150–152]

Ces cellules, en plus d'être potentiellement touchées par une contamination par les actinides, vont aussi être en contact des éventuels agents chélatants utilisés pour la décontamination. Il sera donc important d'évaluer la cytotoxicité des agents chélatants vis-à-vis de ces cellules osseuses, afin d'éviter de perturber le bon fonctionnement de l'os.

L'os adulte est composé d'une phase minérale (50-70 %), d'une matrice organique composée de collagène (20-40 %), de 5 à 10 % d'eau et de 1 à 5 % de lipides (masse sèche par masse d'os) (Figure 29). L'hydroxyapatite (HAp), un phosphate de calcium de formule $Ca_5(PO_4)_3(OH)$, est le principal composant minéral de l'os.[153]

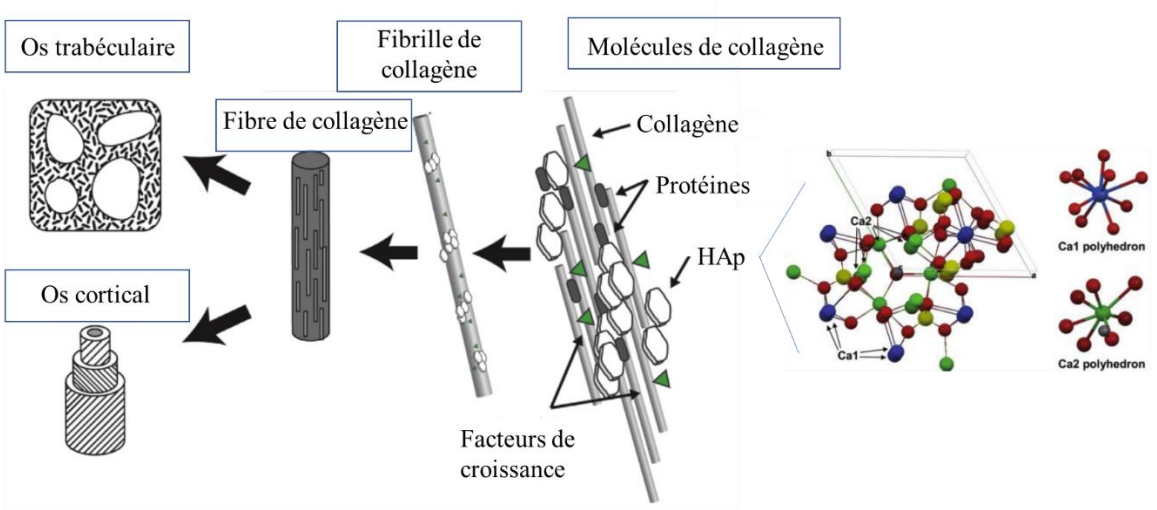


Figure 29 : Organisation du tissu osseux : l'os est composé de fibres de collagènes renforcées par les nanocristaux d'hydroxyapatite et d'autres composants tels que les protéines et les facteurs de croissance. Le collagène minéralisé est organisé en fibrilles, qui se combinent en fibres de quelques microns de diamètre et longues de plusieurs millimètres. Dans l'os trabéculaire, les fibres minéralisées sont semi-organisées alors que dans l'os cortical, les fibres d'une lamelle d'ostéon sont alignées.[38,154]

Cette partie minérale de la matrice osseuse est soupçonnée d'être à l'origine des propriétés de stockage et d'échange de cations du squelette. C'est pourquoi elle fait l'objet d'un intérêt constant. La HAp possède par ailleurs une forte affinité pour les radioéléments, notamment, l'uranium, le thorium et le plutonium.[155,156]

L'utilisation de HAp comme matrice biomimétique de l'os pour réaliser des expériences d'adsorption reflète bien l'affinité des agents ciblant le compartiment osseux. Bien évidemment, il est important de garder à l'esprit que le comportement *in vivo* de ces agents dépend d'un grand nombre de paramètres. Ainsi, même s'il est difficilement modélisable, l'utilisation de la HAp constitue néanmoins un modèle structurel et chimique robuste pour l'étude de la décorporation des actinides au niveau osseux.

Par ailleurs, de nombreuses études ont été réalisées en utilisant la HAp comme modèle de la phase minérale de l'os.[157,158].

Pour les os, et à notre connaissance, une seule équipe a rapporté une réelle expérience de décorporation *in vivo*, d'uranium seulement, en utilisant un dérivé du 3,2-Hydroxypyridinone.[159]

II Les agents de ciblage de l'os

Afin qu'un médicament puisse atteindre son efficacité optimale, il est important que le composé atteigne et soit retenu au niveau du site d'action prévu (tissu, récepteur ou autre). Les caractéristiques physiologiques spécifiques du tissu osseux en font un site difficile à cibler. En effet, la plupart des médicaments sont peu distribués au niveau de l'os, ils s'accumulent alors dans les autres organes, diminuant ainsi leur efficacité et peuvent créer des effets secondaires. Néanmoins, l'os offre un environnement unique constitué notamment de cette matrice inorganique, la HAp. Cette matrice constitue une excellente cible pour les molécules ciblant le tissu osseux en raison de sa localisation exclusive dans les os et les dents (hormis dans les cas pathologiques de calcification).

Le Tableau 8 présente les composés appartenant aux différentes classes de molécules ciblant le compartiment osseux qui sont abordées ci-dessous, avec un résumé de leurs principaux avantages et inconvénients.

À ce jour, de nombreux ligands ciblant l'os parmi lesquels les tétracyclines, les bisphosphonates, certains oligopeptides et des polymères (notamment des polyphosphonates), ont été mis au point et utilisés pour l'administration ciblée dans l'os.

a. Les tétracyclines

Les tétracyclines sont des molécules de faible poids moléculaires utilisées traditionnellement comme antibiotiques depuis la fin des années 40.[160] Peu après leur introduction en temps qu'antibiotiques sur le marché, il a été remarqué que les tétracyclines provoquaient des taches jaunes sur les dents des enfants. En effet, la tétracycline présente une forte affinité pour la HAp : elle effectue une liaison directe avec la HAp impliquant la chélation du Ca^{2+} dans la HAp par un certain nombre d'atomes d'oxygène de la tétracycline.[161] Elle cible plus spécifiquement les tissus osseux en croissance, avant la minéralisation, causant ces taches.[162] Son usage en tant qu'antibiotique a alors largement diminué dû à ces effets secondaires. La tétracycline perturbe notamment le bon développement osseux chez l'enfant.[163] C'est sur la base de cette affinité pour le système osseux que les tétracyclines ont été utilisées.

Afin de diminuer sa toxicité, certains groupes ont tenté de modifier la structure de la tétracycline dans le but de supprimer son activité biologique (liée à la toxicité) tout en gardant son affinité pour les os. Ainsi, Neale & *al.*[164] ont découvert qu'ils pouvaient conserver 50 % de l'affinité de la tétracycline pour la HAp en gardant un seul cycle de la structure originale (3-amino-2,6-dihydroxybenzamide), afin de l'utiliser pour vectoriser de l'œstrogène dans le traitement de l'ostéoporose, ce qui a permis de séparer les effets squelettiques de l'œstrogène de ses effets utérins (cancer...). La diminution du taux d'œstrogène lors de la ménopause est en effet un des facteurs de l'ostéoporose. La thérapie basée sur la prise d'œstrogène provoque des effets secondaires tels que l'augmentation de l'incidence des cancers du sein, de l'endomètre, des thromboses et des maladies cardiaques. Des analogues d'œstrogènes qui permettraient de cibler sélectivement l'os (lieu de l'ostéoporose) sont donc d'un intérêt primordial.

b. Les bisphosphonates et polyphosphonates

Les bisphosphonates (BPs) sont une famille de médicaments synthétiques qui sont largement utilisés depuis plusieurs décennies. Développés dans un premier temps pour adoucir l'eau (en extrayant le calcium de celle-ci) leur affinité pour la HAp a été utilisée pour cibler l'os.[165] Ils sont d'ailleurs probablement les médicaments les plus utilisés dans le traitement des maladies osseuses.

Les BPs contiennent deux groupes phosphonates se partageant un atome de carbone central qui peut être fonctionnalisé. Ils tolèrent notamment une variété de modification structurale (dont la fonctionnalisation par une unité chélatante) tout en gardant leur affinité pour le compartiment osseux.[166]

Leur affinité pour les os est due à leur capacité à chélater les ions calcium divalents (Ca^{2+}) présents dans la HAp.[167]

Les BPs ont notamment été utilisés pour délivrer des radionucléides lors d'une radiothérapie ciblée des métastases osseuses. On peut par exemple citer le HEDP (acide 1-HydroxyEthane 1,1-DiPhosphonique) qui a permis de délivrer de manière très sélective les radionucléides aux métastases, minimisant ainsi les dommages aux tissus mous pendant la radiothérapie.[168]

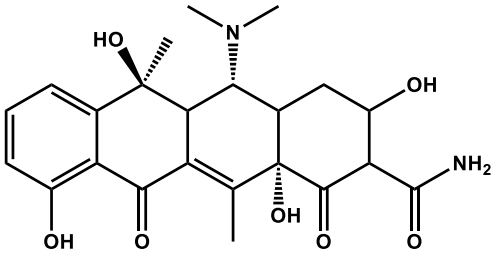
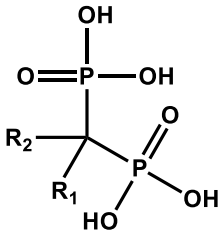
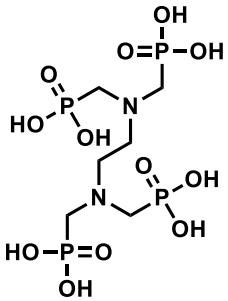
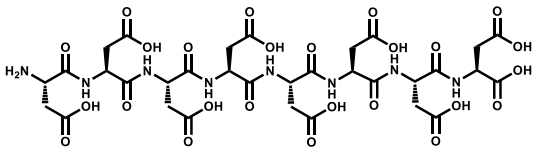
Les BPs ont néanmoins des effets secondaires importants : nécrose de la mâchoire, augmentation de l'incidence des cancers de l'œsophage.[169,170]

Les BPs ne sont pas le seul type de molécules avec des groupements phosphonates qui présentent une affinité pour la HAp. L'acide EthylèneDiamineTétraMéthylène Phosphonique (EDTMP), analogue de l'EDTA, et l'acide tétraazacyclotétradécane-1,4,8,11-tétraméthylène phosphonique (DOTMP), tous deux avec 4 groupements phosphonates, sont connus pour chélater les ions Ca^{2+} et ont été principalement utilisés pour transporter des produits radiopharmaceutiques.[171]

Le ^{153}Sm-EDTMP est d'ailleurs approuvé pour les applications cliniques. Il est disponible sous plusieurs noms commerciaux, dont Sm-153-Lexidronam™ et Quadramet®.[172,173] D'autres produits radiopharmaceutiques (par exemple ^{223}Ra, ^{177}Lu-EDTMP), ont également été utilisés pour le traitement palliatif de l'os afin de diminuer la douleur causée par les métastases osseuses.[174]

Contrairement aux BPs, aucun effet physiologique de ces molécules sur l'homéostasie osseuse n'a été signalé.

Tableau 8: Vue d'ensemble des principales classes de molécules ciblant l'os ainsi que leurs principaux avantages et inconvénients.

Nom	Structure	Avantages	Inconvénients
Tétracycline		Forte affinité et spécificité pour les os en croissance.	Peu d'affinité pour les zones de faible croissances osseuses Provoque des taches sur les dents et problème sur les os en croissance.
Bisphosphonate		Forte affinité pour la matrice minérale Facilement fonctionnali-sable	Demi-vie longue (jusqu'à plusieurs années) Effets secondaires (peut inhiber l'homéostasie osseuse).
Polyphosphonates (ici EDTMP)		Affinité osseuse modulable en fonction du nombre de groupements phospho-nates. Moins toxique que les BPs	La distance entre les groupements oxygènes est impliquée dans le degré de chélation
Oligopeptide		Demi-vie faible Affinité modulable Non toxique	Liaison peptidique facilement hydrolysable avant d'atteindre l'os.

c. Les polymères ciblant l'os

L'avantage de l'utilisation d'un polymère réside notamment dans la possibilité d'ajuster l'affinité pour sa cible grâce à la modification de sa taille . C'est pourquoi un des aspects importants à considérer dans l'utilisation des polymères pour la thérapie est le contrôle du poids moléculaire du polymère synthétisé. En effet, le poids moléculaire peut affecter drastiquement les propriétés pharmacocinétiques (biodistribution, temps de demi-vie) d'une molécule. Ainsi, le polymère doit avoir un poids moléculaire suffisamment élevé pour éviter qu'une part significative ne soit éliminée par filtration glomérulaire au niveau des reins. Augmenter sa taille permet ainsi d'éviter l'administration répétée de doses. Cependant, son poids moléculaire ne doit pas être trop élevé afin d'éviter qu'il ne se retrouve piégé par le foie et les reins. Par définition, les polymères ciblant le compartiment osseux doivent rester, après une administration intraveineuse, suffisamment longtemps dans le sang pour être ensuite distribués à l'os avant d'être capturés par le foie ou les reins. A moins qu'ils ne puissent être directement administrés localement au niveau des sites contaminés et que leur adsorption soit rapide. Ici sont présentés en détails plusieurs polymères ciblant l'os.

i) Les polypeptides

Les oligopeptides d'acides (OA) représentent une solution très attractive pour cibler l'os dû à leur faible toxicité, surtout en comparaison aux BPs et aux tétracyclines.[175] Ils ont des demi-vies plus faibles pour traiter une maladie osseuse aigue : les tétracyclines et les phosphonates peuvent avoir des demi-vies qui se comptent en année contrairement à celles, en heures, des OA.

La sialoprotéine osseuse est l'une des nombreuses protéines naturelles qui a une forte affinité pour la HAp.[176] Ces protéines contiennent en effet des parties de leur séquence composées d'acides aminés (AA) dits acides comme l'acide glutamique (jusqu'à 22 %). De nombreuses études rapportent que plusieurs types d'oligopeptides comme l'acide polyaspartique ou l'acide polyglutamique s'accumulent dans les os après une injection intra veineuse.[175,177]

Ce sont les chaines latérales carboxyliques de ces AA qui sont certainement responsables de la chélation du calcium au niveau des os et de leur affinité pour la HAp. Ainsi, l'affinité de ces protéines pour la HAp augmente si le nombre d'unités aspartate ou glutamate augmente.[178]

En se basant sur le modèle de la sialoproteine, les oligopeptides d'acide (OA) glutamique et d'acide aspartique de 4 à 10 acides aminés (AA) offrent une option biocompatible.

Dans une revue d'Ishizaki *& al.*[179] de nombreuses applications de ces oligopeptides acides dans le transport de divers médicaments sont décrites: estradiol, antibiotiques, quinolones. Ces composés ont été conjugués au moyen d'un ester d'acide succinique.

Cela reste néanmoins des peptides qui peuvent donc se dégrader facilement.

ii) Les polyphosphonates polymériques

Le mécanisme d'adsorption de ces polymères sur les os est encore spéculatif. Plusieurs explications sont possibles allant de la simple physisorption sur la surface osseuse à son incorporation (chimisorption) lors du processus de minéralisation ou une combinaison des deux. D'autres facteurs tels que la solubilité du complexe, la calcification du ligand, la transchélation au sein de la matrice d'hydroxyapatite, et les effets du radionucléide peuvent influencer l'absorption osseuse. Ce qui semble clair, c'est que cette adsorption doive prendre place au niveau de la matrice minérale (HAp) et très peu au sein de la matrice organique (collagène).

Une étude sur un polyphosphonate a montré une relative sélectivité vis-à-vis du compartiment osseux : on présume une affinité des groupements phosphonates (chargés négativement) pour la HAp (chargée positivement *via* ses ions Ca^{2+}) (Figure 30).[180]

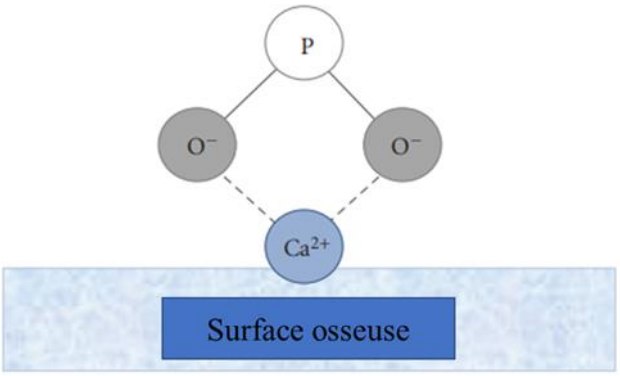


Figure 30 : Pont entre les oxygènes du groupement phosphate et les cations Ca^{2+} présents au sein de la matrice osseuse.

A l'instar des bisphosphonates ou de son analogue court, l'éthylènediaminetétraméthylène-phosphonate (EDTMP) (Quadramet®), le PEI-MP a été envisagé comme agent de délivrance de radionucléides à des fins thérapeutiques pour augmenter l'import et cibler des tumeurs osseuses. Des études très poussées sur des primates ont été réalisées sur la biodistribution ainsi que les paramètres pharmacocinétiques ($t_{1/2}$, % incorporés et excrétion) de ces complexes avec certains radionucléides en fonction de leur poids moléculaire.[181,182] Les données sont rassemblées dans les Tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : Temps de demi-vie de résidence et biodistribution (durant les 4 premières heures) dans les organes de complexes PEI-MP-^{99m}Tc de différents poids moléculaires injectés via intraveineuse (i.v) à des babouins. L'excrétion urinaire cumulée est présentée en pourcentage (% de la dose injectée) et le $t_{1/2}$ de la clairance sanguine en minutes.

Fractions (kDa)	Temps de demi-vie (min) et pourcentage de charge						Clairance sanguine $t_{1/2}$ (min)	Taux d'excrétion 4h après injection
^{99m}Tc	Os cortical	Poumons	Foie	Sang	Rate	Reins		Urines
3-10 (n=4)	>2 h 8 ± 1 %	10 ± 1,5 8 ± 2 %	90 ± 22 16 ± 1 %	10 ± 1 15 ± 4 %	75 ± 2 10 ± 1 %	> 4 h 36 ± 4 %	5	40,6 %
10-30 (n=4)	**> 4 h** **18 ± 1 %**	15 ± 3 12,5 ± 4 %	22 ± 3 20 ± 2 %	10 ± 1.5 15 ± 3 %	60 ± 9 12,5 ± 1 %	20 ± 3 18 ± 4 %	6	52,8 %
30-50 (n=4)	> 4 h 9 ± 0,5 %	8± 2 7,5 ± 2 %	60 ± 15 20 ± 2 %	6 ± 2 10 ± 4 %	45 ± 8 8 ± 3 %	> 4 h 40 ± 5 %	/	62 %
50-100 (n=4)	> 24 ± 2 h 7 ± 0,5 %	22 ± 2 9 ± 3 %	> 4 h 43 ± 3 %	12 ± 1,5 15 ± 4 %	> 4 h 8 ± 0,5 %	> 4 h 15 ± 2 %	/	28,2 %
100-300 (n=4)	/	2,5 ± 0,5 h 7,5 ± 2 %	24 h ± 1,5 h 57 ± 9 %	2,5 ± 0,1 30 ± 7 %	>24 h ± 2 h 5,5 ± 2 %	/	/	12,2 %

Tableau 10 : Temps de demi-vie de résidence et biodistribution (entre 2 et 3 h post injection) dans les organes de complexes PEI-MP-^{117m}Sn de différents poids moléculaires injectés via intraveineuse (iv) à des babouins. L'excrétion urinaire cumulée est présentée en pourcentage (% de la dose injectée) et le $t_{1/2}$ de la clairance sanguine en min.

Fractions (kDa)	Temps de demi-vie (min) et pourcentage de charge						Clairance sanguine $t_{1/2}$ (min)	Taux d'excrétion 4h après injection
^{117m}Sn	Os cortical	Poumons	Foie	Sang	Rate	Reins		Urines
3-8 (n=1)	> 4 h 22 %	12 13 %	10 13 %	8 17 %	11 (estimation)	12 13 %	12	55 %
8-10 (n=1)	> 4 h 5 %	> 4 h 16 %	> 4 h 24 %	22 22 %	< 4 h 10 %	10 13 %	20	25 %
10-30 (n=3)	**> 4 h 5 ± 1,3 %**	120 11 ± 1,4 %	> 4 h 23 ± 1%	44 ± 12 24 ± 2,7 %	> 4 h 10 ± 1,3 %	30 ± 6 15 ± 1,1 %	5	40 %

Zeevaart *& al*. ont ainsi pu montrer que le PEI-MP, dopé en partie de radionucléides (^{99m}Tc, ^{153}Sm), pouvait cibler l'os après injection i.v chez le chien.[183] Dormehl *& al*. ont démontré, chez les primates, que le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) et le pourcentage d'absorption des complexes ^{99m}Tc-PEI-MP, dans divers compartiments, pouvaient être modulés selon la fraction massique du polymère. La même étude a également permis de corréler l'excrétion de ces complexes par les reins, en fonction de diverses fractions massiques (kDa) du polymère.[181] De ces études, ils concluent que la fraction de taille 10-30 kDa semble être la plus appropriée pour la thérapie radio-isotopique, avec une absorption plus faible et un $t_{1/2}$ plus court dans le foie et les reins, tout en ayant l'absorption osseuse la plus élevée.

Dans le cas de la contamination par les actinides, et plus particulièrement dans le cas de l'invasion osseuse par le Pu(IV), nous avons donc envisagé une approche similaire avec l'utilisation de nos polymères chélatants (PEI-MC et PEI-MP) comme candidats potentiels. Le PEI-MP, plus particulièrement, devrait présenter des capacités de ciblage de l'os.

Après s'être adsorbé sur l'os (simulé par HAp dans notre étude), il pourrait se comporter comme un décorporant et extraire l'actinide(IV) à condition que les profils thermodynamiques et cinétiques (adsorption/désorption du ligand et des complexes) soient compatibles/adaptables à l'utilisation biologique visée.

Etant donné que le foie ou même les reins (dans le cas d'une contamination par U) pourraient également être des cibles pertinentes, nous avons décidé, dans un premier temps de ne pas fractionner nos polymères chélatants à l'exception des plus petites tailles (< 5 kDa) qui ont été éliminées par ultrafiltration (voir partie expérimentale § B.I. et § B.II.).

Dans le travail qui suit, nous allons étudier la décorporation, à partir d'une matrice HAp contaminée, du Th(IV), utilisé comme substitut au Pu(IV), avec nos polymères et le DTPA utilisé comme composé de référence. La méthodologie appliquée a consisté à étudier :

- L'affinité des différents chélates vis-à-vis de la HAp.
- Un procédé de contamination reproductible de HAp par le Th.
- Les profils dose-réponse ainsi que les profils cinétiques de décontamination associés aux différents modèles.
- La toxicité des différents chélates sur des cellules constitutives des os (ostéocytes et ostéoblastes).

III Effet des polymères chélatants sur une matrice minérale (HAp) biomimétique de l'os en cas de contamination par des actinides (Th, Pu)

a. Affinité des molécules chélatantes vis-à-vis de la HAp

Afin d'évaluer la capacité de nos polymères chélatants à cibler la matrice osseuse, leur affinité vis-à-vis de HAp (sous forme de poudre) a été mesurée par analyse thermogravimétrique (ATG). Brièvement, la poudre de HAp a été mise en contact avec des solutions de DTPA (utilisé comme référence) de PEI-MC et de PEI-MP de même concentration en unité chélatante. Après plusieurs lavages, pour éliminer la fraction libre de chélates, la poudre de HAp a été récupérée (partie expérimentale § C.I.a.) et la perte de masse due à la dégradation thermique des molécules chélatantes liées à la HAp a été mesurée. Un blanc a par ailleurs été réalisé avec de la HAp seule.

La Figure 31 représente les courbes ATG de chacun des lots. Par confort de lecture, tous les thermogrammes ont été normalisés afin que leur 100 % (masse de départ) correspondent.

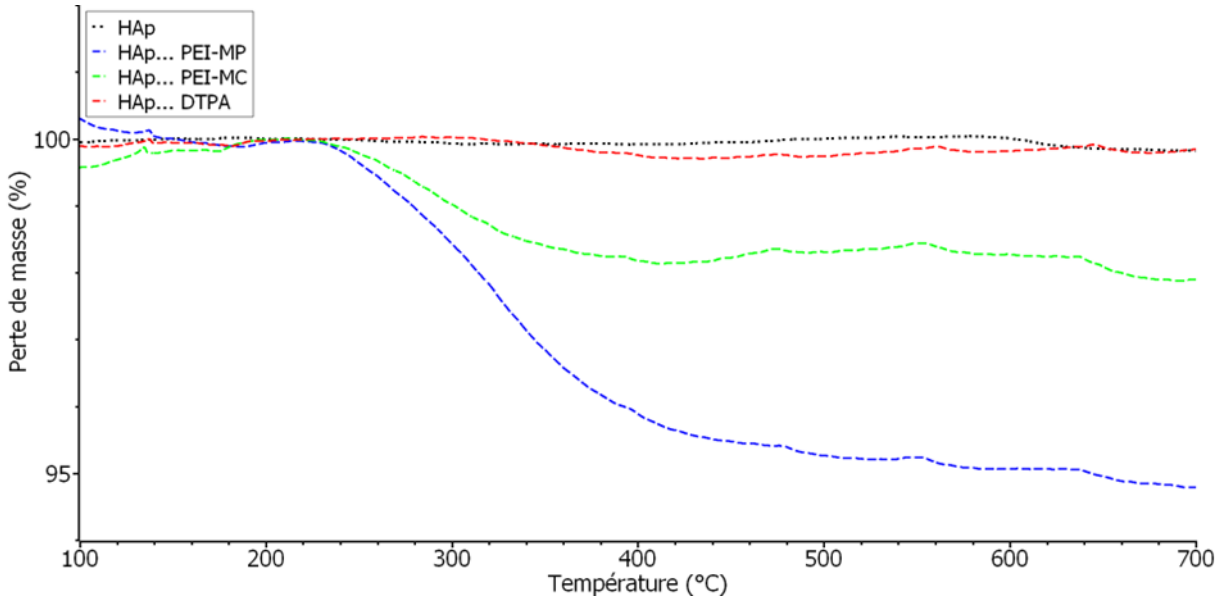


Figure 31 : Thermogrammes de la HAp (blanc, en noir), HAp … PEI-MP (en bleu), HAp…PEI-MC (en vert) et HAp... DTPA (en rouge) dans une gamme de température de 100 à 700 °C montrant la perte de masse due à la dégradation thermique des chélates sorbés sur HAp.

A partir d'un rapport initial, molécules chélatantes : HAp, constant, on observe que la perte de masse augmente de façon croissante, du DTPA au PEI-MP. En effet, alors que l'adsorption du DTPA sur HAp est négligeable (0,3 %), on observe une perte de masse de 1,8 % pour le PEI-MC, l'analogue polymérique du DTPA. Ainsi, la forme polymérique semble conférer de meilleure capacité d'adsorption sur la HAp. Le PEI-MP montre l'affinité la plus élevée pour la HAp avec une perte de masse d'environ 4,7 %. Cette expérience met en évidence une meilleure affinité des polymères, notamment du PEI-MP, pour la matrice osseuse. On peut calculer que le PEI-MC et le PEI-MP ont une affinité 6 et 15 fois supérieure respectivement pour la HAp, par rapport au DTPA. Ceci permet de calculer une affinité de 0,042 µmol de PEI-MP / µmol de HAp.

b. Contamination de la matrice osseuse et caractérisation physico-chimique du complexe HAp-Th

i) Utilisation du carbonate de thorium pour la contamination de la HAp

Le thorium étant sensible à l'hydrolyse à pH physiologique, il est nécessaire de le protéger de cette réaction grâce à un ligand chélateur. Pour ce faire, les anions carbonates ont été choisis.

Nous avons ainsi, à partir de nitrate de thorium, généré du carbonate de thorium. Le protocole de préparation de la solution de carbonate de thorium est disponible en partie expérimentale (§ C.I.b.i et C.I.b.ii). Dans les conditions expérimentales utilisées (pH = 9, 0,2 M < $[Carbonates]_{tot}$ < 2 M), il est admis que l'espèce majoritaire formée est le complexe pentacarbonate[184] de formule $Th(CO_3)_5^{6-}$.

$$Th^{4+} + 5\ CO_3^{2-} \Leftrightarrow Th\ (CO_3)_5^{\ 6-}$$

$$Log_{10}\beta°_{105}\,(Th\ (CO_3)_5^{6-},\ 298{,}15\ K,\ I=0) = 31{,}0 \pm 0{,}7$$

La formation de ce complexe permet de stabiliser le thorium sous forme soluble dans la gamme de pH utilisée dans notre étude.

De plus, les ions carbonates sont retrouvés dans le sérum à des concentrations variant entre 22 à 26 mM.[185]

Ainsi, comme précisé dans la revue bibliographique, il est possible qu'une fraction du Pu se solubilise et rejoigne la circulation générale, il est donc probable qu'il soit par la suite complexé par des anions carbonates avant d'aller se déposer sur le squelette. Par ailleurs la matrice biomimétique de l'os utilisée, l'hydroxyapatite (HAp), peut contenir jusqu'à 8 % en masse d'ion carbonate,[186] l'utilisation de cet anion en tant que ligand protecteur permet ainsi de mimer, de façon simpliste certes, une situation physiologique et d'éviter l'ajout d'agents supplémentaires, qui seraient absents du milieu biologique.

La HAp a été contaminée par un processus d'échange d'ions (voir partie expérimentale § C.I.b.iii). Ainsi la HAp a été mise en contact de carbonate de thorium, durant 48 h puis soumise à trois cycles de centrifugation/lavage jusqu'à ce que plus aucune trace de thorium ne soit détectable (< 0,1 ppb) dans le filtrat (mesuré par ICP-MS). Après isolement, la quantité de thorium incorporée au sein de la HAp est également mesurée par ICP-MS. On obtient ainsi des taux de 7000 ppm de Th dans HAp (n = 3, 6 échantillons indépendants).

Il est important de noter que cette procédure permet de contrôler, de façon très précise le taux d'incorporation de Th au sein de la HAp, que ce taux de contamination est extrêmement reproductible et que la contamination au sein de la HAp est homogène. Les taux de Th obtenus au sein de différents lots de HAp, contaminés selon cette procédure, sont disponibles en annexe III.

Bien que le taux de contamination en thorium semble particulièrement élevé (0,7 %), il faut noter que la dose léthale de Pu, $DL_{50}(30)$, par i.v, pour une personne de 70 kg a été estimée à 22 mg.[12] Le squelette représentant 15 % du poids total d'un corps et la HAp 70 % de la masse osseuse, on arrive, pour le Pu, à une $DL_{50}(30)$ ~ 3 mg/kg (soit 3 ppm) de HAp. Au vu de la faible activité spécifique du Th, il est certain que la $DL_{50}(30)$ est bien plus élevée que celle du plutonium. Par ailleurs on peut considérer que le plutonium ne serait pas réparti uniformément au sein du squelette, mais plutôt sous forme de « points chauds », dans des régions où l'os est hautement vascularisé, du moins dans un premier temps (avant remodelage) .[187,188] D'autre part, ce taux est compatible avec des méthodes de dosage du thorium extrait par les molécules chélatantes en ICP-MS et pour la réalisation de spectres EXAFS exploitables dans un délai d'acquisition raisonnable.

ii) EXAFS du complexe HAp-Th

Afin de s'assurer que le Th(IV) ait été totalement incorporé (chimisorbé) au sein de la matrice HAp et pas seulement adsorbé (physisorbé) sous la forme de carbonate à sa surface, la spéciation du Th au sein de HAp a été analysée par spectroscopie EXAFS. Ce spectre pourra ainsi constituer un spectre de référence qui pourra ensuite être comparé à ceux issus des complexes chélates…Th tels que DTPA…Th, PEI-MC…Th ou PEI-MP…Th après que l'expérience de décontamination aura été effectuée. Le spectre EXAFS de la HAp contaminée a été enregistré au seuil L_{III} du thorium (16 300 eV). Les protocoles détaillés concernant la préparation d'échantillons et les paramètres d'ajustement sont consultables en partie expérimentale § C.II.b.

La Figure 32 présente le signal EXAFS et la courbe ajustée en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le Tableau 11.

Le spectre HAp-Th a pu être ajusté avec des oxygènes en première sphère de coordination et des phosphores en seconde sphère, ceci semble donc indiquer que le Th s'est bien incorporé au sein des phosphates de la matrice HAp. La distance moyenne des oxygènes en première sphère de coordination (2,46 Å) est très proche de la distance moyenne (2,44 Å) au sein d'un diphosphate de thorium phosphate[189] de formule $Th_4(PO_4)_4P_2O_7$. Les atomes de phosphore sont à une distance de 3,21 Å et 3,81 Å pour la plus faible et la plus longue distance respectivement, correspondant à un mélange de phosphates bidentes (pour la plus longue) et monodentes (pour la plus courte). L'ajustement n'est pas significativement amélioré en ajoutant des contributions Th-Th, le thorium semble donc bien dispersé au sein de la matrice et ne forme pas de clusters. Cette observation corrobore la mesure réalisée en ICP-MS, indiquant une homogénéité de la répartition du Th au sein de la matrice.

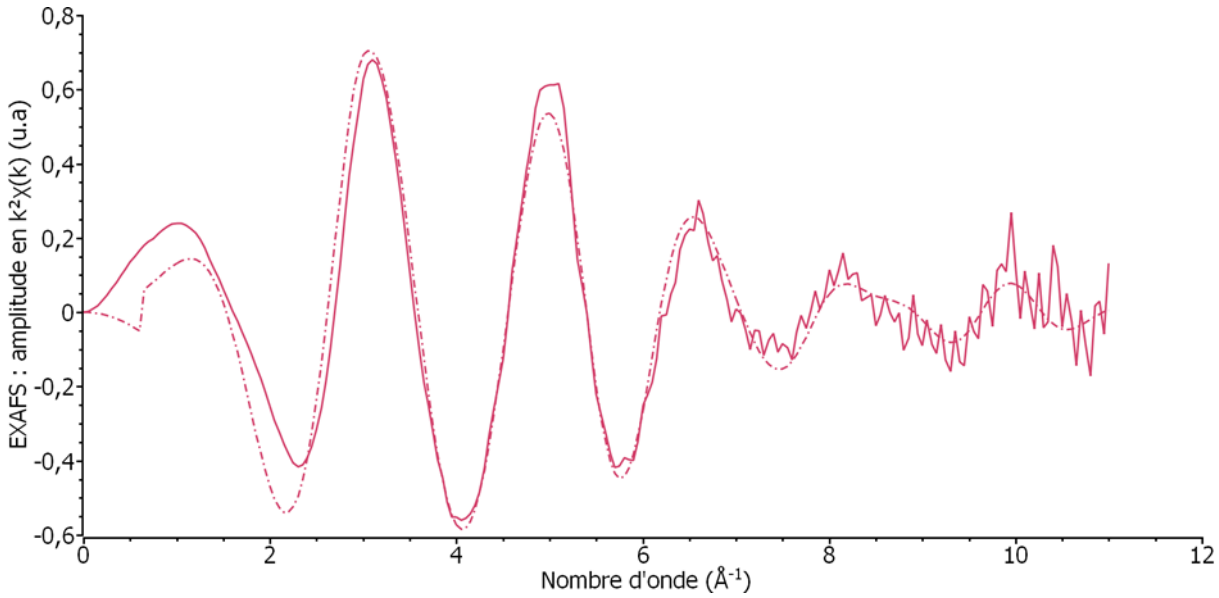


Figure 32 : Spectre EXAFS du complexe HAp-Th au seuil L_{III} du thorium. La courbe ajustée est en pointillés.

Tableau 11 : Paramètres structurels obtenus par le meilleur ajustement du spectre EXAFS de la HAp-Th en conditions pseudophysiologiques.[a]

Echantillon	1ère sphère de coordination	2nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
HAp-Th	3 O at 2,36 (4) Å	1 P at 3,21 (3) Å	S_0^2 = 1,0
	σ^2 = 0,0081 Å²	σ^2 = 0,0067 Å²	e_0 = 1,55 eV
	4 O at 2,46 (3) Å	6 P at 3,81 (6) Å	$R_{facteur}$ = 3,2 %
	σ^2 = 0,0081 Å²	σ^2 = 0,0168 Å²	Q = 15
	2 O at 2,59 (6) Å		
	σ^2 = 0,0081 Å²		

[a] σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie. S_0^2 est le facteur d'amplitude. $R_{facteur}$ est le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité. L'incertitude sur le dernier chiffre est notée entre parenthèses.

Par ailleurs, un meilleur ajustement du spectre peut être obtenu en remplaçant la contribution d'un phosphore par celle d'un anion carbonate ($R_{facteur}$ = 2,6 % contre 3,2 %).

Au final, le spectre EXAFS ne permet cependant pas de conclure définitivement sur la présence ou non d'anion carbonate dans la sphère de coordination du Th au sein de la matrice osseuse d'hydroxyapatite, cette matrice pouvant elle-même contenir naturellement des ions carbonates.[186] Néanmoins, il est important de noter que le spectre ne peut être ajusté avec la seule contribution du carbonate de thorium sous sa forme pentacarbonate[190] Ainsi, le thorium au sein de la HAp n'est plus sous la forme d'un pur carbonate de thorium. On peut donc considérer que le Th n'est donc pas physisorbé (simple adsorption du sel initial sur la surface HAp) mais bien chimisorbé au sein de cette même matrice de HAp.

c. Décontamination de la matrice osseuse par des molécules chélatantes

i) Aspects thermodynamiques : courbes dose/réponse du système chélate/HAp…Th en conditions physiologiques

La capacité des molécules chélatantes (PEI-MC, PEI-MP et DTPA) à extraire le thorium de la matrice osseuse contaminée (HAp…Th) a été étudiée au moyen d'expériences de type « dose/réponse ».

Pour des raisons expérimentales, le milieu biologique a été simplifié par une solution aqueuse de tampon trishydroxyméthylaminométhane (Tris) en milieu salin, abrégé par la suite en TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl), à pH 7,4.

Pour déterminer la capacité du PEI-MC, PEI-MP et DTPA à extraire le thorium de la HAp contaminée, des concentrations (en 1-mer de chélate) croissantes (de 0 (blanc) à 10 mM) dans un volume fixe (1,5 mL) de TBS, de chélates mono- (DTPA) ou polymériques (PEI-MC/MP) ont été ajoutées à une masse fixe (5 mg) de HAp contaminée (0,7 % en Th). Après 8 jours, 500 µL de surnageant ont été récupérés après centrifugation (15 000 rpm, 15 min), minéralisés puis dosés en thorium par ICP-MS (voir partie expérimentale § C.II.a). Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Pour chaque expérience, la HAp a été aussi minéralisée après 8 jours afin de déterminer le pourcentage de thorium restant lié à la matrice osseuse (non décontaminé) pour s'assurer qu'on retrouve bien 100 % du thorium initial (voir annexe IV). Les résultats sont représentés sous forme d'un graphique exprimant le pourcentage de thorium récupéré dans le filtrat, en fonction de la concentration initiale en monomères de molécules chélatantes. Chaque point représente la moyenne de 3 expériences (± écart type).

Les courbes dose/réponse ainsi obtenues ont été ajustées par une équation logistique à quatre paramètres de la forme : $\text{Réponse} = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / [1+(CE_{50}/\text{dose})^{\text{Hill}}]$ avec Réponse = % Th décontaminé; dose = 1-mer (mM) ; min = réponse en l'absence de chélate (blanc) ; max = plateau; CE_{50} = dose requise pour obtenir une réponse de 50% ; Hill = pente à CE_{50}.

Les valeurs des paramètres correspondant pour chaque complexe ainsi que les courbes ajustées sont présentées ci-dessous (Tableau 12 et Figure 33).

Tableau 12 : Paramètres des courbes dose/réponse pour le complexe DTPA-HAp-Th et PEI-MP-HAp-Th.

Paramètres	min	max	CE_{50} (mM)	Hill	R^2
DTPA-HAp-Th	0,75	16,7	1,88	3,68	0,994
PEI-MP-HAp-Th	0,75	28,8	1,43	3,39	0,991

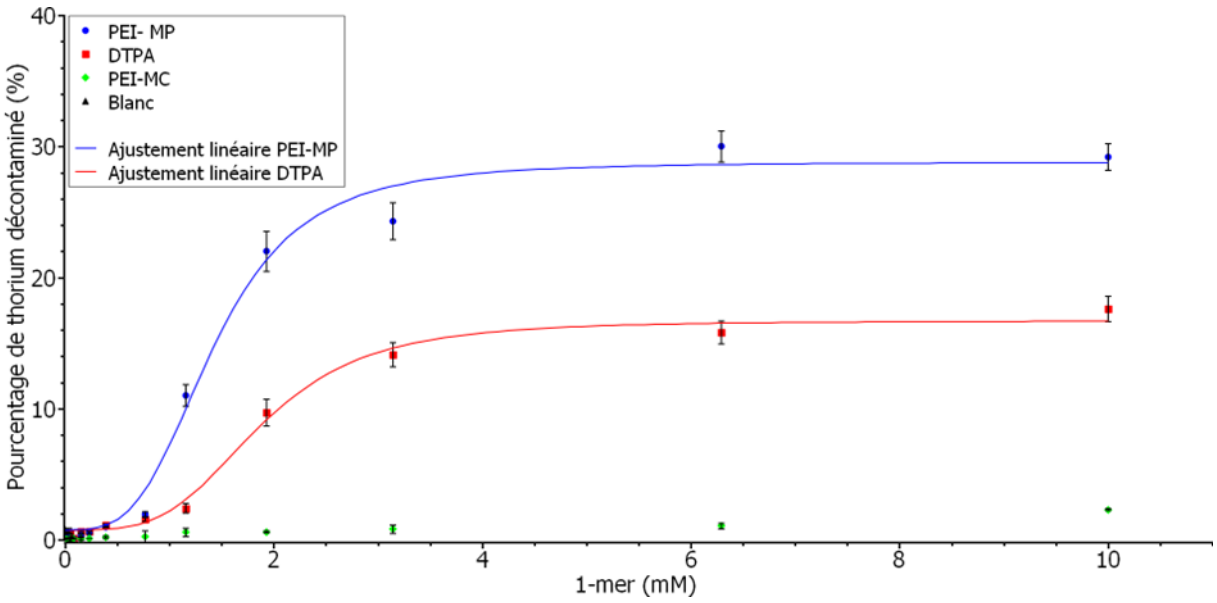


Figure 33 : Courbes dose/réponse HAp…Th (5 mg, 0,7 % Th) en fonction de la concentration en chélate (1-mer) dans 1,5 mL de TBS à j_8 (expériences réalisées à 21 °C).

Tout d'abord, et malgré une meilleure affinité pour HAp (facteur 6 par rapport au DTPA, voir les résultats ATG), le PEI-MC a montré des résultats décevants.

En effet, la teneur maximale en Th, 2,3 %, récupérée dans le filtrat, s'est révélée aussi faible qu'avec le blanc (0,75 %). Ceci pourrait être dû soit à une cinétique de désorption beaucoup plus défavorable des complexes PEI-MC…Th à partir de HAp, soit à une précipitation de ces complexes. Deuxièmement, malgré des valeurs similaires de CE_{50} et des facteurs de Hill (c'est-à-dire la pente à la CE_{50} qui décrit la variation de la transition entre la partie concave, accélération, et celle convexe, décélération, de la sigmoïde), l'efficacité (valeur maximale au plateau) diffère fortement entre le PEI-MP et la référence (DTPA).

Les deux présentent incontestablement des capacités de décontamination, cependant le polymère phosphonate est presque deux fois plus efficace : 29 % contre 17 % pour le DTPA. Ce résultat est sans aucun doute significatif. En effet, le DTPA a peu de chances d'atteindre le site de séquestration des actinides en raison de sa faible biodisponibilité, à moins qu'il ne soit injecté localement à proximité de l'os contaminé. Cependant, et même dans ce cas particulier, son activité serait limitée en raison de sa faible affinité pour la partie minérale de la matrice osseuse, c'est-à-dire la HAp.

Au contraire, l'aspect thermodynamique lié à l'utilisation de PEI-MP semble plus favorable : affinité plus élevée envers la HAp et efficacité 2 fois meilleure pour extraire le Th(IV). En outre, la biodistribution, le $t_{1/2}$, l'affinité et l'absorption sont tous compatibles avec l'objectif envisagé comme nous l'avons vu dans les études menées par Jarvis *& al.*[183]

La concentration minimale en 1-mer nécessaire pour obtenir une décontamination maximale dans les conditions expérimentales a été déterminée et fixée à 6,3 mM : juste après avoir atteint le plateau et en dessous du seuil de toxicité du DTPA (voir partie liée à la toxicité sur les cellules osseuses). Cette concentration, correspondant à un rapport molaire 1-mer/Th ~ 60, a été utilisée pour étudier la cinétique de décontamination avec les chélates (voir partie cinétique ci-après).

ii) Etude de la décontamination de HAp…Th par spectroscopie EXAFS : comparaison des complexes PEI-MP…Th et PEI-MP…Th/HAp

Afin de confirmer l'implication totale du PEI-MP dans l'extraction du Th au niveau de HAp, nous avons utilisé la spectroscopie EXAFS et étudié la spéciation du Th. Le spectre EXAFS du complexe à l'issu de l'expérience de décontamination, que l'on notera PEI-MP…Th/HAp a ainsi été comparé à celui de PEI-MP…Th, issu d'une simple mise en contact du PEI-MP avec du thorium. Ainsi, le complexe PEI-MP…Th (référence) a été préparé à partir d'une solution stock de nitrate de thorium $Th(NO_3)_4$ (2,5 mM, pH 1) et d'une solution de PEI-MP (5 mM) afin d'obtenir un rapport Th(IV) : monomère de PEI-MP de 0,1.

Le spectre EXAFS a été enregistré dans le TBS à pH 7,4.

Le complexe PEI-MP…Th/HAp a, quant à lui, été préparé en utilisant directement un échantillon issu de l'expérience dose-réponse. 1,5 mL de surnageant ont été prélevés puis centrifugés (12 000 g, 5 min, 20 °C) sur filtre Microcon ® (10 kDa), afin de concentrer suffisamment l'échantillon pour permettre l'expérience EXAFS. Les protocoles détaillés concernant la préparation d'échantillon et l'ajustement des spectres sont consultables en partie expérimentale § C.II.b

La Figure 34 représente le signal EXAFS des complexes PEI-MP…Th et PEI-MP…Th/HAp, enregistré au seuil L_{III} du thorium. Les courbes ajustées sont représentées en pointillés. Les paramètres d'ajustement sont reportés dans le Tableau 13.

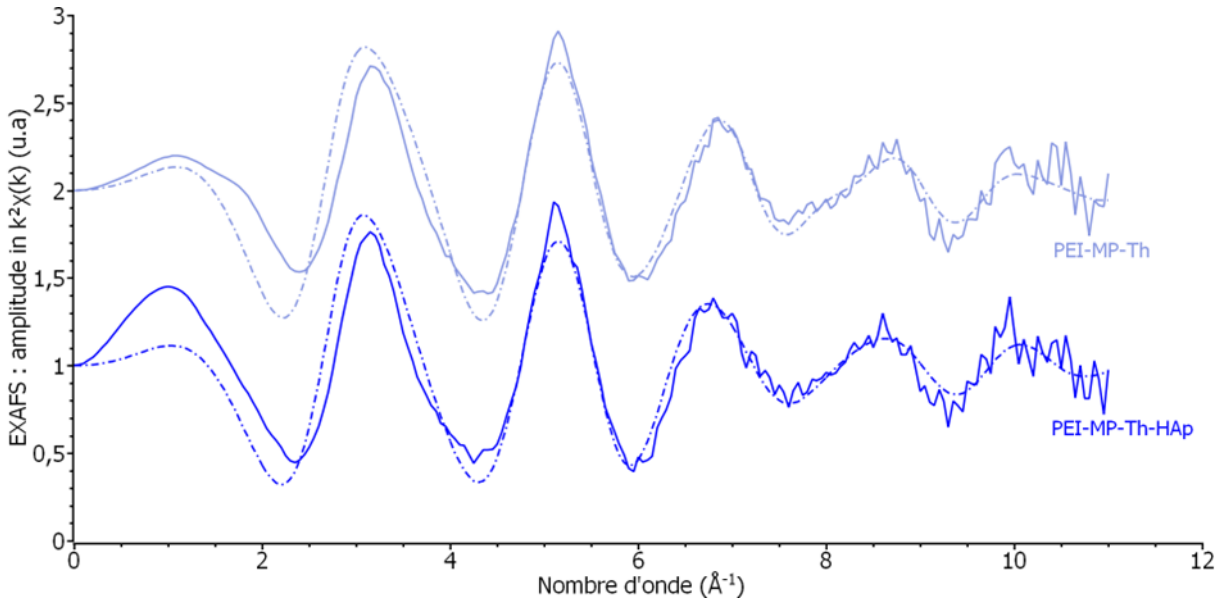


Figure 34 : Spectre EXAFS du complexe PEI-MP…Th (en bleu clair), et du complexe PEI-MP…Th/HAp (en bleu foncé) au seuil L_{III} du thorium. Les courbes ajustées sont en pointillés.

Tableau 13 : Paramètres structurels obtenus par le meilleur ajustement des spectres EXAFS des systèmes PEI-MP…Th et PEI-MP…Th/HAp en conditions pseudophysiologiques .[a]

Echantillons	1ère sphère de coordination	2nd sphère de coordination	Paramètres d'ajustement
PEI-MP…Th	9 O at 2,36 (1) Å σ^2 = 0,0108 Å²	3 P at 3,88 (4) Å σ^2 = 0,0101 Å² 1.8 Cl at 3.13 (3) Å σ^2 = 0,0117 Å²	S_{02} = 1,0 e_0 = -0,07 eV R_{factor} = 5,4 % Q = 68
PEI-MP…Th/HAp	9 O at 2,37 (2) Å σ^2 = 0,0111 Å²	3 P at 3,82 (9) Å σ^2 = 0,0177 Å² 1,8 Cl at 3,14 (4) Å σ^2 = 0,0096 Å²	S_{02} = 1,0 e_0 = -0,33 eV R_{factor} = 5,5 % Q = 52

[a] σ^2 est le facteur de Debye-Waller rendant compte du désordre, e_0 est l'ajustement en énergie. S_0^2 est le facteur d'amplitude. $R_{facteur}$ est le facteur d'accord et Q est le facteur de qualité. L'incertitude sur le dernier chiffre est notée entre parenthèses.

Les sphères de coordination sont très similaires dans les deux cas. Le spectre EXAFS du PEI-MP… Th est très similaire à celui du PEI-MP…Th/HAp, qui tous deux sont différents du spectre Th…HAp. Cela concorde avec l'efficacité du PEI-MP observée lors de l'étude cinétique, qui est à même de déplacer l'équilibre HAp… Th en faveur du polymère. De plus, les distances Th-O et Th-P obtenues par l'ajustement des données EXAFS sont caractéristiques d'une coordination monodente d'un atome de thorium (IV) avec les fonctions phosphonates d'un phosphopeptide[30] (2,34 Å pour la distance Th -O (P)) et en accord avec celles rapportées lors d'une précédente étude de notre groupe.[112]

Il est assez remarquable que, quel que soit le mode de préparation du complexe PEI-MP…Th, *via* NTA (acide nitrilotriacétique) lors de la précédente étude, et sans ligand protecteur dans cette étude, des paramètres d'ajustement très similaires aient pu être obtenus.

La présence de chlore dans la seconde sphère de coordination, quoique surprenante, provient probablement de l'utilisation de chlorure de sodium nécessaire pour fixer la force ionique du tampon TBS ([NaCl] = 150 mM). L'utilisation de la contribution du chlore en seconde sphère de coordination afin d'améliorer l'ajustement avait été aussi observée lors de la précédente étude de F.Lahrouch .[112]

En conclusion, l'analyse EXAFS nous apporte la confirmation, par l'utilisation d'une autre technique, que le PEI-MP présente une efficacité pour décontaminer le Th chimisorbé au sein de la matrice HAp.

iii) Aspects cinétiques : vitesse et pourcentage d'extraction du système chélate/HAp…Th en conditions physiologiques

Nous avons ensuite étudié la cinétique, à 6,3 mM (concentration expérimentale minimale de 1-mer nécessaire pour atteindre la meilleure efficacité d'extraction du Th avec le DTPA et le PEI-MP) pour voir s'il serait possible ou non d'améliorer l'efficacité maximale que nous avons obtenue à j_8 (voir partie : aspects thermodynamiques). Le protocole est disponible en partie expérimentale (§ C.II.c). Les résultats sont présentés dans la Figure 35. Encore une fois, la teneur complémentaire en Th a été vérifiée pour s'assurer d'une récupération à 100 % (annexe IV.2). Comme pour la partie « aspects thermodynamiques », les courbes ont été ajustées avec une équation à 4 paramètres avec le paramètre "min" fixé à 3,4 (valeur du blanc moyen sur toute la période).

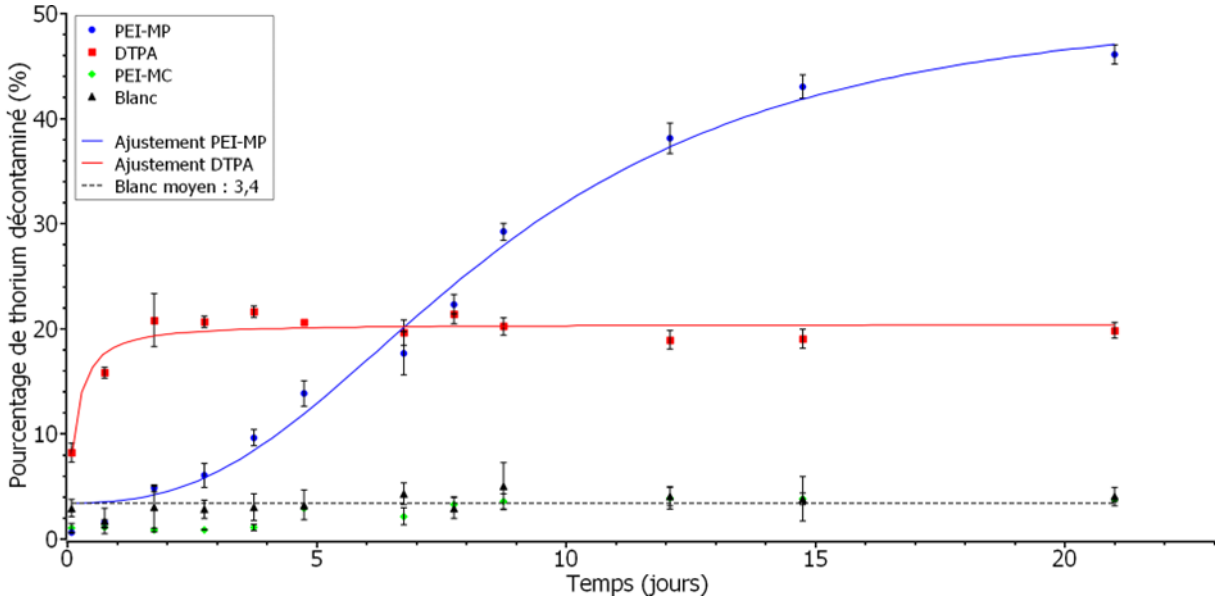


Figure 35 : Cinétique de décontamination, sur 21 jours, de HAp…Th (5 mg, 0,7 % Th) en présence de chélate (6,3 mM en 1-mer) dans 1,5 mL de TBS (expériences réalisées à 21 °C).

Tout d'abord, la décontamination due à la solubilisation et/ou à la libération de Th à partir de HAp seule est marginale (3,4 % ± 1,3) comme on peut le voir avec les échantillons de blanc tout au long de la période de temps. Cette valeur moyenne peut être attribuée aux ions phosphate libérés de la HAp à l'équilibre dans le TBS. Deuxièmement, l'extraction de Th par le PEI-MC (carboxylate) reste, là aussi, très inefficace avec des valeurs du même ordre de grandeur que les blancs. Plus important encore, là encore, des différences notables de comportement sont observées entre le DTPA et le PEI-MP. La cinétique de décontamination du DTPA est très rapide, avec la valeur la plus élevée obtenue à j_2, mais atteint un plateau, à 20 %, qui ne peut être dépassé quel que soit le temps d'incubation. Il faut également souligner le fait que cette valeur d'efficacité maximale ne peut pas être augmentée même en utilisant une concentration en chélate plus élevée comme on l'a vu précédemment avec la courbe dose/réponse. Au contraire, la cinétique découlant de l'utilisation de PEI-MP est beaucoup plus lente. Ainsi, une efficacité comparable à celle du DTPA est égalée aux jours 6-7. Cependant, et contrairement à la tendance obtenue avec DTPA, la décontamination du Th continue d'augmenter tout au long de la période de temps utilisée de 21 jours même si elle s'infléchit vers la fin de la période. Il est frappant de constater que l'efficacité maximale atteint une valeur maximale de 46 % au 21ème jour, soit une efficacité d'extraction 2 fois supérieure à celle du DTPA.

Par ailleurs, il faut noter que l'extraction de Th à j_8, 29 %, reste conforme avec la valeur trouvée lors de l'expérience dose-réponse (30 %). De plus, lorsque le filtrat a été remplacé à j_{12} (35,8 % d'extraction de Th) par un échantillon frais de PEI-MP (6,3 mM en 1-mer), la décontamination cumulée de Th atteint 64,9 % à j_{21} (Tableau 14). Cela indique qu'avec le PEI-MP, un traitement séquentiel additionnel pourrait permettre une récupération presque complète de tout le contenu en Th mobilisable.

Tableau 14 : Effet de l'administration cumulée d'une dose de PEI-MP.

	% Th extrait à j_{12}	**% total Th extrait à j_{21}**
1 dose seulement à j_1	38,2 ± 0,8	46,1 ± 0,5
2 doses [a]	35,8 ± 0,5	64,9 ± 1,0

[a] expérience indépendante: le milieu a été retiré à j_{12} et remplacé par un échantillon frais de PEI-MP (6,3 mM 1-mer)

Plus important encore, ces résultats indiquent également que, contrairement au DTPA, la désorption des complexes PEI-MP…Th à partir de HAp contaminée est un processus lent dépendant qui, une fois la dose efficace atteinte, déplace du Th de façon continue hors de la matrice HAp. Il faut également noter que nous avons utilisé ici des conditions particulièrement défavorables où la HAp est plutôt fortement contaminée (0,7 % en Th). Malgré ces conditions, le PEI-MP a montré des capacités intéressantes à extraire le Th(IV) même si la cinétique est lente. *In vivo*, ceci pourrait éventuellement être compensé/modulé par sa plus grande affinité pour la HAp, en ajustant la fraction massique du polymère et donc l'équilibre de désorption du HAp et/ou en l'utilisant en combinaison avec le DTPA, même si on sait maintenant que le DTPA n'agirait qu'au tout début de la contamination, sur des formes solubles (en circulation) et qu'il est peu enclin à se retrouver distribué à proximité de la matrice osseuse à cause de son excrétion rapide et sa biodistribution limitée.

d. Tests de cytotoxicité sur les cellules osseuses

Parmi les quatre lignées cellulaires d'ostéocytes existantes, nous avons choisi d'utiliser la lignée MLO-A5 pour notre étude. C'est une des lignées les plus utilisées dans la littérature ; elle modélise un stade intermédiaire entre les ostéoblastes et les ostéocytes : les ostéocytes ostéoides.

Les tests de cytotoxicité ont été aussi réalisés sur des cellules SAOS-2 qui représentent une lignée de cellules ostéoblastiques.

Ces tests ont été réalisés au sein du laboratoire TIRO-MATOs (Transporteurs, Imagerie ET Radiothérapie en Oncologie - Mécanismes Biologiques des Altérations du Tissu Osseux) par l'équipe du docteur Georges Carle.

La cytotoxicité des molécules chélatantes a été évaluée à 24 et 48 h par un test colorimétrique MTT (methylthiazol tetrazolium).

Le test MTT est un test qui permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules et ainsi, leur viabilité. L'explication détaillée du test MTT est consultable en annexe VI. Le protocole détaillé est disponible en partie expérimentale (§ C.III). Brièvement, les cellules sont mises à incuber pendant 1 h avec des solutions contenant une concentration croissante en molécules chélatantes, puis rincées. Après 24 ou 48 h les cellules sont incubées en présence d'une solution de MTT à 37 °C pendant une heure. L'absorbance à 570 nm (absorbance du formazan) et à 690 nm (bruit de fond) est mesurée. L'absorbance moyenne des cellules non exposées aux molécules chélatantes est prise comme référence. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé suivant le rapport, pour chaque échantillon, entre l'absorbance des cellules exposées aux molécules chélatantes par rapport à l'absorbance moyenne des cellules non exposées (blanc). Chaque résultat est la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées sous forme de triplicat. Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type. Par ailleurs un test statistique de type test de Student a été effectué lorsque la viabilité cellulaire est inférieure à 100 % afin de s'assurer de la significativité de cette différence observée (voir annexe V).

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 36.

a)

b)

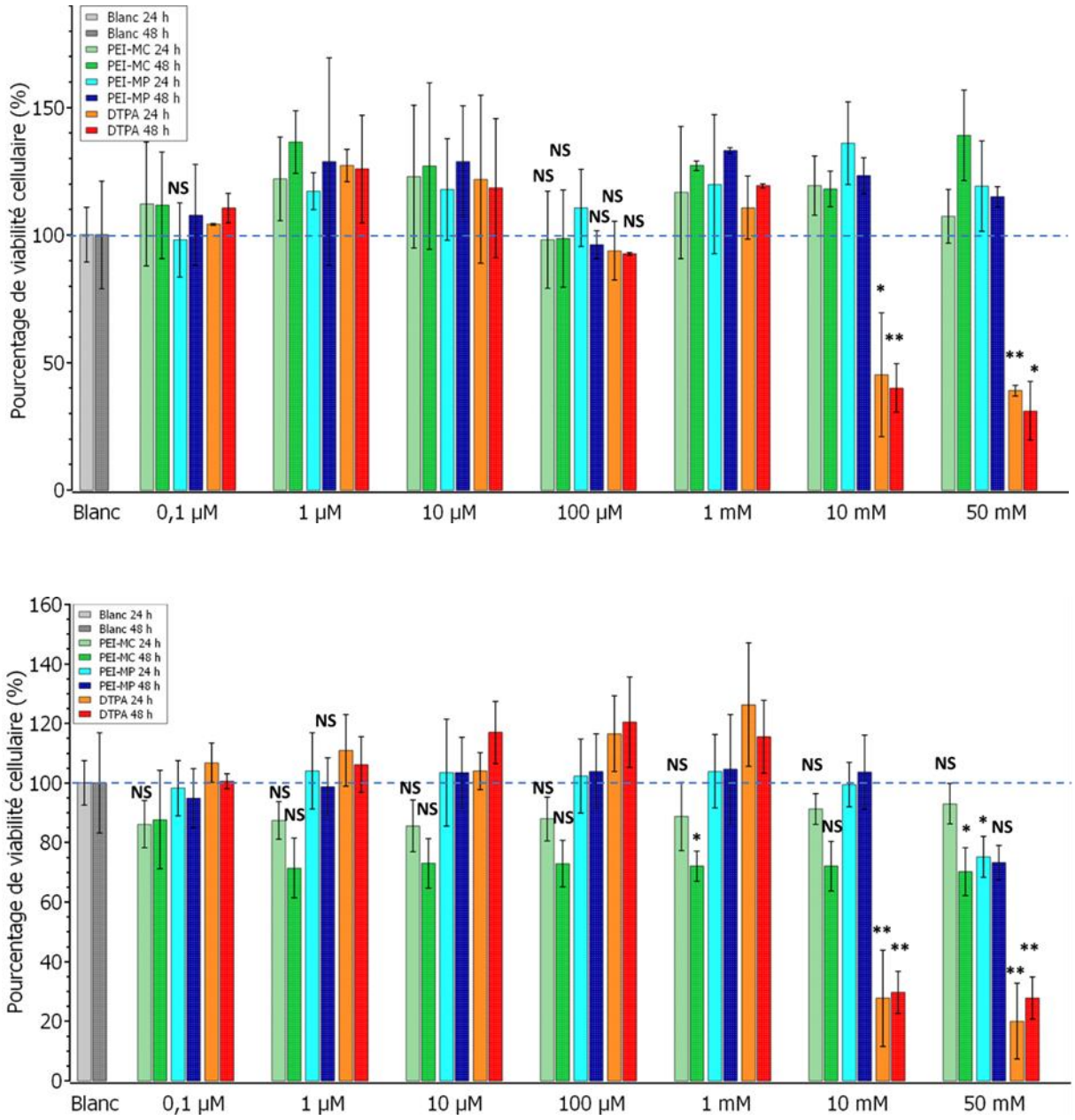


*Figure 36 : Tests de cytotoxicité sur a) les cellules MLO-A5 et b) les cellules SAOS-2 exposées à des concentrations croissantes de molécules chélatantes pendant 24 h ou 48 h. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. La moyenne et l'écart type ont été calculés en se basant sur des expériences indépendantes (n=3). * p < 0,05; ** p < 0,005, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de viabilité inférieur au blanc.*

Bien qu'il ne présente pas d'efficacité de décorporation du Th(IV) sequestré au sein de la HAp sur les tests effectués *in vitro*, la cytotoxicité du PEI-MC a été évaluée sur les cellules MLO-A5 et SAOS-2. En effet, *in vivo* il pourrait présenter une efficacité différente et être un candidat intéressant au vu de son affinité pour la HAp (determinée précedemment par ATG) . Le PEI-MC est bien toléré, on observe une légère cytotoxicité significative ($p < 0,05$) au-delà de 24 h (70,09 ± 8 %) pour des concentrations supérieures à 10 mM et uniquement sur la lignée SAOS-2.

Globalement, ces tests mettent en évidence une absence de cytotoxicité du PEI-MP quel que soit le type de cellules (MLO-A5 et SAOS-2) pour des concentrations allant jusqu'à 10 mM. On observe un léger effet cytotoxique (73,21 ± 5,71 % à 48 h) pour une concentration de 50 mM sur les cellules ostéoblastiques même si ce résultat n'est pas significatif ($p > 0,05$). Une étude[118] effectuée sur une lignée cellulaire d'ostéosarcomes (MNNG-HOS) montrait aussi une absence de cytotoxicité du PEI-MP pour des concentrations allant jusqu'à 1 mM pendant 96 h. Le DTPA montre un effet cytotoxique, qui est significatif au sens statistique et ce quelle que soit la lignée cellulaire utilisée dès 10 mM.

IV Conclusions

Nous avons montré lors de cette étude, en nous basant sur des données de la littérature fortement étayées ainsi que sur nos travaux antérieurs basés sur des polymères chélatants à base de PEI, que le PEI-MP, c'est-à-dire un analogue polyphosphonate du DTPA, peut être considéré comme un candidat sérieux à la décorporation spécifiquement ciblée sur les os du Pu(IV).

Le PEI-MP, synthétisé à partir d'un PEI ramifié (25 kDa), utilisé ici sans fractionnement de masse, n'a montré aucune toxicité sur les cellules constitutives des os, SAOS-2 et MLO-A5, contrairement au DTPA qui a considérablement diminué la viabilité dès 10 mM.

Le PEI-MP a été capable, à la concentration optimale (6,3 mM), d'extraire deux fois plus de Th(IV), 29 contre 17 %, que le DTPA à j_8.

Cette différence continue à augmenter dans le temps puisque la décontamination avec le PEI-MP atteint environ 50 % à j_{21}, alors qu'elle reste constante à 20 % dès le premier jour avec le DTPA.

Un traitement séquentiel cumulatif permet même, par l'administration d'une nouvelle dose fraîche de PEI-MP, d'augmenter le niveau final de décontamination à pratiquement 70 % à j_{21}.

La matrice osseuse est ici fortement contaminée (0,7 %), néanmoins le PEI-MP montre une efficacité élevée avec une absence de cytotoxicité. Il est fort probable qu'en utilisant une matrice osseuse moins contaminée, il soit possible de diminuer la concentration en PEI-MP utilisée.

Dans un contexte plus général de contamination par les actinides, où le ciblage des sites biologiques (poumons, foie, os) réellement impliqués dans la séquestration constitue une réelle avancée dans le domaine, notre stratégie pourrait constituer une approche fortement complémentaire à la thérapie chélatrice actuellement utilisée basée sur le Ca-/Zn-DTPA.

B. Application aux poumons

I Les macrophages alvéolaires, de véritables sanctuaires de séquestration des actinides

Les macrophages alvéolaires, cellules clés du système de défense pulmonaire, contribuent à la distribution de la dose pendant de très longues périodes. On les retrouve notamment impliqués dans plusieurs étapes du cycle de clairance des particules inhalées.

En effet, en fonction de leurs propriétés physicochimiques, les particules d'actinides inhalées peuvent suivre plusieurs chemins : clairance muco-ciliaire (Figure 37, A) ; dissolution et relargage dans la circulation sanguine (Figure 37, B) ; endocytose par les cellules épithéliales (Figure 37, C) ; phagocytose par les macrophages alvéolaires (Figure 37, D) ; transport au sein de l'appareil respiratoire (libre ou au sein des macrophages) et dépôts au sein des ganglions lymphatiques jusqu'à dissolution et transfert dans la lymphe (Figure 37 E, F).

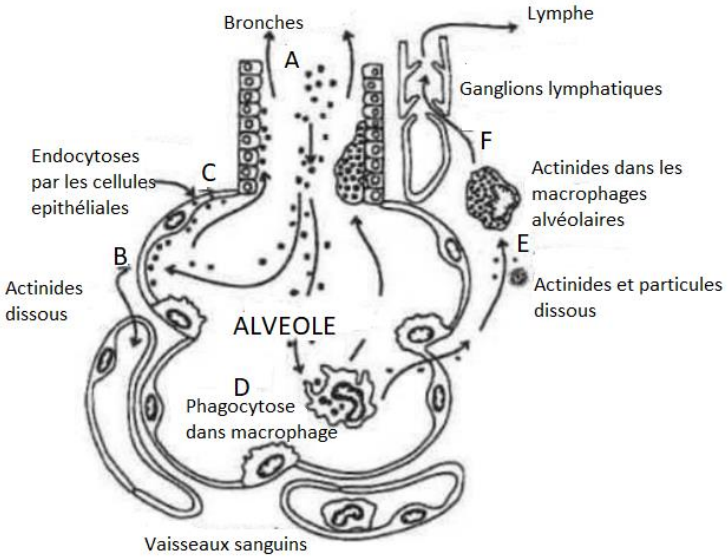


Figure 37 : Trajet des actinides en cas de contamination par inhalation (figure traduite de l'ICRP66).[19]

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle essentiel dans le transport, vers les nodules lymphatiques notamment, et la séquestration des aérosols peu solubles déposés après inhalation, et contribuent à leur stockage. Les macrophages accumulent les particules d'oxydes d'actinides et concentrent donc la dose. Ces « hot spots » délivrent un fort débit de dose dans un volume restreint et sont donc responsables des lésions causées au niveaux des sites qu'ils occupent.

Par ailleurs, ils sont capables de sécréter différents composés (cytokines, radicaux libres ...) qui peuvent contribuer à l'entretien d'une réaction inflammatoire chronique pouvant impliquer la genèse de fibroses et de lésions pré néoplasiques et néoplasiques (proliférations cellulaires anormales aboutissant à une tumeur bénigne ou maligne).

Les cycles répétitifs de « phagocytose-mort » des macrophages, l'insertion des oxydes d'actinides dans l'épithélium alvéolaire et la séquestration des particules au sein des foyers de fibrose et des nodules lymphatiques participent à la rétention à long terme des actinides dans le poumon.

Une rétention alvéolaire relativement importante, sous forme d'« agrégats » de particules[191] est constatée pour les MOx. Ces agrégats correspondent à des amas de macrophages ayant phagocytés des particules. Ces dépôts de MOx, et de particules de PuO_2 notamment, vont grandement affecter la capacité (cinétique) d'excrétion particulièrement dans le cas de « hot spots » importants.

Ces constatations ont déjà été rapportées dans la littérature par Collier *& al.* lors de dépôts initiaux avec une activité supérieure à 2 kBq.[191] L'irradiation serait la principale cause de cette perte de l'excrétion pulmonaire même si, pour des oxydes d'actinides à faible activité spécifique, leur toxicité chimique ou le trop grand nombre de particules déposées pourraient également être à l'origine de ce phénomène.[192,193]

Récemment, des études menées par Anne Van der Meeren[194] ont permis de développer de nouveaux tests *in vitro* sur des cellules de type macrophage afin d'évaluer l'absorption et le relargage des actinides par les macrophages ainsi que la biodisponibilité des actinides dans le but de prédire leur comportement *in vivo*.

Ces tests permettent de déterminer le taux de translocation des cellules phagocytaires et donc de prédire le transfert ultérieur dans le sang en fonction de diverses formes de Pu différents par leur solubilité (de « F » soluble à « S » insoluble).

Ces tests sont effectués sur la lignée cellulaire humaine monocytaire THP-1 après leur différenciation en cellules de type macrophage. Ces macrophages sont comparables à ceux que l'on trouve dans les alvéoles pulmonaires.

Comme les propriétés des composés inhalés, tout comme leurs interactions avec les molécules biologiques, influencent fortement leur biodisponibilité (et par conséquent la dose reçue), plusieurs formes chimiques du plutonium ont été étudiées : des colloïdes de plutonium (type « S »), du nitrate de plutonium (capable de former des colloïdes à pH physiologique) et du citrate de plutonium (soluble à pH physiologique). Les résultats ont montré une contamination accrue des cellules THP-1 lors de l'utilisation des colloïdes de Pu (jusqu'à 80 %) alors que ce pourcentage n'atteint pas plus de 3 % lors d'une contamination avec du nitrate de plutonium ou du citrate de plutonium. Ce résultat illustre parfaitement l'internalisation, au sein des macrophages, des particules de Pu par phagocytose.

Par ailleurs, la solubilité est inversement corrélée avec la rétention du plutonium puisque, dans cette expérience, c'est le plutonium sous la forme la moins soluble (colloïdale) qui se retrouve le moins externalisé (moins de 1 % dans le puits récepteur après 7 jours contre 71,5 % lors de l'utilisation de citrate de plutonium).

Dans une autre expérience, menée par la même équipe, après une contamination par inhalation de MOx chez le rat,[98] la fraction d'activité solubilisée, retrouvée dans le sang, puis partiellement excrétée représente une fraction très faible de l'activité totale administrée (< 0,2 %). Ce résultat confirme la forte mobilisation observée pour des fractions de type « S » puisque le MOx est très majoritairement composé de particules insolubles, susceptibles d'être séquestrées au sein même du site primaire de rétention (poumons, blessures). Même si l'administration de DTPA par inhalation est susceptible de réduire la rétention systémique dans les tissus (fois, os), elle n'entraine pas la prise en charge des particules insolubles au sein du site primaire de contamination. Ainsi, à l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de répondre pleinement à cette problématique.

Comme nous l'avons vu tout au long de cette revue bibliographique, même les meilleurs agents chélateurs utilisés jusqu'à présent, comme les polyaminocarboxylates (Ca-DTPA), sont peu efficaces sur les formes non solubles du Pu, séquestrées au niveau des sites primaires de rétention (poumons, foie et os).

De nombreux agents chélatant ont été mis au point tel que le Li-HOPO, cependant ils souffrent encore d'une faible spécificité tissulaire, d'une faible sélectivité vis-à-vis des actinides et parfois d'une toxicité accrue.

L'utilisation de systèmes d'administration type nébuliseur[98] permet une meilleure efficacité sur ces formes d'actinides peu solubles (oxydes ou oxo hydroxydes) aux demi-vies élevées. Cette efficacité reste néanmoins cantonnée à la fraction « soluble » circulante de ces formes, au niveau des sites primaires de rétention (poumons, blessures). A l'heure actuelle, aucun traitement ne répond donc à l'ensemble des spécifications requises. Plus précisément, aucun agent n'est actuellement capable, en plus de son action dans la circulation sanguine, de cibler spécifiquement les trois grands compartiments de rétention biologique du plutonium et de l'en extraire.

Notre approche se veut là encore, complémentaire à l'utilisation du DTPA, grâce à la même méthode simple, basée sur l'utilisation d'une plateforme polymérique : le polyéthylèneimine (PEI).

Les mêmes polymères que ceux utilisés pour la décorporation osseuse au sein de notre étude précédente seront utilisés : le PEI-MC (PolyEthyleneImine-MethylCarboxylate) et le PEI-MP (PolyEthyleneImine-MethylPhosphonate).

Ces polymères ont déjà montré une efficacité *in vitro* sur leur capacité à décontaminer l'U(IV) et les actinides(IV) (Pu(IV) et Th(IV)) comme analogue.[110–113]

Aussi, cette vectorisation passive devrait permettre d'augmenter la biodisponibilité du principe actif et sa concentration au sein des organes de rétention, aboutissant ainsi à une meilleure efficacité thérapeutique.

De plus des études sur du PEI branché 25 kDa montre d'ailleurs que son inhalation *via* un dispositif d'aérosolisation permet de cibler les alvéoles pulmonaires, il est d'ailleurs plus efficace dans sa version branchée que dans sa version linéaire.[195]

Par ailleurs sa fonctionnalisation par des carboxylates ou des phosphonates devraient permettre de réduire sa toxicité liée à sa charge cationique.[196]

Il est bien sûr nécessaire de compléter ces études par l'évaluation des polymères vis-à-vis d'actinides sous formes colloïdales (insolubles), qui seront rencontrés par ces polymères si la vectorisation passive permet un ciblage des alvéoles pulmonaires.

Notre méthodologie, dans le cadre de la décorporation pulmonaire, repose sur une approche complémentaire à celle du DTPA qui ciblerait plus particulièrement les particules insolubles de PuO_2 piégés au sein des macrophages alvéolaires. Cette approche consiste :

1) À étudier, *in vitro*, le comportement de nos polymères chélatants (PEI-MC et PEI-MP) vis-à-vis de colloïdes de Th (nanoparticules d'oxyde de thorium) qui, pour des raisons de radioprotection, constituent un modèle qui nous semble pertinent pour mimer les particules de PuO_2 qui seraient disséminées en cas de problème nucléaire.
2) À visualiser, *in cellulo*, par imagerie MET l'internalisation (phagocytose) des NPs de ThO_2 dans des macrophages et doser le Th extracellulaire par ICP-MS afin d'estimer des paramètres importants tels que la vitesse et la capacité d'internalisation, le trafic intracellulaire et notamment leur localisation *in fine*, l'impact sur la viabilité des macrophages dans le temps et éventuellement le taux d'excrétion naturel.
3) À mesurer la viabilité des macrophages en présence des NPs de Th seules et des chélates seuls afin de déterminer les plages de concentrations et de temps compatibles avec une expérience de décontamination.
4) À évaluer la capacité des polymères chélatants à ralentir voire empêcher l'internalisation des colloïdes de Th dans les macrophages dans le cas d'un traitement prophylactique (préventif) ou à augmenter l'excrétion de Th *via* leur solubilisation/chélation dans le cas d'un traitement curatif (post-contamination).

II Etude *in vitro* du système polymère chélatant/NPs de Th

a. Synthèse des NPs de Th

En cas de contamination par inhalation, nous avons vu que les particules insolubles de plutonium (PuO_2) et plus généralement les MOx vont atteindre les poumons, voire les alvéoles pulmonaires en fonction de leur taille. Ces nanoparticules insolubles vont être séquestrées au sein des sites de contamination, dits sites réservoirs : macrophages alvéolaires, éventuellement ganglions lymphatiques et tissus pulmonaires (en cas de transfert), au sein desquels elles vont irradiées pendant plusieurs années[20] (particules de type S avec une demi-vie biologique d'environ 500-1000 jours (CIPR)) augmentant le risque de développer un cancer du poumons.

Les polymères chélatants PEI-MC et PEI-MP[110–113] ont montré des capacités à complexer plusieurs actinides sous leurs formes solubles : Th, U, et Pu (évalué par EXAFS). Sont-ils capables de déplacer un tant soit peu l'équilibre vis-à-vis d'une forme colloïdale ?

Afin de réaliser nos études avec un modèle proche de celui de la réalité, nous avons décidé de synthétiser des nanoparticules de thorium, afin de mimer les particules de PuO_2, piégées dans les macrophages alvéolaires, dans le cas d'une contamination par inhalation.

Pour favoriser la reproductibilité des résultats et la stabilité colloïdale, nous avons opté pour une synthèse contrôlée des NPs de Th. En effet, ces NPs doivent avoir une distribution homogène en taille qui soit compatible avec le devenir biologique (inhalation jusque dans les alvéoles pulmonaires puis phagocytose par des macrophages alvéolaires). Nous avons donc visé des tailles centrées autour de 50 nm.

Leur préparation a été adaptée d'un protocole décrit par L. Wang *& al.*[197] Le protocole de synthèse détaillé est disponible en partie expérimentale (§ D.I.a). Cette synthèse permet de préparer des NPs d'oxyde de Th par décomposition hydrothermale d'ions actinides (Th^{4+}) en présence d'urée et de glycérol selon les équations (1) et (2)

$$CH_4N_2O + 3H_2O \rightarrow 2NH_4^+ + 2OH^- + CO_2 \quad (1)$$

$$Th^{4+} + 4OH^- \rightarrow Th(OH)_4 \rightarrow ThO_2 + 2H_2O \quad (2)$$

La taille des nanoparticules obtenues peut être ajustée en faisant varier la proportion urée/glycérol, la température et le temps du traitement hydrothermal.

Une étape de calcination au four à moufle (600 °C) permet de pyrolyser d'éventuelles traces organiques d'urée et de glycérol non éliminées par les étapes de centrifugation/lavage et de finaliser la conversion des NPs obtenues sous une forme intermédiaire d'hydroxydes de Th (plus exactement oxo-hydroxo) en leur forme finale d'oxydes de thorium.

Les deux types de colloïdes de thorium ont été obtenus suivant le traitement thermique appliqué : un mélange oxo-hydroxo ou oxydes uniquement.

La morphologie et la distribution des colloïdes (taille et polydispersité) ont été mesurées au moyen d'analyses en microscopie électronique à transmission (MET) (partie expérimentale § D.I.b) (Figure 38).

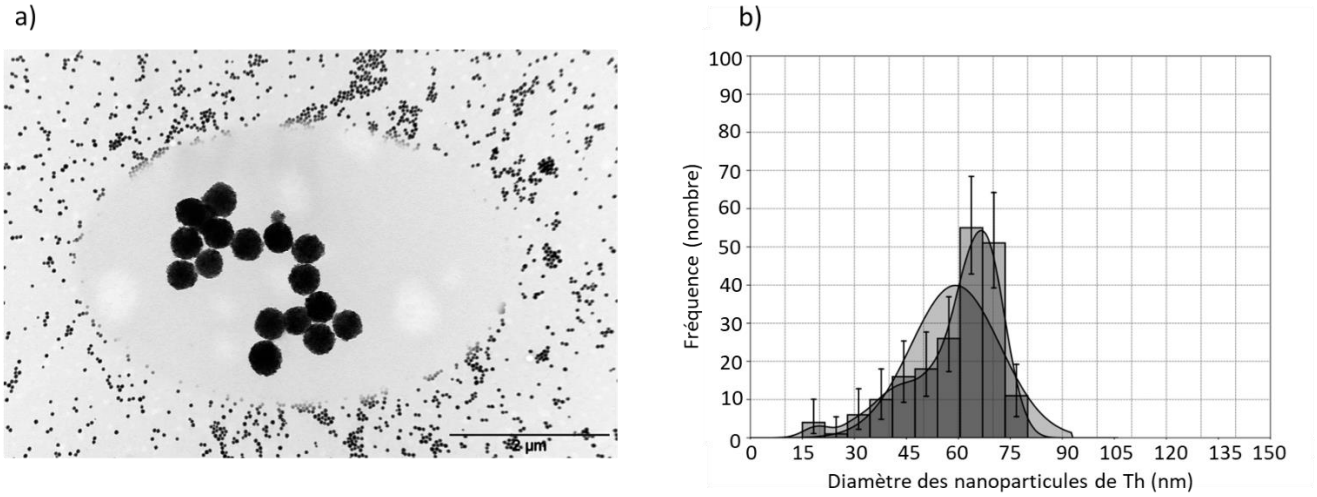


Figure 38 : a) Cliché MET et grossissement des nanoparticules de type oxo-hydroxo de thorium et b) histogramme de taille (en nombre) réalisé sur la totalité des nanoparticules du cliché a.

Les mesures réalisées en Microscopie électronique à transmission (MET) montrent des colloïdes monodisperses (Figure 38), d'une taille moyenne de 55 nm (mode 65 nm), avec très peu d'agrégats. Sur les clichés MET, il n'existe pas de différence significative en termes de morphologie, de taille et de polydispersité entre les nanoparticules de type oxo-hydroxo de thorium et celles d'oxyde de thorium.

On observe néanmoins une différence en termes d'agrégation, après redispersion dans l'eau, entre les NPs obtenues avant (oxo-hydroxo) et après (oxyde) calcination en réalisant une étude de la diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS) (partie expérimentale § D.I.c).

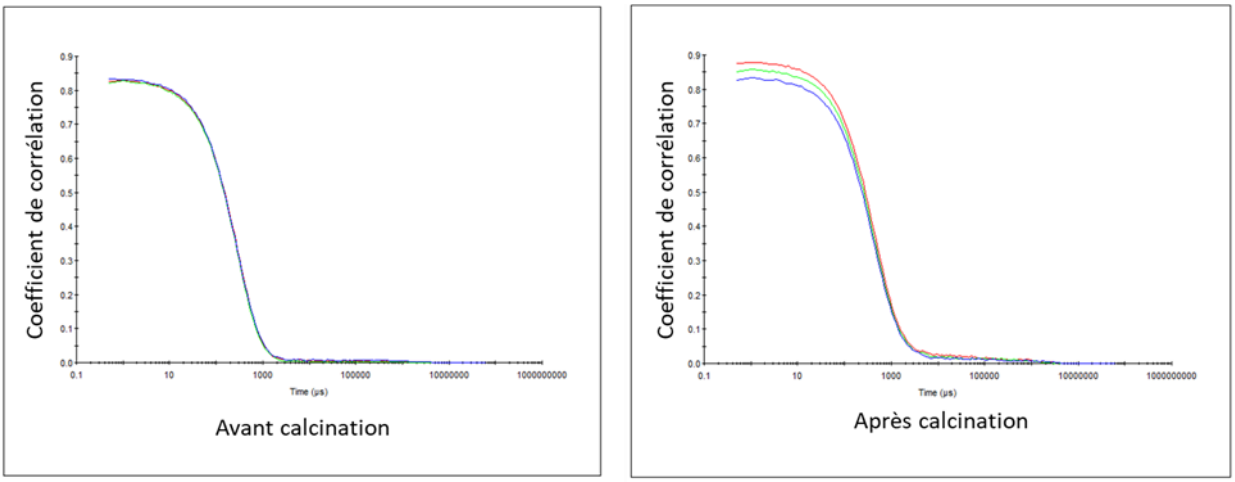


Figure 39 : Corrélogrammes des nanoparticules de thorium de type oxo-hydroxo (à gauche) et oxyde (à droite) obtenues après calcination (redispersées dans l'eau distillée).

On observe une différence entre les deux types de NPs. L'intensité de la lumière diffusée à t_0 est stable dans le corrélogramme de gauche alors qu'elle décroît entre la 1ère et la 3ème mesure dans celui de droite. Ceci atteste d'une diminution du nombre de NPs en suspension due à leur sédimentation et rend donc compte d'une différence de surface entre les deux types de NPs avec soit un effet stabilisateur dû à la persistance de molécules organiques et/ou à un potentiel zêta plus faible (en valeur absolue) dans le cas des oxydes.

La stabilité des NPs de type oxo-hydroxo en milieu physiologique ([Tris] : 50 mM, [NaCl] : 150 mM) est supérieure à 6 mois (étude réalisée par MET). Celle des NPs de type oxo est plus faible, compte tenu de leur propension à sédimenter plus rapidement. Néanmoins, après 6 mois en milieu physiologique ([Tris] : 50 mM, [NaCl] : 150 mM), leur intégrité est intacte (étude réalisée par MET). Une simple sonication par ultrason permet de les redisperser. Il est par ailleurs possible de conserver les deux types de nanoparticules sous forme solide, sous atmosphère inerte (après lyophilisation) sur une durée supérieure à 1 an (étude réalisée par MET).

Compte tenu du fait qu'en cas de contaminations accidentelles, les particules de Pu se présenteraient plutôt sous forme d'oxyde (en raison de leur formation à très hautes températures) ce sont ces NPs qui ont été utilisées durant la suite de cette étude.

b. EXAFS des nanoparticules de thorium

Dans le but de caractériser nos nanoparticules de thorium, notamment pour élucider les différences entre les nanoparticules dites « oxo » et celles dites « oxo-hydroxo », les nanoparticules ont été analysées par spectroscopie EXAFS.

Ces spectres pourront ainsi servir de références qui pourront ensuite être comparées à ceux issus des complexes chélates…NPs deTh tels que DTPA…NPs de Th, PEI-MC… NPs de Th ou PEI-MP… NPs de Th après que les expériences de décontamination auront été effectuées. Les spectres EXAFS d'une référence de ThO_2 , des nanoparticules de thorium « oxo », et des nanoparticules de thorium « oxo-hydroxo » ont été enregistrés au seuil L_{III} du thorium (16 300 eV). Les protocoles détaillés concernant la préparation des échantillons sont consultables en partie expérimentale § D.I.d.

Les ajustements n'ont pas été effectués par manque de temps. Néanmoins, même si les données sont encore en cours de traitement, une première analyse qualitative peut être effectuée.

La Figure 40 présente le signal EXAFS et la transformée de Fourier du ThO_2 (utilisé comme référence), des nanoparticules dites « oxo », et des nanoparticules dites « oxo-hydroxo ».

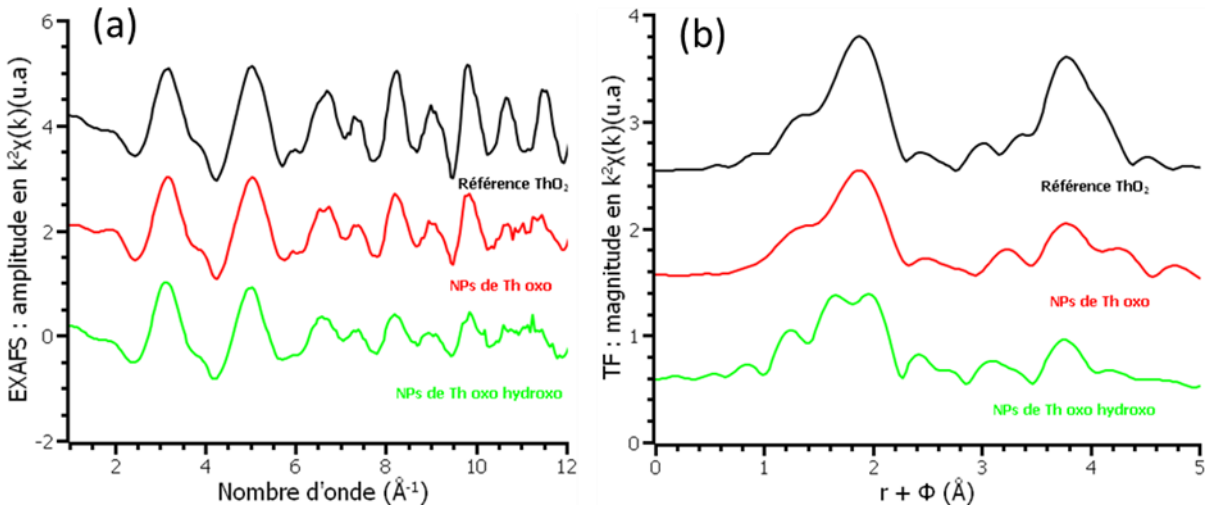


Figure 40 : (a) Spectre EXAFS du ThO_2 (noir), des nanoparticules de Th oxo (rouge) et oxo-hydroxo (vert) et (b) leur transformée de Fourier respective.

On observe une contribution vers 3,8 Å, similaire à la contribution d'atomes de thorium du spectre ThO_2 de référence. Les nanoparticules ont donc des spectres caractéristiques d'une espèce polynucléaire de Th. Ainsi, comme le laissait supposer l'analyse des nanoparticules de thorium par MET, il y a bien eu une hydrolyse du nitrate de thorium de départ.

On observe néanmoins des différences entre le spectre de référence (ThO_2) et les spectres des nanoparticules de thorium, qu'elles soient sous forme oxo ou oxo-hydroxo. Les premiers voisins oxygène semblent plus dispersés dans le cas des nanoparticules de thorium. Cette différence est plus marquée sur le spectre de l'oxo-hydroxo avec l'apparition claire d'une contribution à plus courte distance. On peut donc supposer que l'ajustement des spectres de NPs nécessitera 2 contributions d'atomes d'oxygène avec soit deux distances Th-O plus éloignées l'une de l'autre dans le cas de l'oxohydroxo que dans le cas des nanoparticules de type oxo, avec plus d'oxygènes à courte distance au sein des NPs d'oxo-hydroxo qu'au sein du type oxo. L'ajustement des données expérimentales devrait nous permettre de répondre à cette question.

Cette analyse EXAFS préliminaire montre qu'il semble bien y avoir une différence structurelle entre les deux types de nanoparticules, qui pourrait intervenir dans la différence de vitesse de sédimentation observée en DLS.

c. Etude thermodynamique de l'équilibre Th colloïdal – Th soluble en présence de molécules chélatantes.

Afin de vérifier la capacité des polymères chélatants à complexer le Th à partir des colloïdes : c.-à-d. à déplacer l'équilibre Th colloïdal (solide) vers Th soluble (chélaté), des expériences de type dose/réponse ont été effectuées en conditions physiologiques, TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4).

Pour s'assurer d'un contrôle total de la bonne dispersion et de la quantité des NPs de Th dans chacun de nos échantillons et donc de la teneur exacte en Th élémentaire (dosé par ICP-MS), nous avons vérifié que des dilutions successives d'une solution mère de NPs dispersées dans le TBS vérifiaient bien la linéarité afin de doser le Th précisément et de façon reproductible dans toutes les études suivantes. Les résultats se trouvent dans la partie expérimentale (§ D.II.a).

Pour déterminer la capacité des chélates PEI-MC, PEI-MP et DTPA à déplacer l'équilibre Th colloïdal (solide, sous forme de nanoparticules) vers Th soluble (chélaté), des concentrations (exprimées en 1-mer de chélate) croissantes de DTPA, PEI-MC ou PEI-MP, de 0 (blanc) à 35 mM) dans un volume fixe (1,5 mL) de TBS, ont été ajoutées à une masse fixe (20,0 ± 2,0 µg) de NPs de Th.

Après 7 jours, 600 µL de surnageant ont été récupérés après centrifugation (15 000 rpm, 15 min), puis dosés en thorium par ICP-MS (voir partie expérimentale § D.II.b). Pour chaque expérience, afin de s'assurer qu'on retrouve bien 100 % de la concentration en Th initiale, la teneur en Th du culot est aussi dosée par ICP-MS dans le but de déterminer le pourcentage de thorium restant sous forme solide (voir Annexe VII). Les résultats sont représentés sous forme d'un graphique exprimant le pourcentage de thorium récupéré dans le filtrat, en fonction de la concentration initiale en monomère de molécules chélatantes.

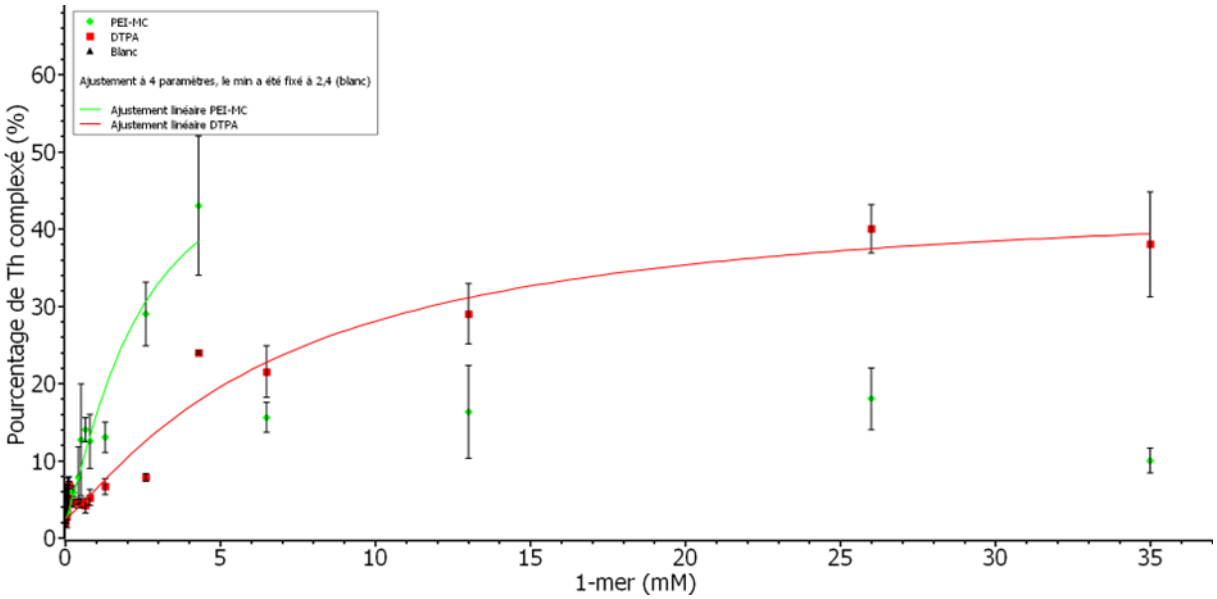
La courbe dose/réponse correspondant à l'utilisation du DTPA a pu être ajustée par une équation logistique à quatre paramètres de la forme : Réponse = min + (Max – min) / $[1+(CE_{50}/dose)^{Hill}]$ avec Réponse = % Th décontaminé; dose = 1-mer (mM); min = réponse en l'absence de chélate (blanc); Max = plateau; CE_{50} = dose requise pour obtenir une réponse de 50% ; Hill = pente à CE_{50}. Il en est de même pour celle correspondant à l'utilisation du PEI-MC sur la première partie de la courbe (pour une concentration s'échelonnant de 0,01 mM à 4,3 mM).

Il n'a pas été possible d'obtenir un bon ajustement avec la courbe dose/réponse du PEI-MP. Les valeurs des paramètres correspondant pour chaque complexe ainsi que les courbes ajustées sont présentées ci-dessous (Tableau 15 et Figure 41).

Tableau 15 : Paramètres des courbes dose/réponse pour le complexe DTPA-NPs Th et PEI-MC- NPs Th.

Paramètres	min	max	CE_{50} (mM)	Hill	R^2
DTPA-NPs Th	2,4	45,0	7,02	1,17	0,96
PEI-MC-NPs Th Sur [0,01 ; 4,3]	2,4	51,6	2,42	1,26	0,93

a)



b)

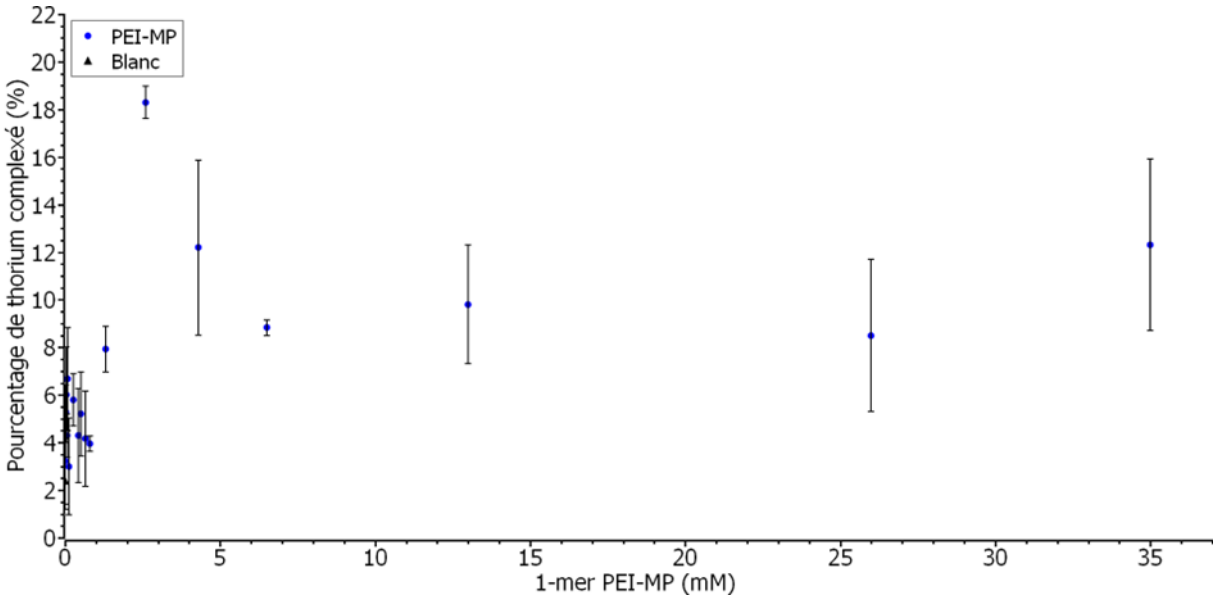


Figure 41 : Courbes dose/réponse Th NPs (20,0 ± 2,0 µg) en fonction de la concentration en chélate (1-mer) dans 1,5 mL de TBS à j_7 (expériences réalisées à 21 °C). a) DTPA (rouge) et PEI-MC (vert) b) PEI-MP (bleu). Chaque mesure représente la moyenne de 3 expériences (± écart type).

Premièrement, nous constatons qu'en l'absence de molécules chélatantes, l'équilibre Th colloïdal (solide) vers Th soluble (chélaté) n'est quasiment pas déplacé puisqu'à j_7, le pourcentage de thorium dans le surnageant est de 2,4 ± 1,0 % seulement.

Les 3 chélates montrent des capacités à solubiliser le Th. Néanmoins le profil des courbes dose/réponse diffère significativement entre les polymères et le DTPA. La courbe dose/réponse correspondant à l'utilisation de DTPA présente un profil à plateau classique avec une saturation à une concentration de 26 mM où on atteint une efficacité de 40 ± 3 %. Cette courbe est d'ailleurs ajustable avec une équation de type dose-réponse avec un R^2 de 0,96. Le profil des courbes liées à l'utilisation des polymères (PEI-MC et PEI-MP), présente une allure atypique avec un pic (efficacité maximale) puis une chute rapide de l'efficacité.

Seule la courbe du PEI-MC peut être ajustée sur la première partie (de 0,01 mM à 4,3 mM) avec une équation de type dose/réponse.

L'efficacité maximale du PEI-MC, 43 ± 9 % pour une concentration de 4,3 mM est cependant nettement supérieure à celle du PEI-MP, 18,3 ± 0,7 % à une concentration de 2,6 mM. On peut supposer qu'à des concentrations élevées (au-dessus de 5 mM pour le PEI-MC et de 3 mM pour le PEI-MP) la surface des nanoparticules de thorium serait saturée par les polymères et empêcherait la remise en solution du Th. Ce phénomène pourrait être exacerbé par des phénomènes cinétiques : la désorption totale des complexes polymère-Th serait plus lente que celle des complexes DTPA-Th. Des clichés MET obtenus à des concentrations élevées en polymère (10 mM) semble conforter cette hypothèse (Figure 42). En effet, l'imagerie semble suggérer que du Th à un état moins condensé semble entourer les NPs en formant ces motifs de type astérisque. Etant donné qu'aucun agent de contraste n'a été utilisé, la visualisation est indirecte et ne peut être due qu'au Th (nombre atomique élevé, donc forte transmission aux électrons) qui semble lié à la matrice polymérique qu'on visualise de manière indirecte (grâce au Th).

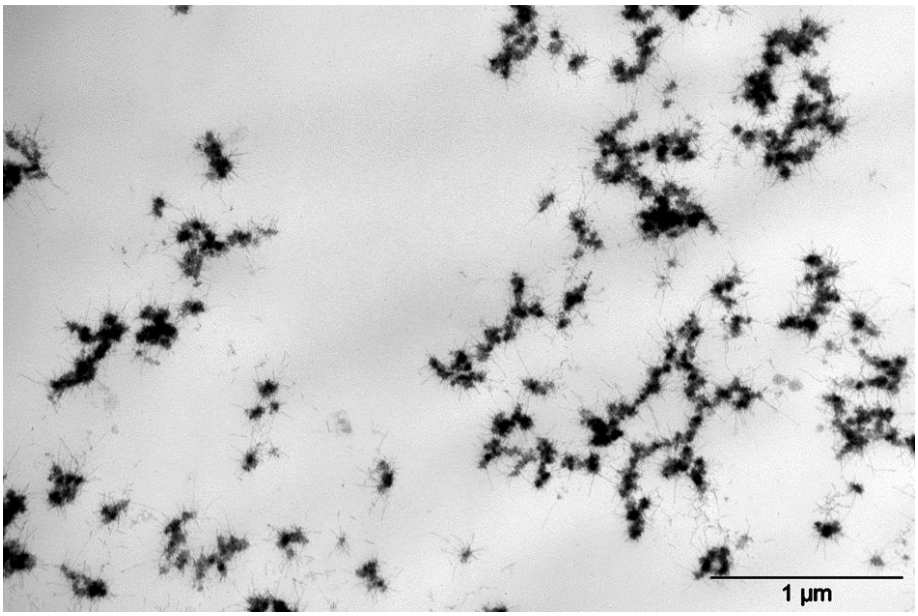


Figure 42 : Cliché MET de nanoparticules de Th en présence de PEI-MC ([PEI-MC] : 10 mM).

Néanmoins le PEI-MC présente une efficacité de complexation du Th comparable à celle du DTPA (43 % contre 40 % respectivement), pour une concentration en PEI-MC plus de 6 fois inférieure à celle du DTPA. A titre de comparaison pour une concentration en DTPA de 4,3 mM, l'efficacité est de seulement 24,0 ± 0,2 %.

En se basant sur les courbes dose-réponse et malgré des facteurs de Hill très similaires pour le DTPA et le PEI-MC (respectivement 1,17 et 1,26) les CE_{50} sont très différentes, la CE_{50} du DTPA est quasiment 3 fois plus élevée que celle du PEI-MC, soulignant le fait que pour atteindre cette même efficacité de complexation très similaire (~ 40 %) la dose de DTPA devra être bien supérieure à celle de PEI-MC à utiliser pour atteindre la même efficacité.

Pour des considérations de toxicité, l'administration d'une plus faible concentration de molécules chélatantes est indéniablement un atout considérable.

Le DTPA a par ailleurs peu de chances d'atteindre le site de séquestration des nanoparticules de Th : macrophages, ganglions lymphatiques et tissus interstitiels. Il faudrait pour cela qu'il soit administré rapidement, sous forme de poudres, pour espérer atteindre ces formes insolubles qui y sont séquestrées alors qu'on peut raisonnablement espérer que nos polymères atteignent et ciblent les lieux de stockages de ces formes insolubles.

Cette étude a permis de déterminer la concentration optimale des polymères à utiliser pour la suite des tests (décontamination), ainsi que celle du DTPA. Néanmoins elle devra être complétée par des études de cytotoxicité, en effet il est probable que la concentration utile en DTPA soit trop cytotoxique pour permettre les études *in cellulo*.

III Suivi de la phagocytose par des macrophages 264.7 des NPs de Th par imagerie MET et ICP-MS.

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle essentiel dans le transport des particules déposées après inhalation. La plupart des particules peu solubles sont phagocytées dans les minutes qui suivent leur dépôt.

L'ingestion de particules par le macrophage commence par l'avancée de pseudopodes vers l'élément étranger, ce qui initie le processus d'internalisation. Les pseudopodes entourent les particules et le cytosquelette se réorganise de manière à fusionner et créer ainsi un phagosome précoce ou vésicule de phagocytose.[198] Une fois la phagocytose déclenchée, les phagosomes fusionnent d'abord avec les lysosomes pour former des phagolysosomes au sein desquels le contenu peut subir une transformation chimique par l'intermédiaire de nombreuses enzymes et d'un pH acide (baisse du pH de 7 à 4,5-5).[199]

Ces étapes, même si elles sont connues et bien décrites dans le cas d'agents pathogènes, ont été moins étudiées dans le cas de l'inhalation d'oxyde de plutonium. Quoiqu'il en soit, l'oxyde de plutonium ne peut pas être dégradé par cette voie conventionnelle. La manière dont il s'accumule n'est pas encore bien définie.

a. Evaluation de la capacité d'internalisation et du temps requis pour la phagocytose

Dans ce cadre, nous avons réalisé un suivi des étapes liées à la contamination par la combinaison de deux techniques (MET et ICP-MS). Un suivi *in cellulo* sur des macrophages en phase de contamination par les nanoparticules de Th a permis de visualiser les différentes étapes de phagocytose et l'évolution des nanoparticules de Th à l'intérieur des macrophages contaminés.

Le protocole détaillé de culture cellulaire est disponible en partie expérimentale (§ D.III.a et § D.III.c). Brièvement, des macrophages de type RAW 264.7 (monocytes de rats) ont été cultivés dans des plaques 24 puits puis contaminés par les nanoparticules de Th synthétisées précédemment (§ II.a.) et rincés. Chaque puits a été ensemencé à 28 000 cellules, cette quantité est volontairement faible pour pouvoir maintenir les expériences sur une durée d'une semaine. Une quantité de 2,5 ± 0,1 µg de thorium sous forme de nanoparticules d'oxyde de thorium a été ajoutée par puits. En considérant une taille moyenne des nanoparticules de 55 nm (voir § II.a) et la densité du ThO_2 on obtient environ 3,24 millions de nanoparticules de thorium par puits soit ~116 NPs de thorium par cellule à l'état initial. Après fixation des cellules (procédé au paraformaldéhyde qui permet de figer les cellules en conservant leur totale intégrité) à différents temps afin de visualiser les différentes étapes de phagocytose (phagosomes, phagolysosomes …), les cellules sont observées au microscope électronique en transmission. En parallèle un dosage du Th à différents temps a été réalisé afin de compléter les observations effectuées en MET. Ce dosage du Th a été précédé par une étude du dosage du Th par ICP-MS en milieu de culture afin d'anticiper d'éventuels problèmes de minéralisation et effets de matrice (§ D.III.b.).

Une durée d'exposition aux NPs de Th d'une heure est suffisante pour qu'aucun colloïde ne soit visible dans le milieu extra-cellulaire (Figure 43).

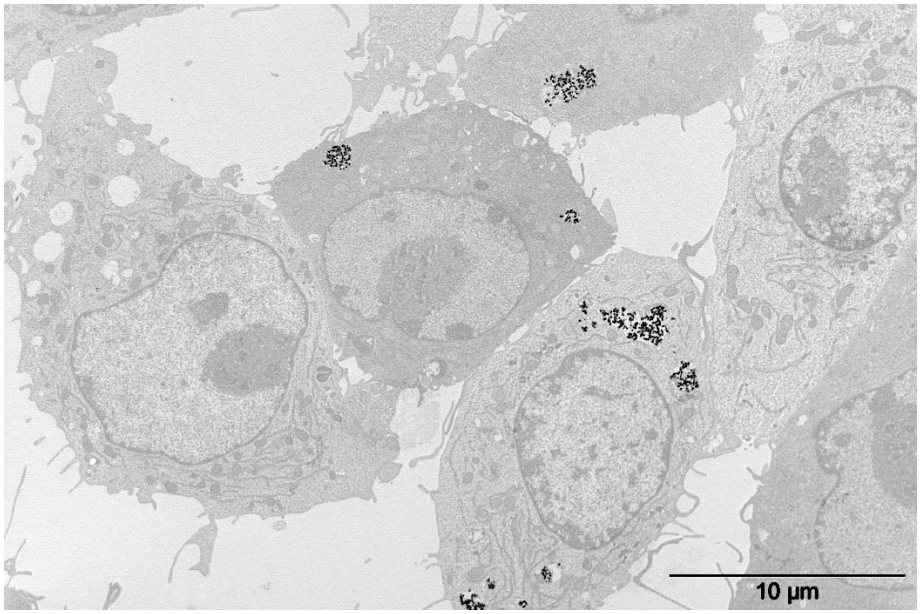


Figure 43 : Cliché MET des cellules RAW 264.7 exposées aux NPs de Th pendant 1 h.

Ces observations visuelles ont été complétées par l'analyse du thorium dans le milieu extracellulaire par ICP-MS (partie expérimentale §D.III.c). En effet, après une heure d'exposition les cellules sont rincées deux fois avec 1 mL de tampon PBS pour éliminer l'éventuel surplus de colloïdes. 2,5 ± 1,1 % de Th par rapport au thorium initial est retrouvé dans la totalité des liquides de rinçage. On peut donc considérer que l'internalisation est massive (97 %, ICP-MS) et qu'un temps d'exposition d'une heure, suivi d'étapes de rinçage permet d'aboutir à la phagocytose complète des NPs de Th. D'autres concentrations de thorium ont pu être testées pour un même nombre de cellules initiales allant jusqu'à ~ 1000 NPs de thorium par cellules, aboutissant au même résultat d'une internalisation massive en 1 h (annexe VIII).

Afin de vérifier un éventuel relargage de Th dans le milieu extracellulaire qui serait dû à une excrétion partielle quelconque ou à la mort de certains macrophages, l'expérience a été poursuivie durant 5 jours.

En MET, nous n'observons pas de NPs de Th dans le milieu extracellulaire. On peut donc conclure en l'absence d'externalisation des NPs de Th.

Néanmoins, durant ces 5 jours, les cellules subissent de nombreuses étapes de rinçage (avec tampon PBS) puis l'ajout de milieu de culture supplémenté.

Ainsi, durant ces étapes, des NPs de Th pourraient être éventuellement éliminées. Les liquides résultant de toutes ces étapes (rinçages et changements de milieu) ont donc été dosés en thorium. La figure représentant le pourcentage de relargage des NPs de thorium en fonction du temps est visible en partie expérimentale (§ D.III.c). Dans tous les cas, le relargage des NPs de thorium est inférieur à 1% par rapport à la quantité initiale. Nous pouvons donc supposer qu'il n'y a pas d'exocytose des NPs de Th, dans les conditions de l'expérience et que si du Th venait à se retrouver dans le milieu extracellulaire (mort de macrophage par exemple), il serait rapidement pris en charge par d'autres macrophages.

b. Les différentes phases de la phagocytose et le trafic intracellulaire

Les macrophages ont été traités à différents temps : 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h et 120 h. Le suivi par imagerie MET au cours du temps permet de visualiser les différentes étapes, précoces et tardives, de la phagocytose.

Dans les premières minutes, jusqu'à 1 h, on peut voir une activité d'internalisation très importante avec de nombreux pseudopodes (Figure 44 a). Les NPs sont littéralement avalées et on les retrouve dans des vésicules claires (Figure 44 a et b), les phagosomes.

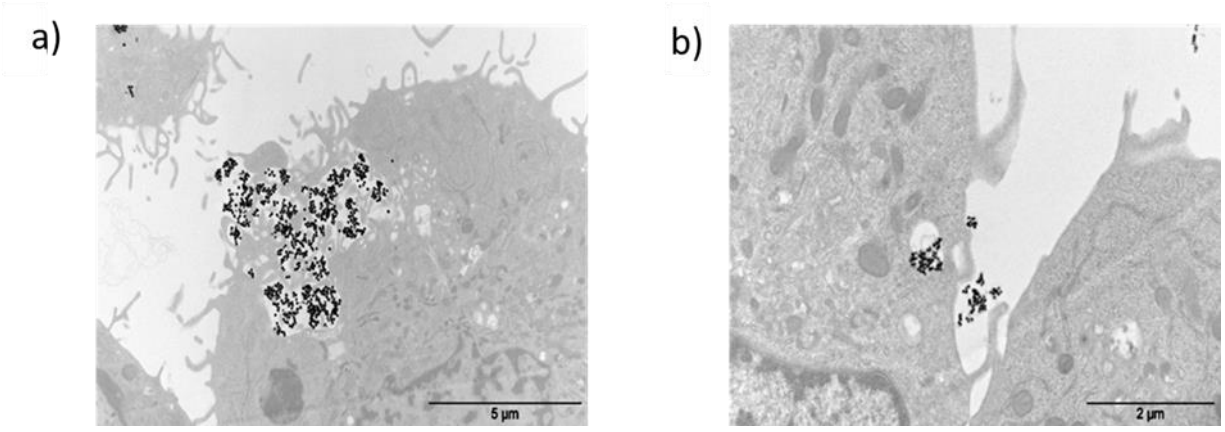


Figure 44 : Clichés MET des cellules RAW 264.7 exposées aux NPs de Th a) pendant 30 min b) Zoom sur une vésicule de phagocytose.

Au bout de 3 h, on observe une évolution de ces vésicules qui apparaissent plus foncées (Figure 45 a) et 45 b)). Les NPs sont piégées dans les phagolysosomes.

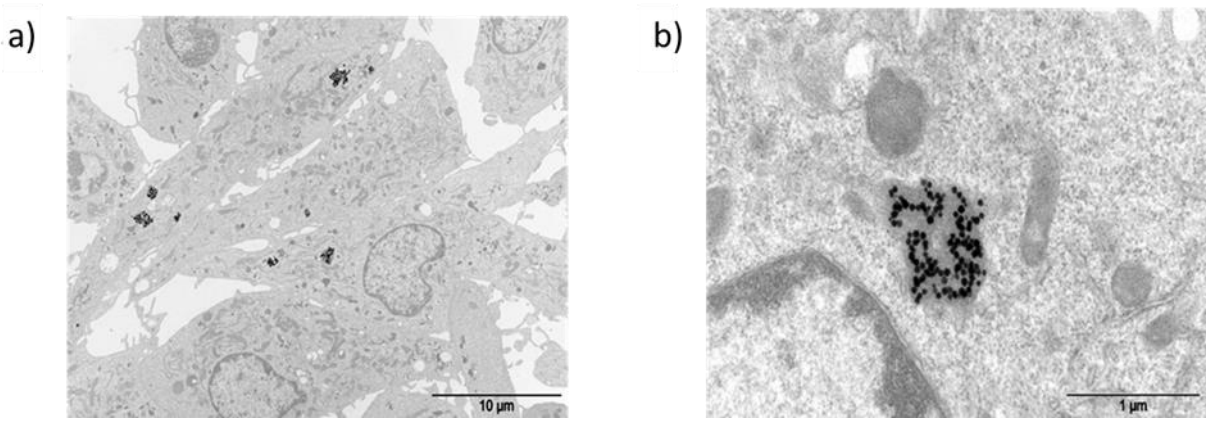


Figure 45 : Clichés MET des cellules RAW 264.7 exposées aux NPs de Th a) pendant 3 h b) Zoom sur une vésicule de phagocytose.

De fines membranes semblent entourer certaines NPs de thorium (Figure 46), on observe même la présence d'un recyclage de ces membranes (vésicules sous les NPs).

Les NPs ne semblent aucunement dégradées, en effet, aucune érosion des colloïdes n'est observée même si cette observation reste purement qualitative.

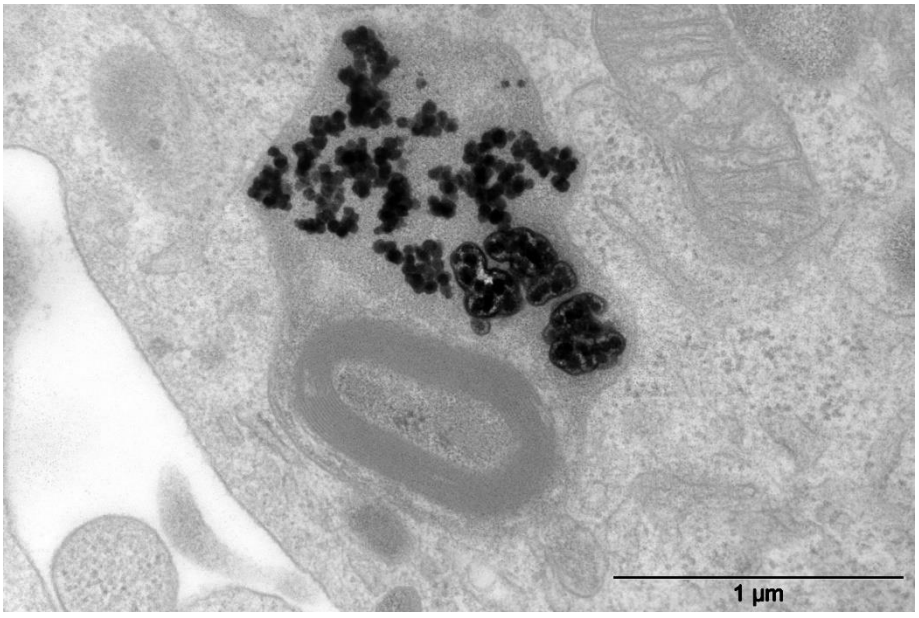


Figure 46 : Zoom sur une vésicule de phagocytose de cellule RAW 264.7 exposée aux NPs de Th pendant 4 h.

Pour des durées d'exposition supérieures à 5 h (Figure 47), les clichés obtenus en MET attestent de la désagrégation de certaines des vésicules. Les NPs de Th se retrouvent alors *in fine* au sein du cytoplasme de la cellule et semblent totalement intègres.

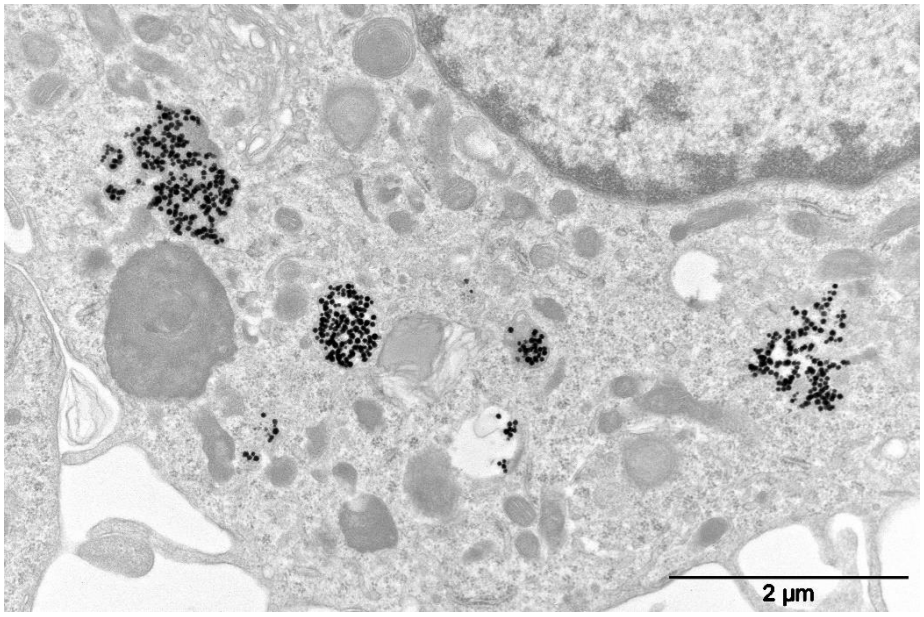


Figure 47 : Cliché MET des cellules RAW264.7 exposées aux NPs de Th pendant plus de 5 h.

Cette étude souligne la difficulté extrême liée à la décontamination de macrophages et soulève des questions :

La localisation des nanoparticules de thorium évoluant au cours du temps, quelle est la bonne fenêtre de traitement afin de favoriser la colocalisation des polymères chélatants avec les NPs de Th ?

Est-ce qu'un traitement per-internalisation des NPs, administré peu après la contamination (pendant la phase initiale d'internalisation des NPs) peut montrer une efficacité ?

Une administration plus tardive, post-internalisation des NPs, peut-elle permettre d'obtenir *in fine* une colocalisation des polymères chélatants avec les NPs de Th ?

En cas de colocalisation, les polymères chélatants sont-ils capables, à l'instar des tests *in vitro*, de capter du thorium sous forme ionique et de l'extraire des cellules après complexation ?

La mise en place de test de décontamination *in cellulo* par nos polymères chélatants devrait permettre d'apporter des réponses à ces questions.

La dernière étape de notre méthodologie avant la réalisation de ces tests *in cellulo* consiste à mesurer la viabilité des macrophages en présence des NPs de Th seules et des chélates seuls afin de déterminer les plages de concentrations et de temps compatibles avec une expérience de décontamination.

IV Evaluation de la viabilité des macrophages RAW 264.7 en présence des NPs de Th ou des chélates

Les macrophages alvéolaires sont des cellules particulièrement radio-résistantes. Des études réalisées en laboratoire ont montré, chez le rat et le primate, que l'émission de plusieurs centaines de particules alpha était nécessaire pour induire la mort de ces cellules par apoptose.[193] Il est donc totalement improbable que cela se produise dans le temps nécessaire à nos études en présence de Th.

a. Viabilité des macrophages en présence de NPs

Les tests de viabilité menés sur des macrophages contaminés par nos NPs de Th et dont l'excès (moins de 3 % selon l'étude MET/ICP-MS) a été éliminé par rinçage après 1 h d'incubation n'ont pas montré de toxicité induite par l'exposition aux NPs de thorium sur les 5 jours de notre étude (voir partie expérimentale §D.IV.b) Par ailleurs, aucun changement dans la morphologie des macrophages, qui aurait pu être imputable à une transition apoptotique, n'a été observé. Néanmoins ces résultats sont à considérer avec précaution puisqu'il s'agit ici d'une étude réalisée avec du Th-232, un élément ayant une activité spécifique 1 million de fois plus faible que celle du Pu-239.

b. Viabilité des macrophages en présence des chélates

La toxicité des chélates (PEI-MC et PEI-MP) pour les polymères, et DTPA et DTPMP pour leurs homologues moléculaires respectifs, utilisés comme référence, a été mesurée sur les macrophages RAW 264.7.

i) Test de viabilité de type criblage : dose-réponse à 24/48 h

La cytotoxicité des chélates a été évaluée à 24 h puis à 48 h pour différentes concentrations : 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM.

Brièvement, les cellules RAW 264.7 sont exposées à une solution de milieu de culture contenant différentes concentrations croissantes en chélates, puis après 1 h d'incubation, la solution est retirée, chaque puits est rincé par une solution de PBS pour éliminer les molécules chélatantes non internalisées et une solution de milieu de culture fraiche est alors ajoutée. La cytotoxicité est évaluée au bout de 24 h et 48 h par un test à la résazurine.

Le détail du protocole est disponible en partie expérimentale (§ D.IV.c). De plus un test statistique de type test de Student a été effectué lorsque la viabilité cellulaire est inférieure à 100 % afin de s'assurer de la significativité de cette différence observée (voir Annexe V). Les résultats sont représentés sur la Figure 48.

a)

b)

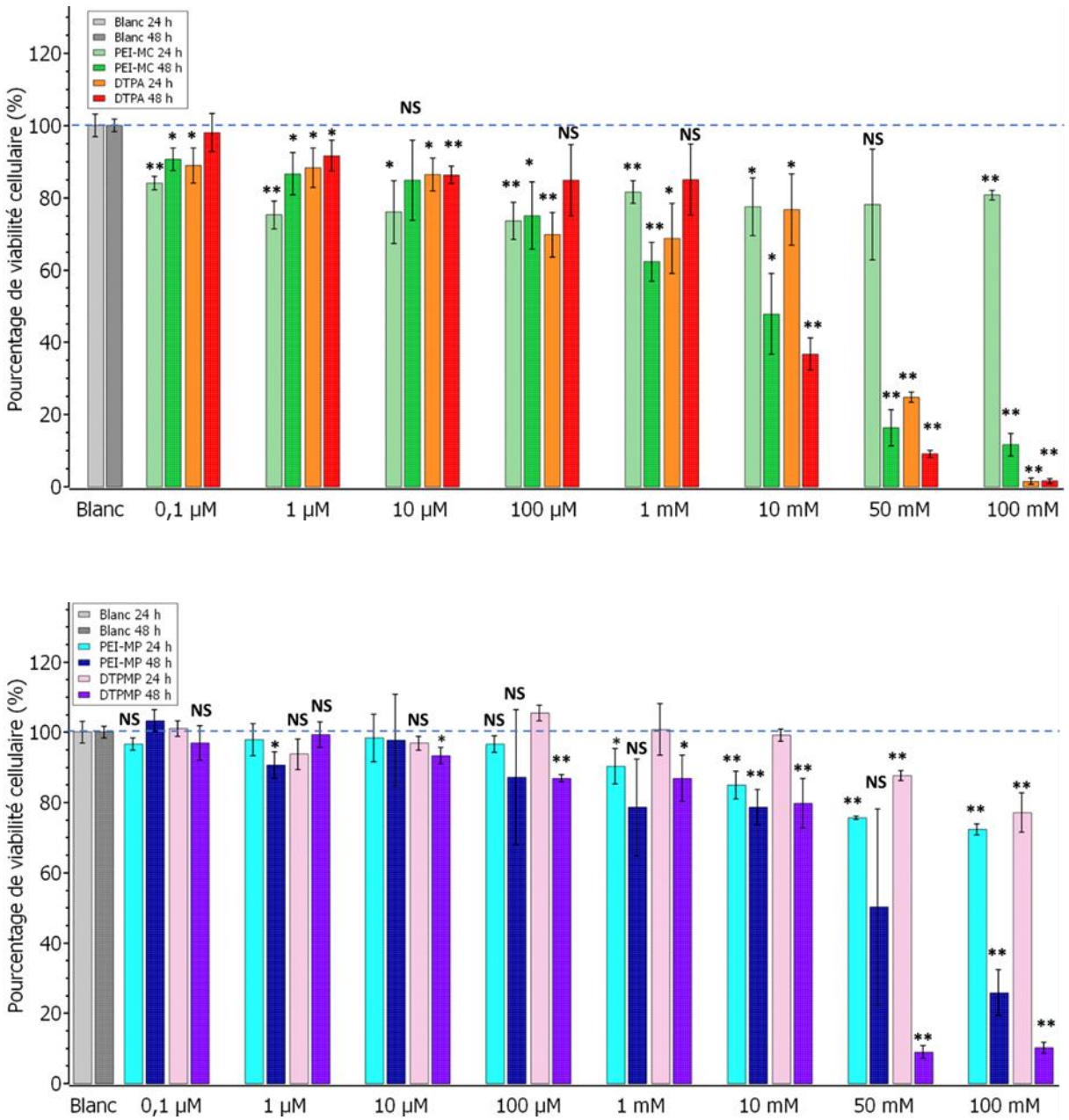


*Figure 48 : Tests de cytotoxicité sur macrophages RAW 264.7 a) PEI-MC et DTPA b) PEI-MP et DTPMP. Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type (triplicat) et ont été obtenus après deux tests indépendants. * p < 0,05; ** p < 0,005, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de viabilité inférieur au blanc.*

Les polymères chélatants, PEI-MC et PEI-MP, sont globalement bien tolérés par les macrophages RAW 264.7 jusqu'à 1 mM, même si on observe un faible cytotoxicité du PEI-MC à 1 mM (environ 60 % de viabilité cellulaire à 48 h). La toxicité apparaît dès 10 mM après 48 h avec un effet plus marqué pour le PEI-MC (48 %) que pour le PEI-MP (79 %).

Les analogues monomériques, DTPMP pour le PEI-MP et DTPA pour le PEI-MC montrent la même tendance que celle de leur analogue polymérique : à partir de 10 mM, le DTPA à base de carboxylates présente une cytotoxicité plus marquée (36 % après 48 h) que le DTPMP à base de phosphonates (80 % après 48 h).

Il est intéressant de noter que le PEI-MC présente une faible cytotoxicité dans la gamme de concentration 1-10 mM, proche de la concentration optimale (4,3 mM) obtenue lors de l'étude *in vitro* thermodynamique pour la solubilisation du Th à partir des NPs alors que pour obtenir une efficacité similaire avec le DTPA, une concentration de 26 mM était requise, concentration qui se révèle ici largement au-dessus du seuil acceptable.

Afin de mettre en place un test de décontamination *in cellulo* (polymères + NPs de Th), il faut déterminer une concentration adaptée à ce test. Cette concentration utile doit permettre une viabilité suffisante pour pouvoir mener l'expérience sur plusieurs jours tout en permettant de maintenir un rapport 1-mer chélate/Th élevé, qui puisse être susceptible de déplacer l'équilibre Th colloïdal (solide) vers Th soluble (chélaté) et donc présenter un potentiel effet thérapeutique.

A la vue de ces résultats, nous avons choisi de tester une concentration de 5 mM en 1-mer de chélate qui semble présenter un compromis acceptable par rapport aux études précédentes (cf. § II.c et expérience ci-dessus).

ii) Suivi de la viabilité sur 5 jours à une concentration de 5 mM (1-mer chélate)

La Figure 49 présente une étude de la cytotoxicité des chélates sur une durée de 5 jours, durée durant laquelle nos tests de décorporation seront réalisés.

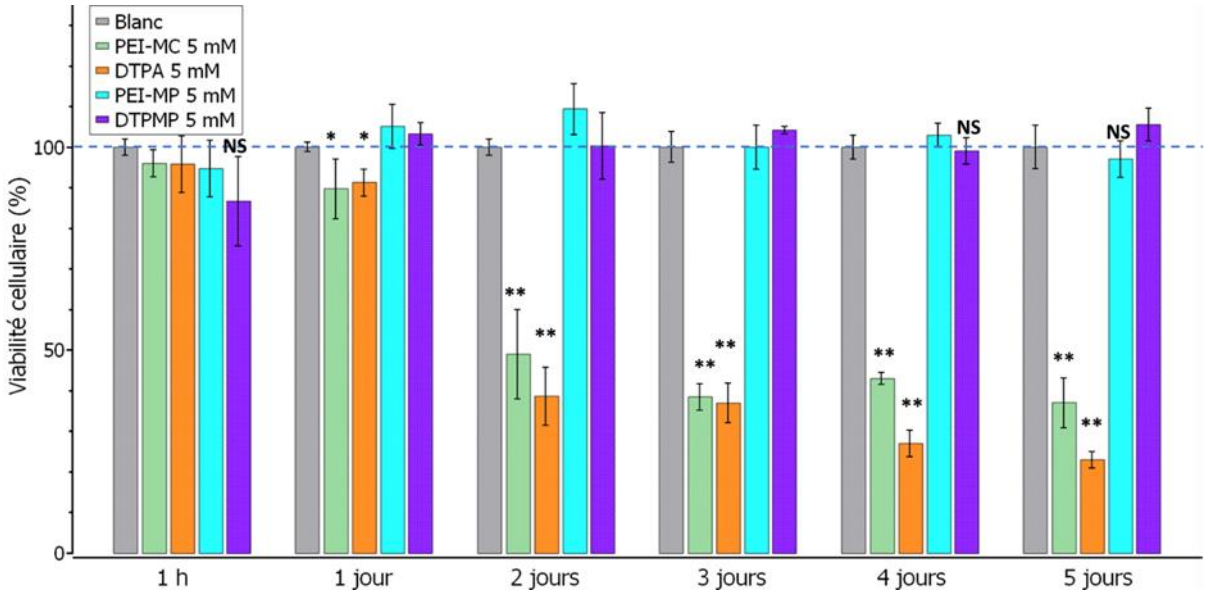


*Figure 49 : Tests de cytotoxicité sur les cellules RAW 264.7 pour une concentration de 5 mM en PEI-MC, DTPA, PEI-MP et DTPMP à différents temps d'exposition (1 h, 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours, 5 jours). Pour chaque puits, les cellules sont laissées incuber pendant 1 h avec le milieu de culture cellulaire supplémenté en molécules chélatantes (1-mer chélate : 5mM), puis rincées par une solution de PBS, du milieu de culture frais est alors ajouté. Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type (triplicat) et ont été obtenus après deux tests indépendants. * p < 0,05; ** p < 0,005, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de viabilité inférieur au blanc.*

Ces résultats confirment la différence entre les chélates à base de phosphonates, DTPMP et PEI-MP (version polymérique), et leurs homologues carboxylates (DTPA et PEI-MC). En effet, alors que la toxicité devient marquée et très significative pour les chélates à base de carboxylates dès le deuxième jour (49 ± 11 % de viabilité avec le PEI-MC contre 38,61 ± 7,14 % avec le DTPA, $p < 0,005$), le PEI-MP et le DTPMP ne présente aucun effet cytotoxique sur toute la période, et ce jusqu'à j_5. On peut également observer que la viabilité vis-à-vis du DTPA est systématiquement plus faible que celle observée avec son homologue polymérique.

On peut en effet noter qu'avec le PEI-MC, la viabilité moyenne sur la période j_3-j_5 est d'environ 40 % et qu'elle demeure stable, tandis qu'elle est de l'ordre de 30 % avec le DTPA mais qu'elle ne cesse de décroître. Plus globalement, ces résultats pourraient résulter d'une différence d'internalisation des chélates à base de fonctions phosphonates par rapport aux chélates à base de fonctions carboxylates : les premiers seraient peu ou pas internalisés et donc moins toxiques. Cette étude devra être complétée par une ou des expérience(s) permettant de visualiser et/ou quantifier la capacité d'internalisation des chélates. On pourrait par exemple envisager un suivi par microscopie confocale de fluorescence ou par cytométrie en flux suite à un marquage adéquat pour apporter une réponse à cette question.

V Test de décontamination sur macrophages RAW 264.7

La dernière étape de la méthodologie que nous avons appliquée consiste à évaluer la capacité des polymères chélatants à ralentir voire empêcher l'internalisation des nanoparticules de Th dans les macrophages dans le cas d'un traitement per-internalisation NPs (pendant la phase initiale de la phagocytose et de l'internalisation des NPs) ou à augmenter l'excrétion de Th *via* leur solubilisation/chélation dans le cas d'un traitement post-internalisation des NPs. Ces tests *in cellulo* constituent une première étape vers la décorporation pulmonaire de radionucléides, dont les particules insolubles de plutonium (PuO_2), chez l'être humain.

Une description plus détaillée de ces deux types d'expériences, per- et post-internalisation NPs est donnée ci-dessous :

- L'expérience per-internalisation NPs consiste en la contamination des macrophages RAW 264.7 par les NPs de Th durant 30 minutes (initiation de la phagocytose), puis à l'ajout de la contre-mesure (DTPA, DTPMP, PEI-MC ou PEI-MP) pendant 1 h. Le milieu est ensuite rincé, puis dosé en Th par ICP-MS. Les cellules sont ensuite laissées à incuber avec du milieu frais qui est dosé, après lavage, toutes les 24 h jusqu'à 120 h. Le 1er point est donc à 1 h 30 puis 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 120 h ... En parallèle, la cytotoxicité est mesurée à chaque temps d'incubation respectifs grâce à des tests à la résazurine et comparée à deux types de contrôles : macrophages en l'absence de NPs de Th et de chélates et macrophages en l'absence de NPs de Th mais en présence de chélates (cf. § IV.b.).

Là encore, et afin de s'assurer que l'on retrouve bien les 100 % du Th à la fin de l'expérience et valider l'absence de sorption du Th sur les parois des puits, les cellules sont minéralisées et dosées en Th (voir annexe X). Chaque expérience est indépendante, réalisée 2 fois, il y a 3 puits par temps d'incubation respectif soit un total de 6 échantillons par temps d'incubation. Cette expérience vise à reproduire des conditions dans lesquelles les contre-mesures pourraient être administrées, rapidement, après une contamination.

- L'expérience post-internalisation NPs consiste quant à elle à contaminer les macrophages par des NPs de Th durant 1 h, à rincer, puis à ajouter la contre mesure. Ainsi on s'assure que lors de l'application de la contre-mesure, il n'y ait plus de NPs dans le milieu extracellulaire et que l'internalisation des NPs est bien terminée (cf. § III a). Comme dans l'expérience précédente, un suivi des taux de Th extracellulaire (et intracellulaire, 100 %, voir annexe X) sera réalisé par dosage par ICP-MS, ainsi qu'un suivi de la cytotoxicité.
  Cette expérience vise à mimer une approche plus conventionnelle liée à l'utilisation d'un traitement post-accident.

Une schéma résumant l'ordonnancement de ces deux expériences est représenté en Figure 50. Le détail des protocoles est répertorié en partie expérimentale (§ D.V.)

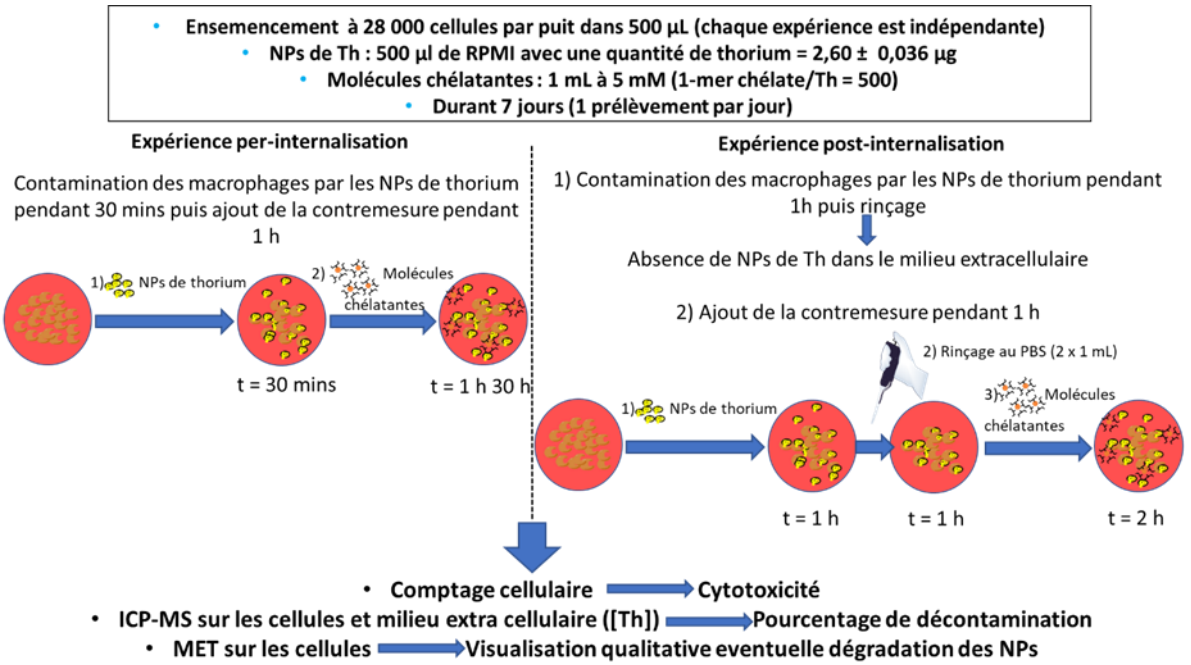


Figure 50 : Représentation schématique des expériences de décontamination des NPs de Th par les chélates.

a. Etudes de la viabilité cellulaire en fonction du traitement per-internalisation ou post-internalisation des NPs de thorium

La cytotoxicité a été évaluée à 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 120 h pour une quantité de NPs de Th de 2,60 ± 0,04 µg et une concentration en 1-mer de chélates (DTPA, DTPMP, PEI-MC et PEI-MP) de 5 mM (durée d'exposition des molécules chélatantes : 1 h). La quantité de Th a été volontairement réduite par rapport aux expériences de décontamination *in vitro* afin d'augmenter le rapport 1-mer chélate/Th de 500 pour 1.

La cytotoxicité des chélates a été évaluée par un test à la résazurine. Les résultats à j_5 sont présentés en Figure 51.

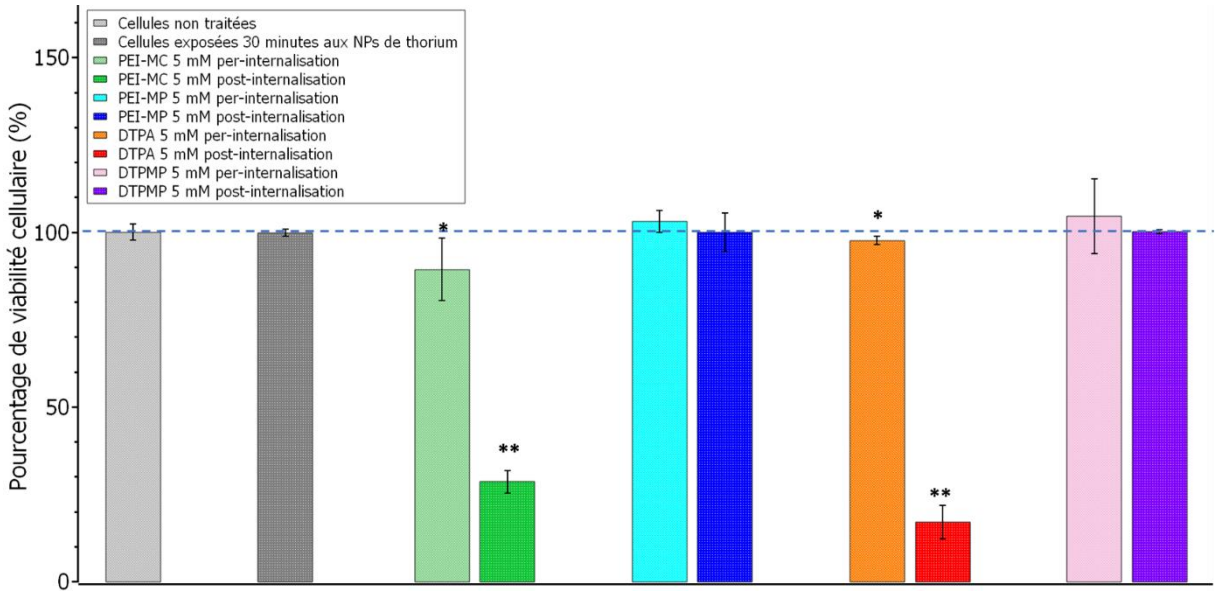


*Figure 51 : Cytotoxicité des chélates à j_5 sur les macrophages contaminés par les NPs de Th en conditions per-internalisation NPs (ajout des chélates 30 minutes après contamination sans rinçage) et en conditions post-internalisation des NPs (ajout 1 h après contamination et rinçage). Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type (triplicat) et ont été obtenus après deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de viabilité inférieur au blanc.*

Tout d'abord, on retrouve, pour le blanc (Raw + NPs de thorium), les résultats précédents (cf. § IV.a) : pas de toxicité associée à la phagocytose des NPs sur la durée du test.

Une distinction très nette apparait ensuite entre les deux traitements. Les résultats sont très similaires à ceux de l'étude précédente (cf. § IV.b) en ce qui concerne le traitement post-internalisation NPs (lorsque les chélates sont administrés après que l'internalisation des NPs ne soit terminée). On retrouve en effet que les carboxylates, PEI-MC ou pire le DTPA, présentent une toxicité élevée avec respectivement 29 et 17 % de viabilité résiduelle à j_5 tandis que les phosphonates ne montrent aucun effet (100 % pour les deux).

Il en est tout à fait différemment en ce qui concerne le traitement per-internalisation des NPs (administration des chélates avant la fin de l'internalisation des NPs), puisque globalement, aucun chélate ne présente d'effet toxique même si la viabilité est légèrement inférieure dans le cas des carboxylates ($p < 0,05$), 95 % (DTPA) et 90 % (PEI-MC). Ces résultats semblent indiquer que les chélates ne sont pas internalisés de la même façon dans les deux traitements et on peut fort vraisemblablement supposer que, dans le traitement per-internalisation NPs , ils entrent par l'intermédiaire des NPs. Autrement dit, dans le traitement per-internalisation NPs, ce sont des NPs de Th tapissées de chélates qui sont phagocytées. Ceci a pour effet de considérablement diminuer leur toxicité (pour les carboxylates du moins). Ceci pourrait néanmoins constituer un avantage. En effet, cela permettrait de cibler directement le Th mobilisable et de suivre exactement le même cheminement/trafic intracellulaire. Au contraire, rien ne certifie que les chélates qui rentreraient dans les macrophages après que l'internalisation des NPs de Th n'ait été effective (traitement post-internalisation NPs) ne suivent les mêmes voies et donc qu'ils puissent *in fine* interagir avec le Th intracellulaire. L'inconvénient résulte en la fenêtre de traitement très restreinte qui en découlerait.

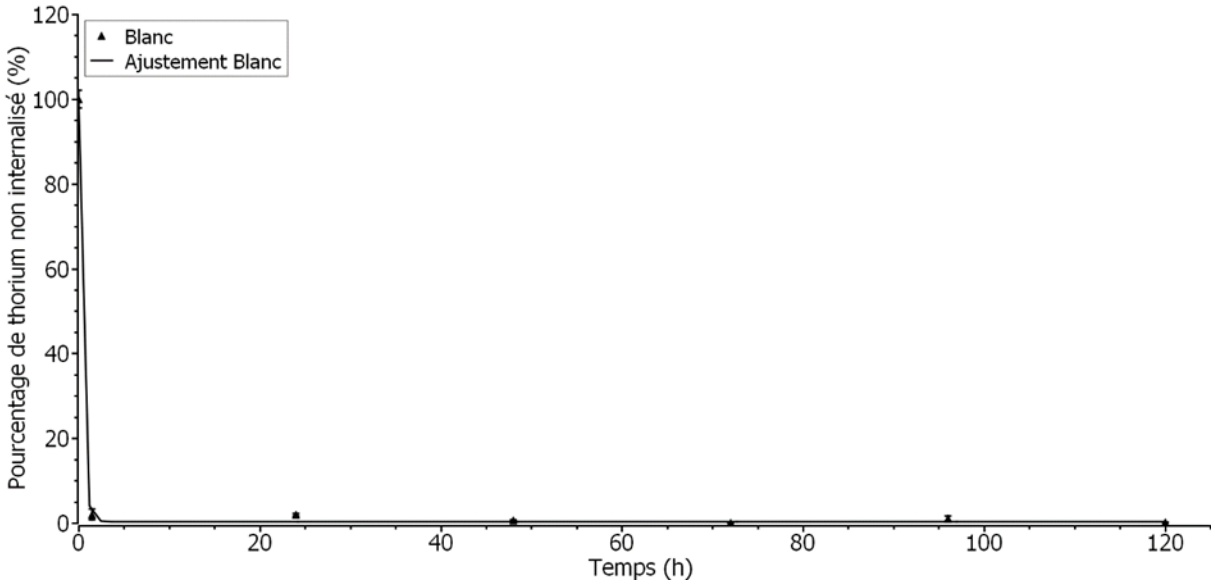
b. Effet du traitement per-internalisation NPs

L'efficacité des contre-mesures en conditions per-internalisation NPs (administration avant que l'internalisation des NPs ne soit totalement terminée) a aussi été évaluée par dosage du Th non internalisé (dans le milieu extracellulaire) à différents temps *via* ICP-MS. Les résultats, avec les quatre différents chélates, peuvent être comparés entre eux de manière fiable car le traitement per-internalisation NPs des macrophages présente très peu de variabilité en termes de toxicité. Cette dernière pouvant être considérée quasi nulle dans les conditions de l'expérience. Ces résultats sont présentés sur la Figure 52. Les courbes ont pu être ajustées par une équation de type décroissance monoexponentielle de la forme : Réponse = $y_f + y_0e^{(-kt)}$ avec Réponse = % Th non internalisé (par rapport à la concentration en Th initiale) à t ; y_f = % Th non internalisé à t final, fixé à 0,3 (moyenne du pourcentage de thorium extracellulaire à j_5) ; y_0 = % Th non internalisé en conditions initiales (fixé à 100 %) ; t = temps (h) ; k = constante de vitesse (plus k augmente plus l'internalisation est rapide). Les valeurs des paramètres d'ajustement correspondant pour chacune des conditions sont présentées ci-dessous (Tableau 16).

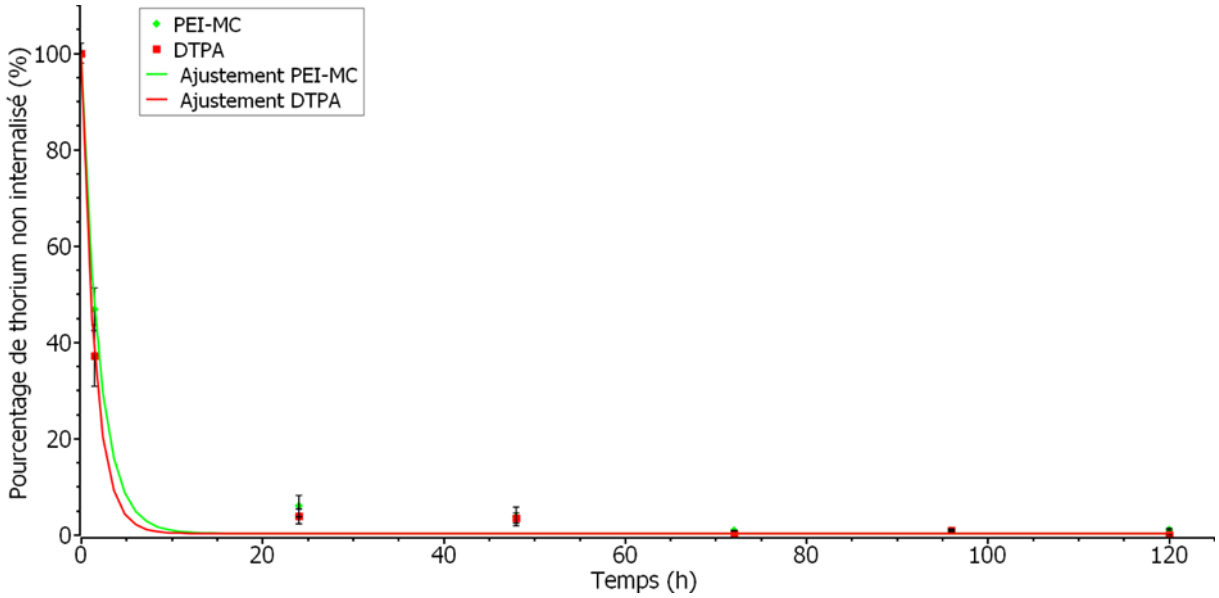
Tableau 16 : Paramètres d'ajustement des courbes de dosage du Th non internalisé pour NPs-Th-Cellules (blanc, sans chélates), PEI-MC-NPs-Th-Cellules ; DTPA-NPs-Th-Cellules ; PEI-MP-NPs-Th-Cellules ; DTPMP-NPs-Th-Cellules.

Paramètres	y_f	y_0	k	R^2
Blanc	0,3 (fixé)	100 (fixé)	2,71 ± 0,03	0,98
PEI-MC-NPs-Th-Cellules	0,3 (fixé)	100 (fixé)	0,51 ± 0,04	0,99
DTPA-NPs Th-Cellules	0,3 (fixé)	100 (fixé)	0,66 ± 0,04	0,99
PEI-MP-NPs-Th-Cellules	0,3 (fixé)	100 (fixé)	0,38 ± 0,04	0,99
DTPMP-NPs-Th-Cellules	0,3 (fixé)	100 (fixé)	0,41 ± 0,02	0,99

a)



b)



c)

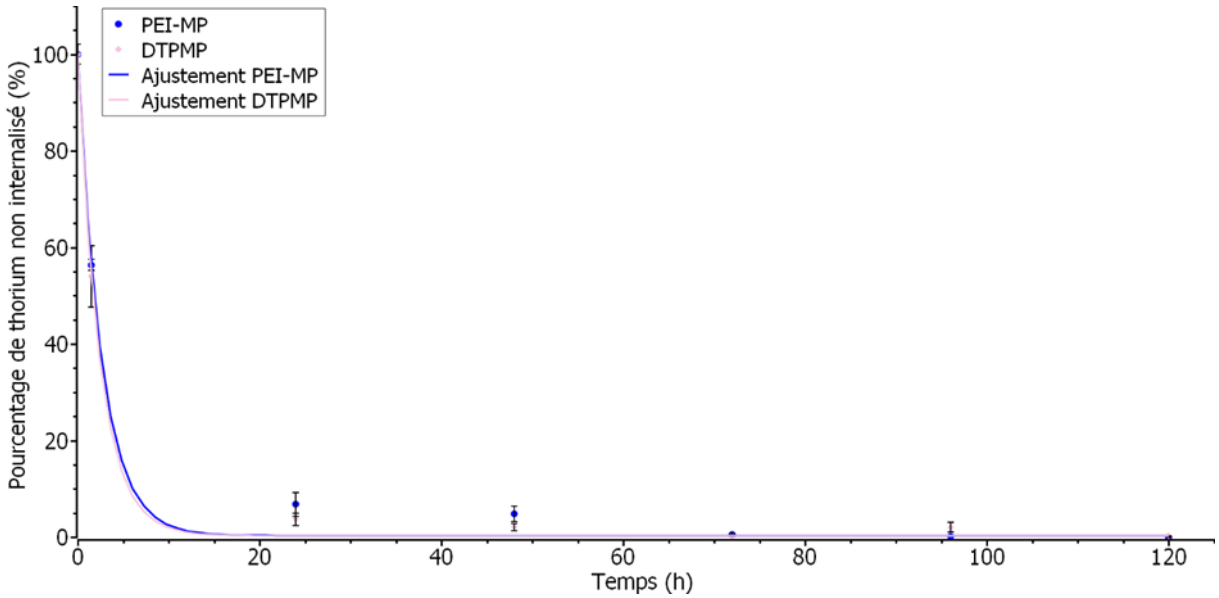


Figure 52 : Courbes de dosage du Th non internalisé en fonction du temps pour une concentration en chélates de 5 mM dans 1 mL de RPMI et une quantité de Th de 2,60 ± 0,04 µg. a) Blanc (NPs sans chélates) b) PEI-MC et DTPA c) PEI-MP et DTPMP.

Même s'il manque indéniablement un certain nombre de points dans les premières heures, on peut tirer quelques conclusions fondamentales de cette expérience.

Premièrement, on ne peut pas véritablement parler de décontamination. En effet, quelles que soient les conditions utilisées dans cette expérience, l'internalisation par les macrophages ne s'arrête jamais. C'est un processus continu qui se poursuit tout au long de l'expérience. D'autre part, il n'y a pas, durant le temps imparti, de relargage de Th.

Deuxièmement, le fait de récupérer des taux de Th différents selon les conditions provient d'une différence dans la vitesse d'internalisation des NPs. On peut rappeler que les chélates sont ajoutés 30 min après les NPs de Th. Donc, même si un certain nombre de ces NPs ont déjà été internalisées, on suppose qu'il en reste lors de l'ajout des chélates. On observe alors que k NPs PEI-MP < k NPs DTPMP < k NPs PEI-MC < k NPs DTPA << k NPs seules. Sachant que k correspond à une constante de vitesse, on peut donc constater que l'internalisation des nanoparticules de thorium seules est beaucoup plus rapide que lorsqu'on ajoute un agent chélatant, quel que soit l'agent chélatant : les agents polymériques : PEI-MC et PEI-MP, ou ceux monomériques : DTPA et DTPMP.

Ces résultats peuvent s'expliquer par une modification de la charge de surface des nanoparticules de Th disponibles lors de l'ajout des chélates. En effet, lors de leur internalisation, elles vont rencontrer la double membrane phospholipidique des macrophages, présentant des groupements phosphates à la surface, chargés négativement. L'internalisation des NPs témoins (sans chélates) est la plus rapide. Ceci résulte de la charge de surface qui est positive pour les NPs de thorium (potentiel zêta : +30 mV), ce qui facilite leur internalisation. Au contact des molécules chélatantes, la charge de surface des NPs de thorium va évoluer et se charger négativement, ce qui va entrainer une diminution de leur incorporation. En prenant en compte la formule brute du PEI-MC (partie expérimentale B.III), sachant que le pKa de sa fonction carboxylique se situe autour de 3,5, bien en deçà du pH du milieu de culture (7,4), on peut considérer qu'il sera totalement déprotoné, avec donc une charge d'environ -2 par monomère (en prenant en compte la protonation de l'amine « centrale »). Pour le DTPA, en prenant en compte les pKa des différents acides carboxyliques et la protonation de deux des trois amines, un diagramme de spéciation donne une formule de type H_2L^{3-} à pH 7,4.[200] Le même raisonnement s'applique pour les molécules de type phosphonates. En prenant en compte la formule brute (partie expérimentale B.III), on peut considérer que le PEI-MP possède une charge de -4, à pH 7,4, tandis que pour le DTPMP, on peut considérer qu'on obtient au moins 90 % de la forme chargée négativement 7 fois à pH 7,4.[201]

Bien que plus négatif, on peut penser que le DTPMP, beaucoup plus petit, soit plus facile à déplacer que le PEI-MP. Ceci pourrait expliquer la valeur de la constante de vitesse qui est plus faible pour le polymère chélatant.

Au global, on constate donc que les NPs décorées par les carboxylates apparaissent moins chargées négativement que celles de type phosphonates, ce qui, dans les conditions d'expériences, explique que les NPs décorées par les carboxylates soient internalisées plus rapidement que celles à base de phosphonates. D'autres part, on note que les polymères chélatants étant plus difficiles à échanger que leurs homologues monomériques, les NPs décorées par les références (DTPA et DTPMP) sont internalisées plus rapidement que leur homologue polymérique respectif (PEI-MC et PEI-MP). Tout ceci permet d'expliquer la série expérimentale observée : k NPs PEI-MP < k NPs DTPMP < k NPs PEI-MC < k NPs DTPA << k NPs seules.

Un traitement, avec une administration des chélates à t = 0, aurait probablement permis de diminuer la constante de vitesse, et donc de diminuer encore la vitesse d'internalisation des nanoparticules de thorium, même s'il est difficilement envisageable, en cas de contamination par inhalation, d'administrer un traitement aussi rapidement sur une large partie de la population.

Même si cette expérience ne montre pas de réelles capacités de décontamination des polymères chélatants, elle permet indéniablement de montrer qu'un traitement par nos polymères chélatants permettraient de retarder l'internalisation des nanoparticules de thorium. Par ailleurs, comme déjà supposé lors de l'expérience de cytotoxicité (§ V.a), cette internalisation conjointe des NPs de thorium et des polymères chélatants devrait permettre leur colocalisation au sein de la cellule et donc une interaction avec le Th « disponible » au sein de la cellule, en vue de son éventuelle excrétion. Ces deux points, retard à l'internalisation et interaction spécifique des chélates avec leur cible actinide, constituent donc une base pour de futurs développements.

c. Effet du traitement post-internalisation NPs

L'efficacité des contre-mesures en conditions post-internalisation NPs (administration des chélates après que l'internalisation des NPs ne soit totalement terminée) a aussi été évaluée par dosage du Th extracellulaire à différents temps *via* ICP-MS. A la vue de la variabilité en termes de toxicité entre les molécules de types phosphonates et les molécules de type carboxylates pour des temps d'expériences supérieurs à 24 h, les résultats seront divisés en deux parties.

Ce qui suit constitue vraiment des résultats préliminaires dont les conclusions doivent être tirées avec précaution. Ils ont néanmoins le mérite de faire clairement apparaître les limites et les difficultés d'une telle approche.

La première partie porte uniquement sur le pourcentage de thorium extracellulaire aux temps faibles (t : 1 h et t : 24 h) qui permet de raisonner sur l'ensemble des molécules chélatantes. La seconde partie est restreinte aux phosphonates, PEI-MP et DTPMP, qui ne présentent pas, ou très peu, de toxicité tout au long de l'expérience (jusqu'à j_5).

i) Etude sur les temps faibles (1 h et 24 h)

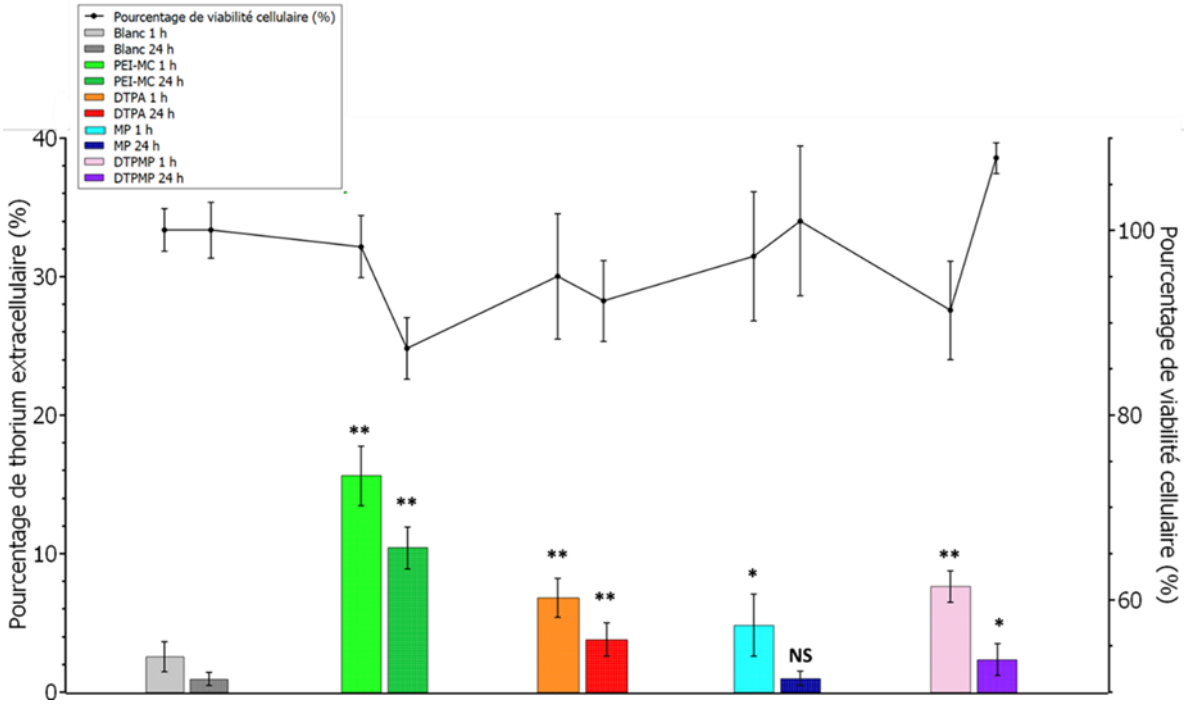


*Figure 53 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium extracellulaire ainsi que le pourcentage moyen de viabilité cellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en PEI-MC, DTPA, PEI-MP ou DTPMP, à 1 h et à 24 h. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur 2 expériences indépendantes (n=3 par expériences). * p < 0,05 ; ** p < 0,005, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de décorporation supérieur à celui du blanc. Le détail de ces test est disponible en partie expérimentale § D.V.a.*

Tout d'abord, quel que soit le temps, une heure ou une journée, on constate, pour le blanc, l'absence de thorium dans le milieu extracellulaire (2,40 ± 1,00 % à 1 h et 0,92 ± 0,48 % à j_1).

Ces résultats concordent avec ceux de l'expérience de phagocytose (§ III.a), la contamination par des nanoparticules de thorium à cette concentration ([Th] : 0,015 µM) est donc tout à fait répétable et nous sommes donc bien dans le cadre d'un traitement post-internalisation de type curatif.

Cependant, contrairement à l'expérience précédente (traitement per-internalisation) où le taux de Th extracellulaire ne cessait de diminuer de façon exponentielle à des vitesses différentes selon la fonctionnalisation des NPs, on observe ici des pics accrus de Th extracellulaire que l'on peut selon toute vraisemblance attribuer aux différents chélates. En effet, après 1 h, on observe un pic significatif de Th extracellulaire pour tous les chélates. On note cependant que l'effet est plus marqué pour les carboxylates par rapport aux phosphonates et que le PEI-MC montre l'effet le plus important avec un taux de thorium plus de deux fois plus élevé, 15,6 ± 2,2 %, contre 6,8 ± 1,4 % pour le DTPA. Le PEI-MP présente le taux le plus faible, (4,8 ± 2,2 %). On peut rajouter que les taux de DTPA, DTPMP et PEI-MP ne sont pas foncièrement différents entre eux contrairement à celui du PEI-MC ($p < 0,005$) qui est significativement différent de ceux des autres chélates. Quoiqu'il en soit, et à la vue de la faible toxicité de tous ces chélates à 1 h, il semble bien y avoir un effet du traitement post-internalisation. Malheureusement, cet effet se voit compenser au fur et à mesure dans le temps par la phagocytose perpétuelle des macrophages. En effet, à 24 h, la courbe garde, globalement le même profil mais avec une atténuation de la quantité de Th extracellulaire. Les quantités de Th extracellulaire supérieures pour les chélates de type carboxylates pourraient être attribuées à leur toxicité plus élevée qui commence à s'exercer dès 24 h.

Les résultats concernant les temps supérieurs à 24 h (j_2, j_3, j_4, j_5), sont difficilement interprétables en raison de la cytotoxicité accrue du PEI-MC et du DTPA. Ils sont néanmoins consultables en annexe X. Il est bien évident qu'il sera nécessaire d'effectuer ces expériences avec une concentration en molécules chélatantes plus faible afin de pouvoir comparer cet effet décontaminant sur de plus longues durées.

D'autre part, pour éviter le biais lié au phénomène continu de phagocytose, on pourrait envisager, à la manière de l'étude menée par A. Van der Meeren,[194] de réaliser ces tests dans des cellules doublement compartimentées séparées par une membrane semi-perméable. Cependant, dès lors que l'excrétion, *in vivo* se verrait être compenser par la phagocytose liée au recrutement de nouveaux macrophages, on est en droit de se poser la question de la pérennité d'une telle approche.

ii) Le cas des phosphonates

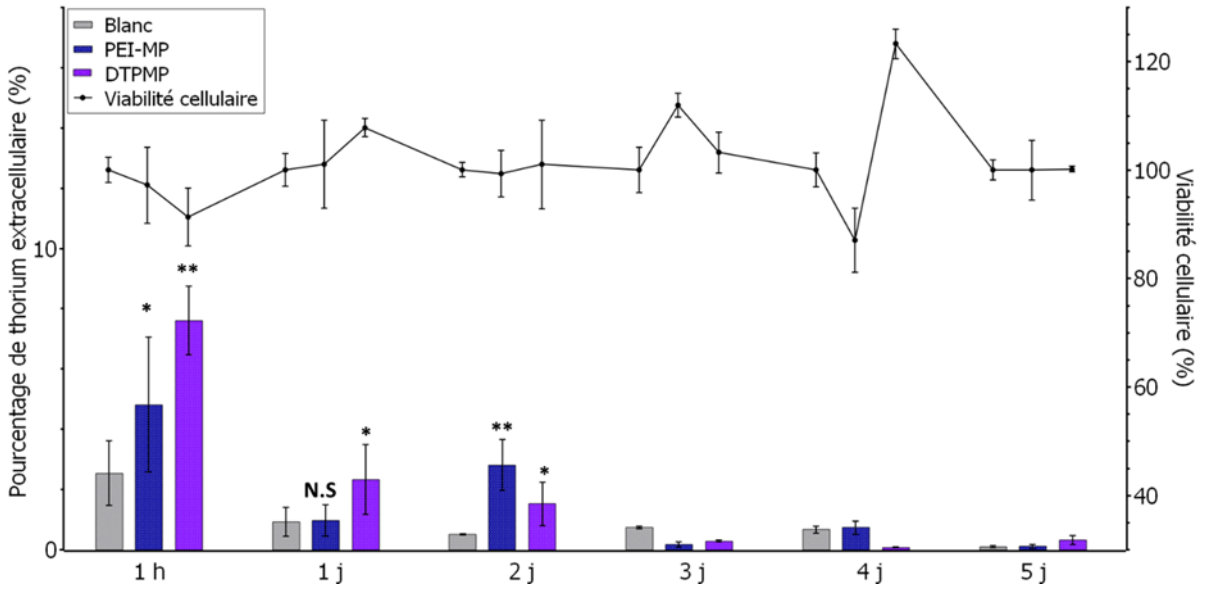


*Figure 54 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium extracellulaire ainsi que le pourcentage moyen de viabilité cellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en PEI-MP ou DTPMP, à différents temps (1 h, 1 j, 2 j, 3 j, 4 j, 5 j). Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur 2 expériences indépendantes (n=3 par expériences). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, NS (non significatif), selon le test-t de comparaison des moyennes (test de Student lorsque les variances ne sont pas significativement différentes, ou test de Welch dans le cas contraire) dans le cas d'un pourcentage de décorporation supérieur au blanc.*

Comme pour les temps inférieurs à 2 jours (1 h et 24 h) nous retrouvons bien une absence de thorium dans le milieu extracellulaire (inférieur à 1 % sur toute la période de 2 jours à 5 jours).

Le PEI-MP et le DTPMP ne montrent pas de cytotoxicité significative tout au long de cette étude, comme laissait supposer les expériences d'études de la viabilité des macrophages en présence de chélates (§ IV.b). Il est donc plus aisé de comparer les résultats entre eux.

Ainsi le deuxième jour, on observe un faible effet décontaminant du PEI-MP (2,8 ± 0,8 %, $p < 0,005$), contre moins de 2 % (1,52 ± 0,72 %, $p < 0,05$) pour le DTPMP.

Ce pourcentage de thorium « décontaminé » reste quand même faible par rapport au blanc. Au vu des expériences de cytotoxicité, dans lesquelles on observe peu de cytotoxicité du PEI-MP et du DTPMP, on peut s'interroger encore une fois sur une réelle internalisation de ces deux molécules par les macrophages.

Au-delà de 2 jours, nous n'observons plus d'effet décontaminant de ces deux molécules.

En raison de la faible cytotoxicité de ces 2 molécules, il serait envisageable d'augmenter la concentration des molécules chélatantes de type phosphonates, notamment pour le PEI-MP qui présente une très faible cytotoxicité à 10 mM à 48 h selon notre étude (§ IV.b).

VIConclusion

Cette étude, centrée sur la contamination par des nanoparticules insolubles de thorium, a permis dans un premier temps de déterminer des paramètres clés lors de la contamination de macrophages par des particules insolubles d'actinides, ainsi que d'entrevoir des pistes sérieuses sur la décontamination de ces mêmes macrophages par nos polymères chélatants.

Lors de cette étude, nous avons réussi à synthétiser deux types de nanoparticules de thorium : un mélange de d'oxydes et hydroxydes de thorium, et des oxydes uniquement. Ces nanoparticules, présentant des tailles centrées autour de 55 nm et une faible polydispersité, ont été utilisées lors d'une étude thermodynamique *in vitro* concernant le déplacement de l'équilibre thorium solide/ thorium chélaté par nos polymères chélatants. Le PEI-MC a montré la plus grande efficacité pour la plus faible concentration.

En parallèle, un suivi *in cellulo* de la phagocytose par des macrophages des nanoparticules de thorium a permis de déterminer leur capacité d'internalisation, la durée de cette internalisation mais aussi de constater l'absence d'exocytose des NPs de thorium. Il s'est avéré que cette internalisation est massive et rapide (< 1 h), et que les NPs se retrouvent localisées *in fine* au sein du cytoplasme des macrophages, rendant difficile leur décontamination. Ces paramètres sont essentiels en vue d'envisager la bonne fenêtre de traitement.

En combinant l'étude thermodynamique et le suivi *in cellulo* de la phagocytose, une première approche *in cellulo* concernant l'utilisation de nos polymères chélatants a été testée.

Ainsi deux expériences ont été réalisées :

- Une expérience dans laquelle les nanoparticules de Th sont additionnées et les contre-mesures sont administrées sur les macrophages en même temps. Ceci constitue un traitement per-internalisation

- Une expérience dans laquelle les NPs de Th sont d'abord additionnées sur les macrophages puis, une fois l'internalisation totale effectuée, les molécules chélatantes sont administrées. Ceci constitue un traitement post-internalisation.

Bien que d'autres expériences soient nécessaires avant de pouvoir définitivement conclure, l'étude per-internalisation permet indéniablement de montrer qu'un traitement par nos polymères chélatants permettrait de retarder l'internalisation des nanoparticules de thorium.
L'étude post-internalisation nécessite d'être réalisée de nouveau à des concentrations en molécules chélatantes pour lesquelles aucune cytotoxicité n'apparait.

Néanmoins, il semblerait que le PEI-MC provoque une excrétion transitoire des nanoparticules de thorium.

Chapitre III : Partie expérimentale

A.Réactifs et analyses

L'acide bromoacétique (reagent grade, 97 %), le carbonate de sodium, l'acide chlorhydrique (37 %, 99,999 % trace metals basis), l'acide phosphoreux H_3PO_3, le polyéthylèneimine (bPEI, MW ~25 kDa by LS, Mn ~ 10 kDa by GPC) le paraformaldéhyde (poudre, 95 %), la poudre d'hydroxyapatite nanocristalline (taille de particules < 200 nm (BET), ≥ 97%, synthétique), le tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Trizma® Pre-Set Crystals, BioPerformance, pH 7,4) le chlorure de sodium (BioPerformance, ≥ 99 % (titration)), le bicarbonate de sodium (poudre, ReagentPlus®, ≥ 99,5 %), le carbonate de sodium (poudre, ACS reagent, anhydrous, ≥ 99,5 %), le polyéthylène, l'alpha cellulose (microcrystalline, poudre), le glycérol (≥ 99,5%) l'urée (ACS reagent, 99,0-100,5 %) et le nitrate de thorium ($Th(NO_3)_4.5H_2O$) proviennent de chez Merck (Sigma-Aldrich).

L'acide nitrique (67-70 %, Plasmapure plus degree) et les solutions standards pour ICP-IMS proviennent de SCP Science et Honeywell Fluka.

Les purifications des polymères fonctionnalisés ont été réalisées par ultrafiltration à l'aide d'une cellule agitatrice (Millipore, 76 mm) équipée de membranes d'ultrafiltration (Pall corporation, Omega™ membrane, réf : OM005076, 5 kDa MWCO).

Les analyses par ICP-MS ont été faites sur un ICP-MS ELAN 9000 (Perkin Elmer). La quantification du thorium a été effectuée au moyen d'une calibration externe en utilisant des solutions étalons de thorium dans l'acide nitrique 1,5 % (HNO_3) préparées à partir de la solution standard ICP-MS Th (SCP Science, plasmaCAL).

La quantification du sodium a été effectuée au moyen d'une calibration externe en utilisant des solutions étalons de sodium dans l'acide nitrique 1 % (HNO_3) préparées à partir de la solution standard ICP-MS Na (Honeywell Fluka).

Les analyses d'absorption atomique ont été faites sur un ICP-OES (Perkins Elmer Optima 8000) avec un débit d'argon pour le plasma : 8 $L.min^{-1}$, débit d'argon pour le nébuliseur : 0,70 $L.min^{1}$, débit de l'échantillon 1 $mL.min^{-1}$. Les longueurs d'ondes observées pour le dosage de phosphore sont les suivantes : 213 et 215 nm.

Les images obtenues par microscopie électronique en transmission ont été faites avec un microscope électronique à transmission (MET) JEOL JEM 1400.

Les analyses par spectrophotométrie UV-visible ont été réalisées sur un appareil SpectroMax 190 Absorbance Microplate Reader.

Le rayon hydrodynamique des nanoparticules de Th a été analysé par diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer Nano, Malvern) à un angle de de 173 ° et une longueur d'onde égale à λ = 633 nm à 25 °C. Les solutions de nanoparticules de Th ont préalablement été filtrées sur filtre seringue de cellulose régénérée (0,2 µm porosité).

Les analyses par thermogravimétrie (ATG) ont été effectuées sur un appareil Mettler-Toledo 851^{e} et les données ont été traitées grâce à l'utilisation du logiciel STAR©. Les échantillons lyophilisés (10 mg) ont été placés dans des creusets en alumine de 70 µL. Rampe de température : 25-800 °C, 5°C/min sous flux d'azote (N_2) débit : 50 mL.min^{-1}.

L'analyse élémentaire a été réalisée sur un analyseur CHNS/O Thermo Electron Flash EA 1112 Series (Thermo Fischer).

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

Les analyses par chromatographie ionique ont été effectuées sur un appareil Metrohm 761 compact, équipé d'une colonne Metropsep Anion Dual (3 x 150 mM), éluant : 2,4 mmol/L $NaHCO_3$ 2,5 mmol/L Na_2CO_3 + 2% acétone (conductivité après suppression chimique approximative : 16 µS/cm) pour la détermination de la quantité de chlore par monomère de PEI chélatant.

Les minéralisations des échantillons ont été réalisées grâce à un Digiprep (DigiPREP MS, 50 mL 48 Pos, SCP Science) dans des tubes en polypropylène de 50 mL (DigiTUBEs 50 mL).

Un four à micro-ondes (ETHOS UP microwave digestion system, Milestone) équipé d'un rotor haute pression (SK-15 easyTEMP, Milestone) a été utilisé pour l'étape de formation des nanoparticules de thorium. Les solutions contenant les nanoparticules ont été placées dans des contenants de 100 mL résistants aux hautes pressions (TFM, Milestone).

La calcination des nanoparticules de thorium a été réalisée dans un four à moufle (Nabertherm modèle L 3/11).

B. Synthèses des polymères chélatants

I Synthèse du PEI-MC

La synthèse du PEI-MC a été adaptée du protocole déjà utilisé au sein de notre équipe par F. Lahrouch.[109] Elle est présentée en Figure 55.

Le PEI branché 25 kDa (10 g, 77,40 mmol de forme monomère $C_6H_{15}N_3$) est dissous dans une solution de 500 mL de carbonate de sodium (0,1 M). L'acide bromoacétique (55,5 g, 387,6 mmol, 5 eq) dilué dans l'eau ultrapure (50 mL) est ajouté goutte à goutte sous agitation constante. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Il est ensuite acidifié avec une solution de HCl (2 M) jusqu'à neutralité (pH 7) puis purifié par ultrafiltration (5 kDa MWCO) en 3 étapes. Premièrement, le mélange réactionnel neutralisé est purifié (sous pression adéquate) à travers la membrane d'ultrafiltration, puis le résidu est rincé avec une solution saturée de chlorure de sodium (250 mL) et rincé deux fois à l'eau ultrapure (2 x 250 mL). Enfin le produit est lyophilisé et conservé sous atmosphère inerte (argon) pour éviter l'humidité. 26 g de polyéthylèneimine méthylcarboxylate sous forme de sel de sodium ont pu être isolés (η : 97 %).

^{1}H RMN (400 MHz; D_2O) : 2,61-4,30 ppm (25 H, m, -CH_2-CH_2-N-CH_2-COO^-)

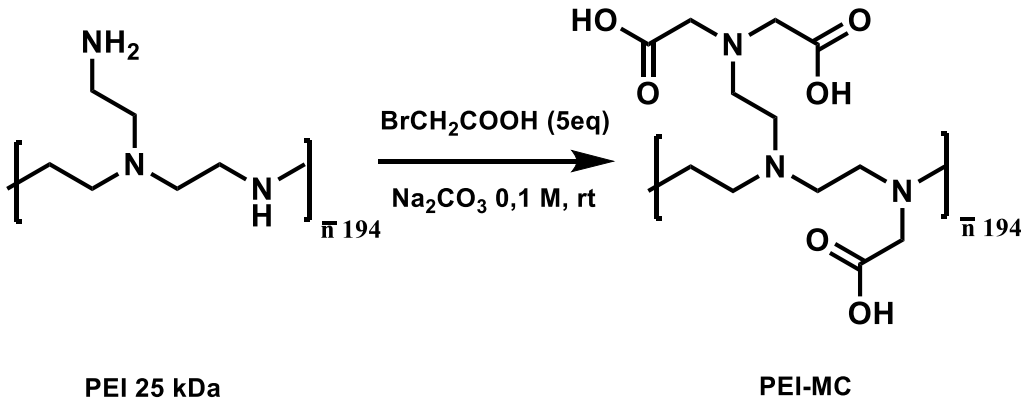


Figure 55 : Schéma de synthèse du PEI-MC (Note : l'état de protonation n'a pas été considéré).

II Synthèse du PEI-MP

La synthèse du PEI-MP a été réalisée selon une reaction de type Mannich (Figure 56).[202] Ici le formaldéhyde a été remplacé par du paraformaldéhyde afin de controler précisement le nombre d'équivalent utilisé (en s'affranchissant de l'eventuelle polymérisation présente au sein d'une solution de formaldehyde déjà utilisée).

De l'acide phosphoreux H_3PO_3 (19,1 g, 0,233 mol, 3 eq), est dissous dans une solution d'acide chlorhydrique concentrée 12 M (50 mL) et le mélange est chauffé à 80 °C, puis du paraformaldéhyde (15,9 g, 0,5 mol, 6,5 eq) dispersé dans de l'eau (30 mL) est ajouté goutte à goutte au mélange réactionnel. Le PEI branché 25 kDa (10,0 g, 77,40 mmol, 1 eq) est dissous dans de l'eau (48 mL) et cette solution est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Le mélange réactionnel est maintenu à 90°C sous agitation pendant 2 h puis refroidi jusqu'à température ambiante. Le produit obtenu par décantation se présente sous la forme d'une huile visqueuse jaune/orangée. Après 2 cycles décantation/lavage, le pH est ramené à 5 avec une solution de Na_2CO_3, concentré sous vide puis purifié par ultrafiltration (5 kDa MWCO) et lyophilisé. 17,7g de polyéthylèneimine methylene phosphonate (η : 47 %) sont obtenus sous forme de sel de sodium et conservés sous atmosphère inerte (argon).

^{1}H NMR (400 MHz ; D_2O) : 3,60-2,27 (multiplet large, pic à 2,83)

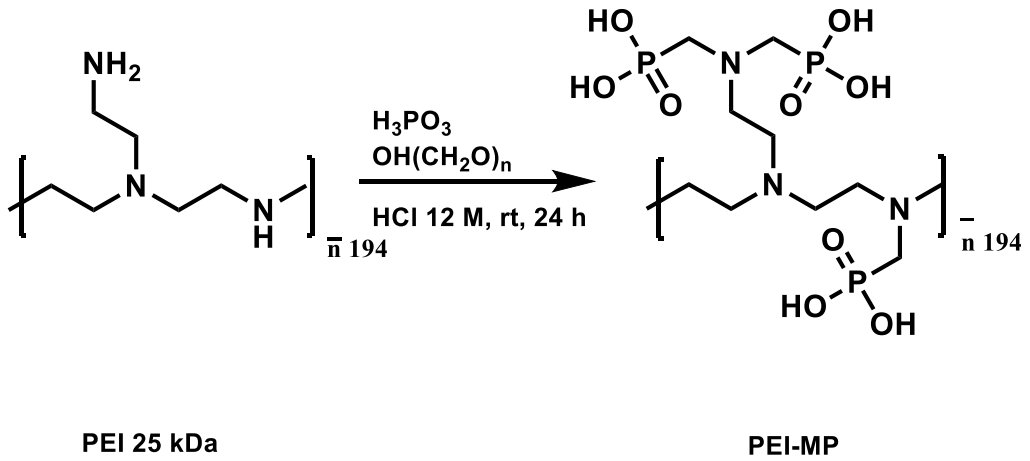


Figure 56 : Schéma de synthèse du PEI-MP (Note : l'état de protonation n'a pas été considéré).

III Détermination de la formule brute des molécules chélatantes (PEI-MC et PEI-MP)

Les taux de fonctionnalisation ont été calculés en se basant sur une répartition des amines I/II /III proche de 33 :33 :33.[203] Des essais ont été réalisés afin de déterminer le pourcentage exact de ce taux de répartition en se basant sur une étude de Von Harpe *& al.*[203] *via* RMN. Mais la faible résolution entrainant un chevauchement de plusieurs pics, n'a pas permis une détermination précise du pourcentage d'amines I , II et III (annexe I).

L'analyse élémentaire (35,78 % C, 10,42 % N) du PEI-MC donne un rapport massique C/N de 3,43 (rapport molaire C/N 4) indiquant une fonctionnalisation complète.

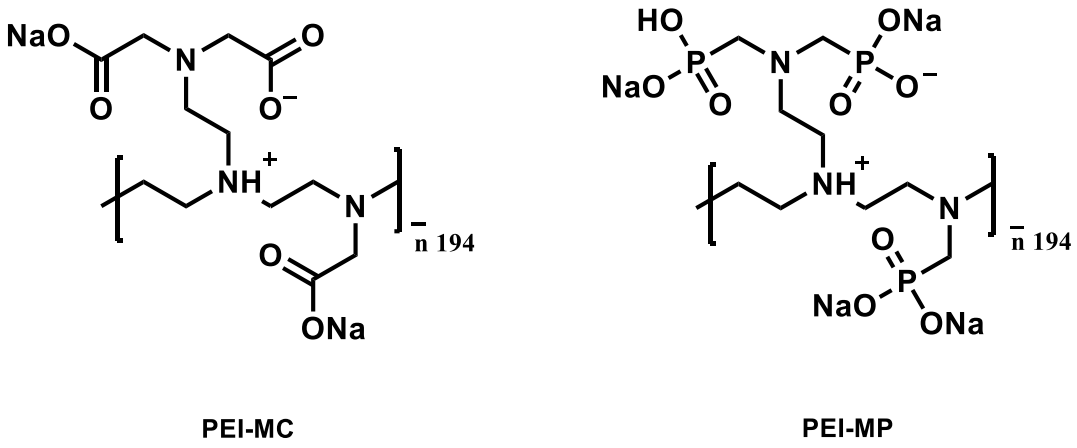
L'analyse élémentaire (26,39 % C, 10,26 % N) du PEI-MP donne un rapport massique C/N de 2,57 (rapport molaire C/N 3) indiquant une fonctionnalisation complète.

En complément, un dosage du phosphore par ICP-OES a été réalisé pour le PEI-MP (annexe II). Il a permis de confirmer le taux de fonctionnalisation, on obtient ainsi 2,9 ± 0,2 P/monomère, qui concorde avec le taux de fonctionnalisation mesuré par analyse élémentaire.

Les contre-ions des fonctions ammoniums et carboxylates/ou phosphonates ont été dosés par chromatographie ionique et ICP-MS respectivement. En effet, il est fondamental d'accéder à une formule brute précise du monomère afin de calculer le nombre de moles d'unités monomériques (unité de base) des chélates.

Un dosage des ions chlorures par chromatographie ionique a permis de conclure à un pourcentage négligeable de contre-ions chlorures (< 0,12 % massique par monomère) (annexe II). Un dosage au sel de Mohr réalisé par F. Lahrouch avait mis en évidence la présence d'un ion chlorure par monomère. La différence entre ces deux résultats peut être due à la différence de méthode de synthèse, de purification et de quantification des contre-ions.

Après dosage du sodium par ICP-MS (annexe II), une formule brute peut être proposée pour chacun des polymères. Dans la suite de ce projet le monomère PEI-MC sera défini par la formule brute $C_{12}H_{19}N_3O_6Na_2$ (MW 347,28 g/mol) et le monomère de PEI-MP par la formule brute $C_9H_{21,5}N_3P_3O_9Na_{3,5}$ (MW 488,16 g/mol). Les deux polymères sont donc sous la forme de sel de sodium dissociés en ampholyte (Figure 57).



PEI-MC **PEI-MP**

Figure 57 : Formules brutes du monomère de PEI-MC et de PEI-MP.

C. Partie expérimentale : application au tissu osseux

I Effet des polymères chélatants sur une matrice minérale (HAp) biomimétique de l'os en cas de contamination par des actinides (Th, Pu).

a. Analyse thermogravimétrique de l'affinité des polymères pour la HAp

10 mg de poudre de HAp non contaminée sont ajoutés à 1,5 mL de solution de DTPA, PEI-MC ou PEI-MP à 10 mM en monomère, soit 1,5 µmol 1-mer/mg, et mis sous agitation durant 24 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 15 000 rpm durant 15 min et rincés 3 fois à l'eau ultrapure pour éliminer la fraction de chélates (DTPA, PEI-MC, PEI-MP) non sorbée sur la HAp. La poudre de HAp est ensuite lyophilisée pour éliminer l'excès d'eau et conservée sous atmosphère inerte.

b. Contamination de la matrice osseuse

i) Préparation de la solution stock de thorium

La solution stock de thorium-232 est préparée à partir de 120 mg de nitrate de thorium ($Th(NO_3)_4$. $5H_2O$) dans 2 mL d'acide nitrique 0,1 M.

ii) Préparation de la solution de carbonate de thorium

Pour éviter l'hydrolyse du Th à pH physiologique, le nitrate de thorium, $Th(NO_3)_4$, a été converti en carbonate de thorium ,$Th(CO_3)_5^{6-}$.

Brièvement, une solution de carbonate de thorium (1,33 mM en Th) a été préparée en ajoutant 400 µL de $Th(NO_3)_4$ (0,1 M) dans 29,6 mL de Na_2CO_3 (0,2 M). Pendant l'ajout du nitrate de thorium une brève apparition de colloïdes suivie de leur disparition est observée. Cette solution est laissée 24 h au repos. Le pH de cette solution après 24 h est de 9,45. Le pH est ajusté à 9 par bullage de CO_2. La solution est centrifugée et le surnageant est récupéré.

iii) Contamination de la HAp

500 mg d'hydroxyapatite (HAp) sont ajoutés au 30 mL de solution de carbonate de Th ([Th] = 1,33 mM) précédemment préparés. Le mélange est maintenu sous agitation orbitalaire pendant 48 h à température ambiante. La poudre de HAp contaminée est alors soumise à 3 cycles de centrifugation/lavage (4000 rpm, 10 min) à l'eau ultrapure jusqu'à l'absence de détection de Th dans les eaux de lavage (voir annexe III). La poudre de HAp-Th est ensuite lyophilisée, 480 mg de poudre sont alors récupérés. Le taux d'incorporation du Th au sein de la HAp est mesuré par ICP-MS sur 3 échantillons. Il est important de noter que grâce à ce protocole, le taux d'incorporation du Th au sein de la HAp peut être contrôlé de manière très précise et de façon reproductible (procédure répétée sur 2 échantillons indépendants, en triplicat, voir annexe III). Le taux d'incorporation de Th dans la HAp est de 0,7 %.

II Décontamination de la matrice osseuse par des molécules chélatantes

a. Aspects thermodynamiques

5 mg de poudre de HAp – Th (0,7 % en Th, déterminé par ICP-MS) ont été ajoutés à 1,5 mL de molécules chélatantes (PEI-MC, PEI-MP ou DTPA) à différentes concentrations dans une solution de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) et mis sous agitation orbitalaire pendant 8 jours. En considérant le monomère de formule brute $C_{12}H_{19}N_3O_6Na_2$ (MW 347,28 g/mol) pour PEI-MC et $C_9H_{21,5}N_3P_3O_9Na_{3,5}$ (MW 488,16 g/mol) pour PEI-MP, le rapport molaire Th : monomère au sein de chaque solution correspond à : 0 (Blanc), 0,010, 0,016, 0,032, 0,052, 0,087, 0,13, 0,26, 0,44, 0,67, 1,30, 2,01, 2,58, 6,70 et 10,06 respectivement. Chaque échantillon est préparé en triplicat. Après 8 jours, une étape de purification par centrifugation (15 000 rpm, 15 min) est effectuée comme suit : 500 µL de surnageant sont récupérés en 2 fois (2 x 250 µL) pour chaque échantillon et minéralisés dans 5 mL d'acide nitrique suprapur 67-70% (Plasmapure plus degree, SCP Science) à 120 °C pendant 2 h.

Après minéralisation les échantillons sont évaporés à sec à 90 °C au Digiprep puis repris dans 5 mL d'une solution d'acide nitrique 1,5 %. Chaque échantillon est analysé par ICP-MS/MS (Perkin Elmer ELAN 9000). Le blanc (HAp-Th sans chélate) est préparé dans les mêmes conditions. Du bismuth est ajouté à chaque échantillon à une concentration précise de 10 ppb pour corriger les éventuels effets de matrice.

b. EXAFS de la HAp-Th, PEI-MP-Th et PEI-MP-Th-HAp

i) La technique de spectroscopie d'absorption X

La spectroscopie d'Absorption X (SAX) est une technique de caractérisation basée sur l'interaction lumière/matière. De part leur énergie, les rayons X peuvent être absorbés par la matière par effet photoélectrique

En pratique, l'échantillon est éclairé par un faisceau de rayons X dont on fait fluctuer l'énergie. Quand le rayonnement X correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers un niveau du continuum, on observe un seuil d'absorption correspondant à l'éjection d'un électron. La Figure 58 présente un spectre d'absorption X caractéristique.

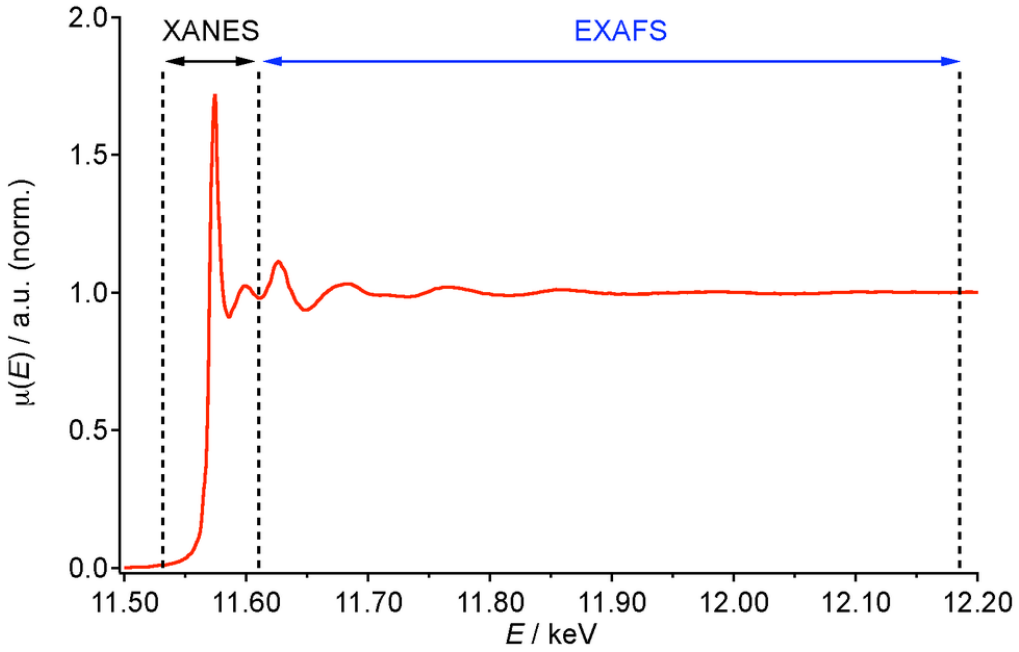


Figure 58 : Spectre d'absorption X

La région proche du maximum d'absorption est celle du XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) et est caractéristique de l'état électronique de l'élément. S'étendant sur plusieurs centaines d'électron-volts après le seuil, des oscillations sont observées, correspondant à la région de l'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure). Les valeurs des énergies supérieures à l'énergie de liaison engendrent des transitions vers les états du continuum où le photoélectron est éjecté et retrodiffusé par les atomes voisins de l'atome absorbeur. Les interférences résultantes peuvent être constructives ou destructives et forment les oscillations. Ces oscillations contiennent des informations sur la distance entre l'atome excité et ses premiers voisins dans l'échantillon, mais aussi sur la nature de ses premiers voisins.

ii) Conditions d'acquisition des spectres EXAFS

Les mesures EXAFS présentées dans ce travail ont été réalisées au synchrotron SOLEIL (Saclay) sur la ligne MARS (Multi-Analyses on Radioactive Samples) dédiée à l'étude des échantillons radioactifs. La ligne MARS est équipée d'un monochromateur à double cristal refroidi à l'eau pour la sélection de l'énergie incidente et la focalisation horizontale, et de deux grands miroirs réfléchissants pour filtrer les hautes énergies (partie harmonique) et pour la focalisation verticale.

Les mesures EXAFS ont été effectuées au seuil L_{III} du Th (16 300 eV) en mode fluorescence à l'aide d'un détecteur au germanium 13 éléments.

L'extraction du signal EXAFS a été faite en utilisant le code ATHENA de la suite logiciel Demeter 0.9.26.[204] L'énergie E_0 est choisie au maximum du seuil. La soustraction du bruit de fond a été effectuée en utilisant une modélisation linéaire du pré seuil. L'absorption atomique a été simulée par une fonction spline cubique. Le signal EXAFS a été pondéré par k^2. Après transformation de Fourier avec une fenêtre de Hanning, les données ont été ajustées sans filtre supplémentaire dans l'espace R pondéré en k^2 et en k^3 en utilisant le code ARTEMIS de la suite logiciel Demeter 0.9.26.

Les phases et amplitudes ont été calculées avec le code Feff7 intégré dans le code ARTEMIS. 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 $R_{facteur}$ (en %) et de la facteur de qualité réduit χ^2 (Q) sont tous deux fournis comme indication de la qualité de l'ajustement.

Préparation d'échantillons

Toutes les mesures ont été enregistrées à température ambiante dans des cellules à double confinement (200 µL) spécialement conçues pour les échantillons radioactifs.

HAp- Th

L'échantillon de HAp-Th a été préparé sous forme de pastille en mélangeant 5 mg de HAp-Th (0,7 % en Th) à du polyéthylène afin d'obtenir une pastille solide homogène.

Ajustement HAp-Th: **(Hanning window = 2.7 – 11 Å^{-1}, fit range = 1 – 4 Å).**

Le modèle utilisé pour les calculs de phases et d'amplitudes est le modèle cristallographique $Th_4(PO_4)_4P_2O_7$ [189] où la sphère de coordination du thorium est composée de 6 phosphates monodentes et d'un phosphate bidente. La première sphère de coordination a été ajustée avec une contribution de 3 oxygènes ayant le même facteur de Debye-Waller. Le nombre total d'atomes d'oxygènes a été fixé à 9, valeur typique de coordinance pour le thorium (IV). Deux contributions de 1 et 6 atomes de phosphore respectivement ont été incluses dans la procédure d'ajustement.

Les chemins triples Th-O-P et quadruples Th-O-P-O pour une contribution monodente du phosphore ont aussi été considérés. Les chemins multiples partagent le même facteur de Debye-Waller ainsi que les facteurs de correction des distances.

PEI-MP-Th et PEI-MP-Th-Hap

PEI-MP-Th

La solution du complexe PEI-MP-Th analysée en EXAFS a été préparée en ajoutant 50 µL d'une solution de nitrate de thorium (2,5 x 10^{-3} M, pH =1), préparée à partir de la solution stock de nitrate de thorium, à 250 µL d'une solution de PEI-MP (5 mM de monomère) en tampon TBS ([tris]= 50 mM, [NaCl] = 150 mM). Le pH a été augmenté lentement par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium (2 M). L'équivalence Th(IV) : monomère de PEI-MP vaut 0,1.

PEI-MP-Th-HAp

La solution de complexe PEI-MP-Th-HAp analysée en EXAFS a été préparée directement en utilisant un échantillon des expériences dose/réponse de décontamination de la HAp par le PEI-MP. 1,5 mL de surnageant ont été récoltés et centrifugés (12 000 rpm, 5min, 20°C) sur filtre microcon® (10 kDa MWCO) afin de concentrer l'échantillon pour permettre la mesure EXAFS.

Ajustement des courbes expérimentales du PEI-MP-Th et PEI-MP-Th-HAp : (Hanning window = 2.7 – 10 Å^{-1}, fit range = 1 – 4 Å).

Le modèle utilisé pour les phases et le calcul d'amplitude a été décrit dans une autre étude.[30]

Les paramètres d'ajustement sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude de Lahrouch *& al.*[112] citée afin d'ajuster le spectre EXAFS du complexe de PEI-MP-Th synthétisé à partir de Th-NTA, à savoir une première sphère de coordination constituée d'un chemin de diffusion simple de 9 atomes d'oxygène, un chemin de diffusion simple de 3 atomes de phosphore et le chemin de diffusion quadruple Th-O-P-O correspondant, et un chemin de diffusion simple d'atomes de chlore.

c. Suivi cinétique

5 mg de poudre de HAp- Th (0,7% en Th, déterminé par ICP-MS) ont été ajoutés à 1,5 mL de molécules chélatantes (PEI-MC, PEI-MP ou DTPA) à une concentration de 6,3 mM (en monomère) dans une solution de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4). Chaque échantillon a été préparé en triplicat. Une étape de centrifugation (15 000 rpm, 15 min) a été réalisée à différents temps : 2, 18, 42, 66, 90, 114, 162, 186, 210, 290, 354 et 504 h. Un blanc (5 mg de HAp-Th sans chélate) a été réalisé dans les mêmes conditions. 500 µL de surnageant sont récupérés après 2 étapes de centrifugation (2 x 250 µL) pour chaque échantillon et minéralisés dans 5 mL d'acide nitrique suprapur 67-70 % (Plasmapure plus degree, SCP Science) à 120 °C pendant 2 h.

Après minéralisation les échantillons sont évaporés à sec à 90 °C au Digiprep puis repris dans 5 mL d'une solution d'acide nitrique 1,5 %.

Chaque échantillon est analysé par ICP-MS (Perkin Elmer ELAN 9000). Du bismuth est ajouté à chaque échantillon à une concentration précise de 10 ppb pour corriger les éventuels effets de matrice.

III Cytotoxicité des molécules chélatantes

Les cellules SAOS-2 (provenant de ATCC) ont été cultivées en milieu 5A de McCoy sans rouge de phénol (HyClone, Thermo Fisher Scientific), supplémenté avec 15 % de sérum fœtal bovin (inactivé) (Biowest). Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture : de la pénicilline à 100 unités.mL^{-1} et de la streptomycine à 100 µg.mL^{-1}(Sigma-Aldrich). Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits (12 000 cellules par puits).

La lignée immortalisée d'ostéocytes murins (cellules MLO-A5) Linda Bonewald lab[205] a été cultivée en milieu αMEM avec des nucléotides et de l'ultra glutamine (BE02- 002F, Lonza) et supplémenté avec 5 % de sérum fœtal bovin inactivé (SVF) (FBS : Hyclone SH30071.03 GE Healthcare) et 5 % de sérum de veau inactivé (CS : Hyclone SH30072.03, GE-Healthcare) dans des puits recouverts de collagène de queue de rat type I (Sigma Aldrich). Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture : 1 % Pénicilline/Streptomycine (P/S, Sigma-Aldrich).

Les deux lignées cellulaires sont cultivées sous atmosphère contrôlée à 37 °C, 5 % CO_2.

La cytotoxicité des molécules chélatantes à été évaluée par un test MTT. Le milieu de culture est alors remplacé par un milieu de culture supplémenté en DTPA, PEI-MC, ou PEI-MP (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 50 mM et 100 mM en monomère), laissé sous incubation durant 1 h, puis rincé 3 fois avec du tampon PBS pour éliminer les molécules chélatantes non internalisées. 200 µL de milieu de culture frais sont ajoutés et les cellules sont mises à incuber pendant 24 h ou 48 h. A la fin de la période d'incubation, la cytotoxicité est évaluée. Le milieu de culture est alors retiré et remplacé par 100 µL d'une solution de milieu EMEM contenant du MTT. La solution de MTT est préparée en diluant dix fois la solution stock (5 $mg.mL^{-1}$, Sigma-Aldrich) dans du milieu Eagle's Minimum Essential Medium sans rouge de phénol (EMEM, Lonza) complémenté de 10 % de SVF (HyClone, GE Healthcare).

Après 1 h d'incubation, à 37 °C, dans l'obscurité, la solution de MTT est éliminée, et remplacée par 150 µL de DMSO (stérile, certifié BioPerformance, Sigma-Aldrich) afin de dissoudre les cristaux intracellulaires de formazan.

Après 15 min l'absorbance est mesurée à 570 nm (absorbance du formazan) et à 690 nm (bruit de fond) par un lecteur de microplaques (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Pour l'analyse, l'absorbance du bruit de fond est déduite de l'absorbance spécifique à 570 nm.

L'absorbance moyenne des cellules non exposées aux molécules chélatantes est prise comme référence. Le pourcentage de la viabilité cellulaire a été calculé en se basant sur le rapport entre l'absorbance de chaque échantillon comparé à la moyenne des absorbances des cellules non traitées. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en trois mesures (triplicat).

D.Partie expérimentale : application aux poumons

I Synthèse des nanoparticules de thorium

a. Protocole

114 mg (0,2 mmol) de nitrate de thorium sont dissous dans 5 mL d'eau ultrapure, suivi de l'ajout de 0,2 mL de glycérol (2,7 mmol) et de 6 mg d'urée (0,1 mmol). La solution est mise sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes. La solution transparente obtenue est alors transférée dans des contenants en Teflon scellés d'une capacité de 100 mL, leur volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau ultrapure puis la solution est chauffée au micro-onde à 120°C pendant 4 h (0-15 min 120°C puis 4 h à 120°C). Après refroidissement à température ambiante un précipité blanc apparait. Ce précipité est récupéré par centrifugation (15 000 rpm, 10 min) puis après 3 cycles de centrifugation/lavage (15 000 rpm, 10 min) à l'eau distillée (10 mL x 3) une poudre blanche (44 mg) composée d'oxydes et hydroxydes de Th est récupérée. La poudre est alors lyophilisée (sous vide, -75 °C, 24 h) puis conservée sous atmosphère inerte (argon).
Les nanoparticules d'oxydes de thorium sont obtenues en calcinant les nanoparticules précédemment préparées (mélanges d'oxydes et d'hydroxydes de Th) au four à moufle pendant 4 h à 600 °C.

b. Préparation des échantillons MET

Les échantillons ont été analysés avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM1400 (120 kV). Une goutte de l'échantillon (nanoparticules d'oxydes ou d'oxydes-hydroxydes de Th, [Th] = 0,1 $mol.L^{-1}$, dispersées dans de l'eau distillée) a été déposée sur une grille de carbone (la surface de la grille est composée de Formvar). Après séchage de l'échantillon, les grilles ont été analysées dans des conditions standards.

c. Analyse DLS

Les nanoparticules de Th ont été dispersées dans de l'eau distillée à une concentration de 1 mmol.L^{-1}, filtrées sur filtre 0,2 µm puis placées dans des cellules à tube capillaire jetables (DTS1070, Malvern Panalytical) pour éviter toute contamination. Chaque solution a été mélangée par agitation mécanique avant d'être analysée.

d. Analyse EXAFS des nanoparticules de thorium

Préparation des échantillons

Les nanoparticules de Th analysées en EXAFS ont été préparées en déposant 30 µL d'une solution de nanoparticules de Th (0,1 M, dispersées dans de l'eau distillée) sur une pastille solide composée d'un mélange de 50 % de polyéthylène et 50 % d'α-cellulose en quantité massique.

II Etude thermodynamique et cinétique de l'équilibre Th colloïdal (NPs) – Th soluble en présence de molécules chélatantes.

a. Protocole de dilution des nanoparticules de Th

Afin de s'assurer de la répétabilité des expériences, les nanoparticules (NPs) en solution pouvant former une solution hétérogène, des essais de dilution des NPs en solution tampon ont été réalisés. Le principe de ces essais consiste à diluer une solution mère de nanoparticules de Th concentrée ([Th] : 4,28 g.L^{-1}) afin de vérifier que la concentration théorique calculée correspond bien à la concentration expérimentale mesurée par dosage du Th par ICP-MS. L'agitation a été réalisée à l'aide d'une sonde à sonication (125 mW) pendant 5 min entre chaque dilution. Une bonne corrélation (R^2 = 0,96) a été obtenue entre la concentration en Th calculée et celle mesurée en utilisant cette méthode (Figure 59).

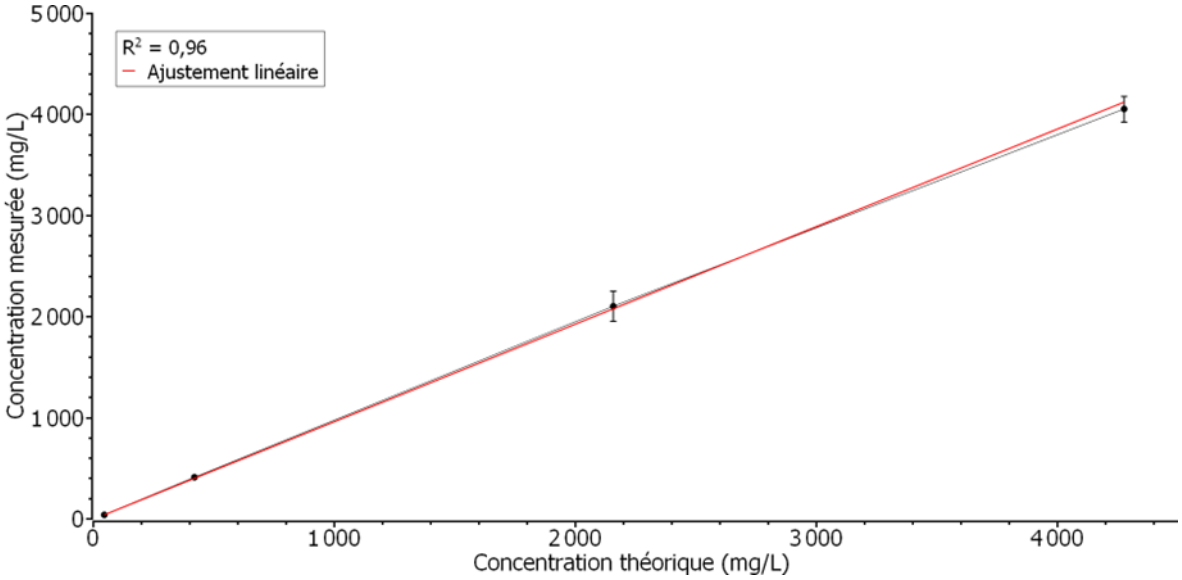


Figure 59 : Concentration mesurée en Th par ICP-MS en fonction de la concentration théorique.

b. Protocole de l'étude thermodynamique de l'équilibre Th sous forme colloïdale (NPs) *vs* forme soluble en présence de molécules chélatantes

Une solution mère de nanoparticules de thorium est préparée par ajout de 96 mg de NPs de Th dans 100 mL de TBS ([Tris] : 50 mM, [NaCl] : 150mM, pH : 7,4). 1 mL de cette solution est ajoutée à 9 mL de tampon TBS, puis agitée sous sonication (125 mW, 5min). La solution obtenue ([Th] : 80 mg.L^{-1}) sera utilisée pour les expériences de type dose/réponse.

250 µL d'une solution de nanoparticules de Th, 20,0 ± 2,0 µg en masse ([Th] : 80 mg.L^{-1}) sont ajoutés à 1,5 mL d'une solution de chélates (PEI-MC, PEI-MP, DTPA) à différentes concentrations (de 0 (blanc) à 35 mM en monomère), dans une solution de TBS et mis sous agitation orbitalaire pendant 7 jours.

En considérant le monomère de formule brute $C_{12}H_{19}N_3O_6Na_2$ (MW 347,28 g/mol) pour PEI-MC et $C_9H_{21,5}N_3P_3O_9Na_{3,5}$ (MW 488,16 g/mol) pour PEI-MP, le rapport molaire Th : monomère au sein de chaque solution correspond à : 0 (Blanc), 0,0016, 0,0022, 0,0044, 0,0088, 0,013, 0,022, 0,044, 0,072, 0,088, 0,11, 0,13, 0,22, 0,44, 0,72, 1,1, 1,79, 3,59 et 5,75 respectivement. Chaque échantillon est préparé en triplicat.

Après 7 jours, une étape de purification par centrifugation (15 000 rpm, 15 min) est réalisée. 600 µL de surnageant sont récupérés en 3 fois (200 µL x 3) pour chaque échantillon et minéralisés dans 5 mL d'acide nitrique suprapur 67-70% (Plasmapure plus degree, SCP Science) à 120 °C pendant 2 h.

Après minéralisation les échantillons sont évaporés à sec à 90°C au Digiprep puis repris dans 5 mL d'une solution d'acide nitrique 1,5 %. Chaque échantillon est analysé par ICP-MS/MS (ELAN 9000 Perkin Elmer). Le blanc (NPs de Th sans chélate) est préparé dans les mêmes conditions. Du bismuth est ajouté à chaque échantillon à une concentration précise de 10 ppb pour corriger les éventuels effets de matrice.

Le culot est aussi minéralisé afin de s'assurer de retrouver le 100 % de thorium initial (annexe VII).

III Suivi de la phagocytose

a. Protocole générale de culture cellulaire

Les cellules RAW 264.7, lignée cellulaire murine de monocytes-macrophages, obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) sont cultivées en RPMI-1640 contenant 2 mM de L-glutamine et 23,8 mM de bicarbonate de sodium (Sigma Aldrich), supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (SVF) (Origine USA, stérile, Sigma-Aldrich). Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture : de la pénicilline à 100 unités.mL^{-1} et de la streptomycine à 100 µg.mL^{-1} (BioReagent, filtrés sur 0,1 µm, Sigma-Aldrich).

Les cellules sont cultivées sous atmosphère humidifiée contrôlée à 37 °C, 5 % CO_2. Les cellules sont transférées par grattage mécanique ; seules les cellules dont le nombre de passages est inférieur à dix sont utilisées pour les expériences. Les cellules ont été entretenues dans des flasques T25 (Falcon® corning Falcon, avec bouchon à membrane filtrante, Dominique Dutcher) (lors de la décongélation) et T75 (Falcon® corning Falcon, avec bouchon à membrane filtrante, Dominique Dutcher) (dédiées aux repiquages de cellules, ensemencement des plaques).

b. Etudes préliminaires ICP-MS

Avant de réaliser les expériences *in cellulo,* un dosage ICP-MS du Th dans différents milieux (NPs de thorium en milieu TBS, NPs de thorium en milieu de culture cellulaire (RPMI + 10 % SVF + Pen/Strepto)) a été réalisé afin d'anticiper d'éventuels problèmes de minéralisation dus à la complexité du milieu cellulaire et les effets de matrices. Ces essais de minéralisation ont été réalisés sur une solution de nanoparticules de thorium ([Th] : 100 µg.mL^{-1}) obtenue par dilution de la solution mère.

Des échantillons de volume 1 mL sont minéralisés dans 5 mL d'acide nitrique suprapur 67-70 % à 120 °C pendant 2 h.

Après minéralisation les échantillons sont évaporés à sec à 90 °C au Digiprep puis repris dans 5mL d'une solution d'acide nitrique 1,5 % et dosés en Th par ICP-MS.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en trois mesures (triplicat).

Les résultats sont présentés en Figure 60.

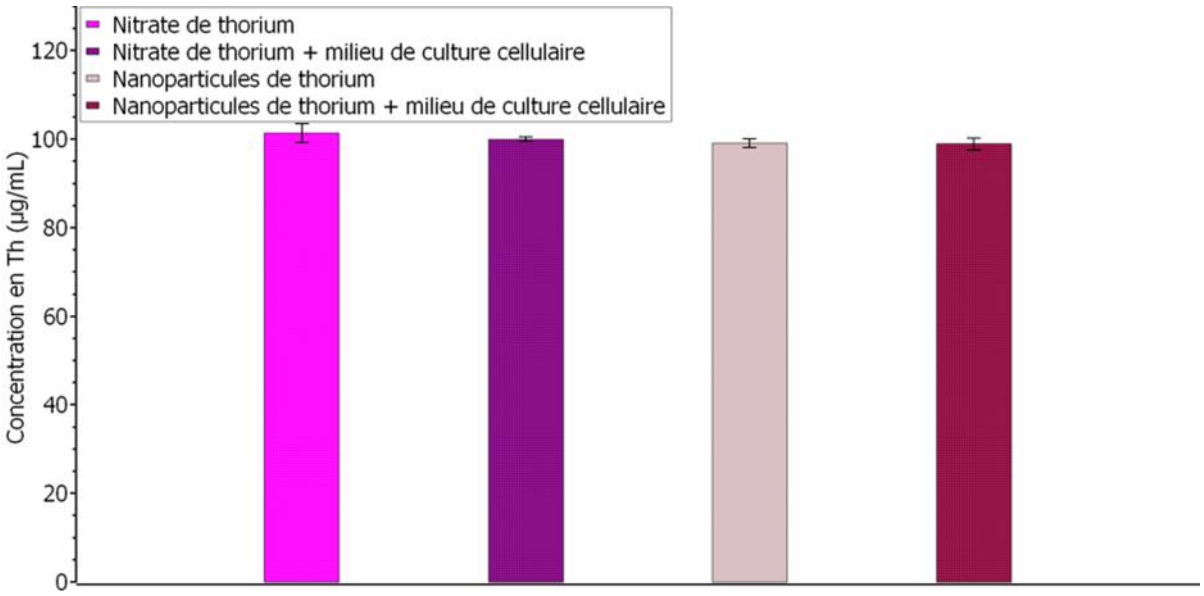


Figure 60 : Concentration en Th mesurée par ICP-MS dans différents milieux pour une même concentration initiale.

Ce protocole permet une minéralisation complète des échantillons. De plus nous n'observons pas d'effet de matrice. C'est donc ce protocole de minéralisation qui a été utilisé dans la suite de cette étude.

c. Protocole de suivi de la phagocytose

Les RAW 264.7 sont ensemencées dans des plaques 24 puits (polystyrène, fond plat, Sigma-Aldrich) à 28 000 cellules par puits, dans un volume de 500 µL, 24 h avant le début de l'expérience de suivi de la phagocytose. Cet ensemencement avec une faible concentration de cellules permet un suivi de la phagocytose sur 5 jours. En effet, pour ce type de cellules il ne faut pas atteindre la confluence totale.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture a été retiré, puis chaque puits a été rincé 2 fois (2 x 500 µL) avec une solution de PBS (pH 7,4, sans Rnase, Invitrogen).

Une solution de NPs de Th est préparée en diluant la solution mère initiale ([Th] = 800 $mg.L^{-1}$). 1 mL d'une solution de nanoparticules de Th ([Th] : 100 $\mu g.mL^{-1}$) est diluée dans 19 mL de RPMI-1640. Un pH de 7,3 est mesuré. 500 µL de cette solution de nanoparticules de Th, 2,5 ± 0,1 µg en masse sont ajoutés par puits. Différents temps d'exposition aux NPs de Th ont été testés afin de suivre la capacité d'internalisation des nanoparticules de Th en fonction du temps de contact.

Après différents temps de contact : 15 min, 30 min, 60 min 120 min, chaque puits est rincé 2 fois avec une solution de PBS (2 x 1 mL). Le liquide de rinçage est alors dosé en Th selon le protocole précédemment décrit.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en trois mesures (triplicat). Ils sont présentés en Figure 61.

Les cellules sont minéralisées et dosées en Th afin de s'assurer qu'on retrouve bien 100 % du Th initial (Annexe VIII).

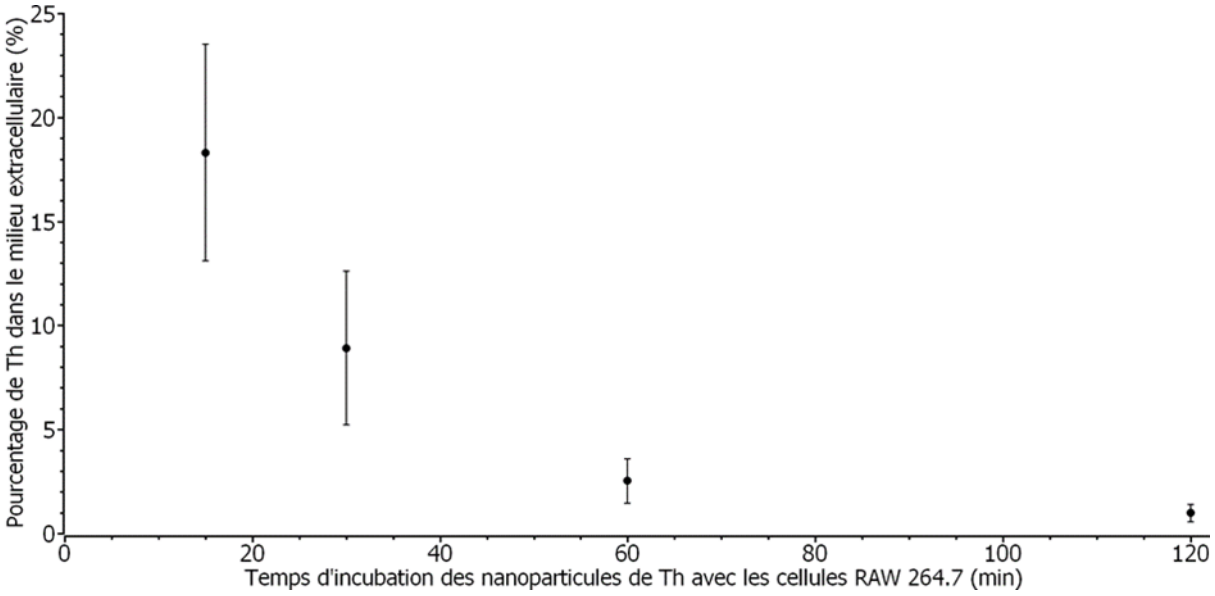


Figure 61 : Pourcentage de thorium dans le milieu extracellulaire en fonction du temps d'incubation des NPs de thorium avec les cellules RAW 264.7 (masse de $Th_{initiale}$: 2,5 ± 0,1 µg).

Un temps de contact de 1 h a été choisi pour les expériences de suivi, par MET et ICP-MS, de la phagocytose des nanoparticules de Th par les macrophages RAW 264.7. Chaque 24 h, le milieu de culture est retiré puis les puits sont rincés avec une solution de PBS (2 x 1 mL). Cette solution est alors dosée en ICP-MS selon le même protocole que décrit précédemment. Un dosage du thorium dans le milieu extracellulaire est donc effectué à j_0 (1 h après incubation), j_1, j_2, j_3, j_4 et j_5. 500 µL de milieu frais sont alors ajoutés et ce même protocole est répété chaque 24 h pendant 5 jours. La Figure 62 présente le pourcentage de thorium dans le milieu extracellulaire (par rapport à la quantité de Th ajoutée initialement soit 2,5 ± 0,1 µg) après un temps d'incubation des NPs de Th de 1 h.

Les cellules sont minéralisées et dosées en Th afin de s'assurer qu'on retrouve bien 100 % du Th initial (Annexe VIII).

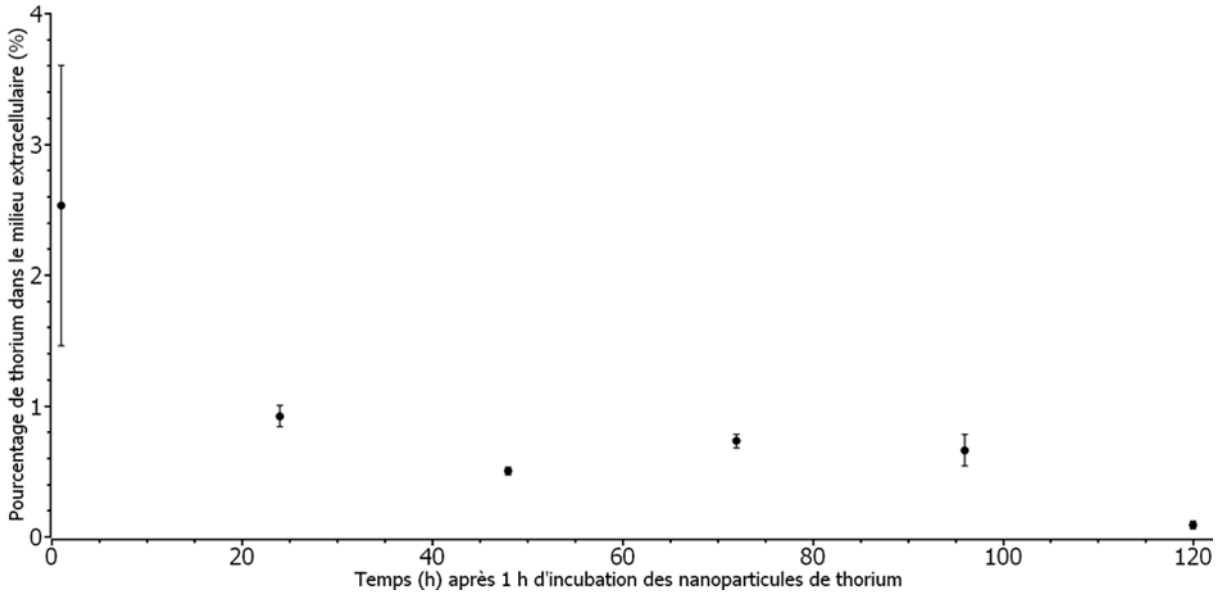


Figure 62 : Pourcentage de thorium présent dans le milieu extracellulaire après 1 h d'incubation des nanoparticules de Th avec les cellules RAW 264.7

Le même protocole est utilisé pour le suivi de la phagocytose des NPs de Th par MET excepté les différences notées ici. Dans le cas du suivi par microscopie électronique en transmission, après rinçage avec une solution de PBS (2 x 1 mL) une fixation est réalisée par ajout d'une solution de formaldéhyde à t : 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h et 120 h. Ainsi, 500 µL d'une solution de formaldéhyde fraichement préparée sont ajoutés au puits, laissés en contact pendant 5 min, puis retirés et remplacés par une nouvelle solution de formaldéhyde (500 µL). Les puits sont ensuite inclus en résine, puis découpés en tranche fine (µm) afin d'être observés au microscope électronique en transmission.

IV Test de cytotoxicité

a. Formule de calcul de la cytotoxicité

La cytotoxicité des molécules chélatantes a été évaluée grâce à un test à la résazurine.

Chaque expérience nécessite de déterminer un temps d'incubation optimal en fonction du nombre de cellules afin de s'assurer d'être dans la gamme de linéarité de la réponse.

Une solution mère de résazurine a été préparée en dissolvant 4,5 mg de résazurine (Sigma-Aldrich ; BioReagent) dans un volume de 30 mL de PBS.

Durant notre étude la résazurine a été utilisée à une concentration de 0,11 mM en diluant 10 mL de solution mère de résazurine ([Résazurine] = 0,6 mM) dans 40 mL de RPMI 1640. La quantité ajoutée, pour chaque puits, de cette solution de résazurine, est de 500 µL. La cytotoxicité de la résazurine à cette concentration a été évaluée pour des temps de contact allant jusqu'à 24 h afin de s'assurer d'une absence de cytotoxicité sur les cellules RAW 264.7 dans ces conditions (voir annexe IX).

Des temps d'incubation de 2 h 30 à 16 h ont été utilisés en fonction du nombre de cellules permettant d'obtenir une gamme linéaire. Toutes les gammes utilisées durant cette étude sont disponibles en annexe IX.

Le pourcentage de réduction de la résazurine a été calculé selon l'équation 3 :

$$\%\ de\ réduction\ de\ la\ résazurine = \frac{(E_{oxi\,600} \times A_{570}) - (E_{oxi570} \times A_{600})}{(E_{red570} \times C_{600}) - (E_{red600} \times C_{570})} \times 100 \quad (3)$$

E_{oxi570} = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée à 570 nm = 80586

E_{oxi600} = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée à 600 nm = 117216

A_{570} = absorbance de l'échantillon à 570 nm

A_{600} = absorbance de l'échantillon à 600 nm

E_{red570} = coefficient d'extinction molaire de la forme réduite à 570 nm = 155677

E_{red600} = coefficient d'extinction molaire de la forme réduite à 600 nm = 14652

C_{570} = absorbance du puits de contrôle (milieu cellulaire + résazurine, sans cellules) à 570 nm

C_{600} = absorbance du puits contrôle (milieu cellulaire + résazurine, sans cellules) à 600 nm

Ce pourcentage de réduction de la résazurine permet de tracer le pourcentage de réduction de la résazurine en fonction du nombre de cellules afin de s'assurer d'être dans la linéarité de la réponse.

Pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire, l'absorbance moyenne des cellules non exposées aux molécules chélatantes est prise comme référence.

La viabilité cellulaire est calculée selon l'équation 4.

$$\%\ de\ viabilité\ cellulaire = \frac{(E_{oxi600} \times A_{570}) - (E_{oxi570} \times A_{600})}{(E_{oxi600} \times B_{570}) - (E_{oxi\,570} \times B_{600})} \times 100 \quad (4)$$

E_{oxi570} = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée à 570 nm = 80586

E_{oxi600} = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée à 600 nm = 117216

A_{570} = absorbance de l'échantillon à 570 nm

A_{600} = absorbance de l'échantillon à 600 nm

B_{570} = absorbance moyenne du blanc (résazurine + cellules, sans molécules chélatantes) à 570 nm

B_{600} = absorbance moyenne du blanc (résazurine + cellules, sans molécules chélatantes à 600 nm

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en trois mesures (triplicat).

b. Cytotoxicité des nanoparticules de thorium

La cytotoxicité des nanoparticules de thorium a été évaluée pendant 5 jours (1 h, 1 j, 2 j, 3 j, 4 j et 5 j) pour une solution de 500 µL de milieu de culture supplémenté contenant une masse de 2,5 ± 0,1 µg de Th .

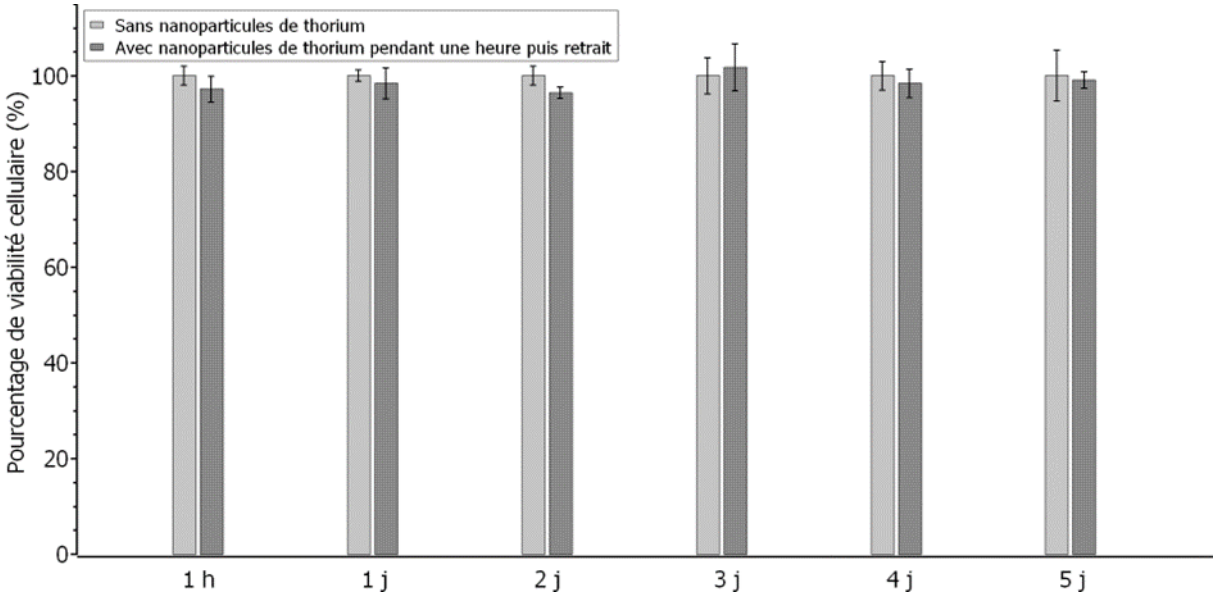


Figure 63 : Test de cytotoxicité des nanoparticules de thorium pour 500 µL de solution de nanoparticules de Th (Th : 2,5 ± 0,1 µg en masse). La solution est laissée une heure puis rincée. Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type (triplicat) et ont été obtenus après deux expériences indépendantes.

Les nanoparticules de thorium, à cette concentration, ne montrent pas de cytotoxicité durant les 5 jours de l'expérience.

c. Cytotoxicité des molécules chélatantes

Pour évaluer la cytotoxicité des molécules chélatantes sur 24 et 48 h, des plaques 24 puits ont été ensemencées à 120 000 cellules par puits 24 h avant l'expérience dans un volume par puits de 500 µL de milieu de culture.

Après 24 h, le milieu de culture est retiré, rincé 2 fois avec une solution de PBS (2 x 500 µL) et remplacé par 1 mL d'un milieu de culture supplémenté en DTPA, PEI-MC, ou PEI-MP (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 50 mM et 100 mM). Le milieu de culture supplémenté est préparé en diluant 50 µL d'une solution de molécules chélatantes dans le TBS ([Tris] : 50 mM, [NaCl] : 150 mL, pH : 7,4) dans 950 µL de milieu de culture cellulaire.

Après 1 h, le milieu de culture supplémenté en molécules chélatantes est retiré, rincé 2 fois avec une solution de PBS (2 x 1 mL) puis 500 µL de milieu frais sont ajoutés et les cellules sont mises à incuber pendant 24 h ou 48 h. A la fin de la période d'incubation, la cytotoxicité est évaluée au moyen d'un test à la résazurine. Le milieu de culture est alors retiré et remplacé par 500 µL d'une solution de RPMI contenant de la résazurine.

Après 4 h d'incubation de la solution contenant de la résazurine, à 37 °C, dans l'obscurité, l'absorbance des puits est mesurée au moyen d'un lecteur de plaque.

La cytotoxicité des molécules chélatantes pour une concentration de 5 mM a été évaluée de la même façon, excepté pour le nombre initial de cellules. En effet, afin d'éviter que les cellules arrivent à confluence, les tests se déroulant sur 5 jours, les plaques 24 puits ont été ensemencées à 28 000 cellules par puits, dans un volume de 500 µL, 24 h avant le début de l'expérience.

V Test de décontamination sur macrophages RAW 264.7

Les plaques 24 puits ont été ensemencées à 28 000 cellules par puits, dans un volume de 500 µL, 24 h avant le début de l'expérience, puis placées dans l'incubateur sous atmosphère humidifiée à 37 °C et 5 % en CO_2.

Pour les deux expériences, le rapport molaire molécules chélatantes : Th est de 500 afin d'avoir un rapport largement en faveur des molécules chélatantes.

a. Expérience de per-internalisation

Après 24 h, une solution de nanoparticules de Th est préparée en diluant la solution mère initiale ([Th] = 800 $mg.L^{-1}$) comme suit : 1 mL d'une solution de nanoparticules de Th ([Th] : 100 $\mu g.mL^{-1}$) est dilué dans 19 mL de RPMI-1640. Un pH de 7,3 est mesuré. 500 µL de cette solution de nanoparticules de Th, 2,60 ± 0,04 µg en masse ([Th] : 5,20 $\mu g.mL^{-1}$), sont ajoutés par puits pendant une durée de 30 min, puis 1 mL d'une solution de molécules chélatantes (PEI-MC, PEI-MP, DTPA, DTPMP) de concentration 5 mM est ajouté, et laissé incuber pendant 1 h. La durée d'incubation totale des nanoparticules de Th est donc de 1 h 30 dont 1 h en contact avec une solution de molécules chélatantes.

Chaque puits est ensuite rincé 2 fois avec une solution de PBS (2 x 1 mL), puis 500 µL de milieu frais sans molécule chélatante sont ajoutés. Le milieu ainsi que la solution de rinçage sont dosés en Th.

Le milieu cellulaire est changé chaque 24 h, rincé 2 fois par une solution de PBS (2 x 500 µL) et dosé en thorium (milieu retiré + rinçage) par ICP-MS. La cytotoxicité des composés (NPs de Th + molécules chélatantes) est par ailleurs évaluée pour chaque puits. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en trois mesures (triplicat).

b. Expérience de post-internalisation

Après 24 h, une solution de NPs de Th est préparée en diluant la solution mère initiale ([Th] = 800 $mg.L^{-1}$) comme suit : 1 mL d'une solution de nanoparticules de Th ([Th] : 100 µg. mL^{-1}) est dilué dans 19 mL de RPMI-1640. Un pH de 7,3 est mesuré. 500 µL de cette solution de nanoparticules de Th 2,60 ± 0,04 µg en masse ([Th] : 5,20 $\mu g.mL^{-1}$) sont ajoutés par puits pendant une durée de 1 h. La durée d'incubation des nanoparticules de Th est donc de 1 h. Le milieu extra-cellulaire est alors retiré, puis rincé 2 fois par une solution de PBS (2 x 1 mL). Puis 1 mL d'une solution de molécules chélatantes (PEI-MC, PEI-MP, DTPA, DTPMP) de concentration 5 mM est ajouté, et laissé incuber pendant 1 h. Chaque puits est ensuite rincé 2 fois avec une solution de PBS (2 x 1 mL), puis 500 µL de milieu frais sans molécule chélatante sont ajoutés.

Le milieu cellulaire est changé chaque 24 h, rincé 2 fois par une solution de PBS (2 x 500 µL) et dosé en thorium (milieu retiré + rinçage) par ICP-MS. La cytotoxicité des composés (NPs de Th + molécules chélatantes) est par ailleurs évaluée pour chaque puits.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (± écart type) et correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en trois mesures (triplicat).

Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse avaient pour objectif principal d'étudier l'efficacité de polymères chélatants pour la décorporation ciblée des actinides, ici le Th(IV), utilisé comme analogue du Pu(IV), en conditions physiologiques sur leur(s) cible(s) biologique(s) (os, poumons).

La première partie de ce manuscrit a été consacrée à l'étude bibliographique des contaminations par le thorium et le plutonium, notamment la toxicité et les moyens de décorporation actuels. Même si elle demeure rare, la contamination par les actinides peut survenir à la suite d'un incident dans l'industrie nucléaire, ou un navire à propulsion nucléaire, d'un acte malveillant visant une centrale nucléaire, de l'explosion d'une bombe sale (terrorisme) ou d'un acte de guerre. Parmi ces éléments, le plutonium (Pu) reste le plus emblématique. C'est un élément à la fois impliqué dans l'activité nucléaire civile et militaire dont la toxicité est particulièrement délétère quelle que soit son isotopie. Par ailleurs, le thorium, même si sa toxicité est moindre en comparaison à celle du plutonium, pourrait aussi devenir un élément de préoccupation majeure, à l'avenir, si les applications industrielles liées à son utilisation venaient à se développer plus en avant (usines à sels fondus). En fonction de l'exposition (inhalation, ingestion ou blessures), les actinides suivront une voie d'entrée particulière qui affectera spécifiquement certains tissus. L'inhalation représente la voie d'entrée majeure du Pu. Dans le cas du Pu, la contamination par inhalation implique des formes peu solubles (oxydes ou oxo hydroxydes). Ces formes sont alors piégées par les macrophages alvéolaires, cellules clés du système de défense pulmonaire, et contribuent à la distribution de la dose pendant de très longues périodes. Concernant les formes solubles, elles seront rapidement transférées à la circulation générale puis déposées au sein des principaux sites de rétention (os, foie). La deuxième voie principale de contamination est la contamination par blessures, même si cette dernière ne concerne, pour lors, que les salariés du secteur nucléaire. Dans ce cas, les formes insolubles resteront principalement séquestrées au niveau du site de la blessure tandis que les formes solubles selon redistribuées *via* la circulation générale et se verront encore une fois retenues au niveau des os et du foie. Le seul décorporant recommandé à l'heure dans le cas d'une contamination par le Pu(IV) *via* les fluides biologiques est un agent chélatant, le diéthylènetriaminopentaacétate (DTPA) de type polyaminocarboxylate sous forme de sels (sodium/calcium ou sodium/zinc).

Néanmoins, malgré son administration par différentes voies (i.v, nébulisation, cutanée), le DTPA s'avère inefficace pour décontaminer les formes insolubles du Pu. Sa faible demi-vie l'empêche par ailleurs d'atteindre les sites cibles comme l'os. De nouvelles molécules telles que le LI-HOPO s'avèrent prometteuses mais sont toujours au stade du développement.

Au cours de ce projet, deux polymères chélatants ont été synthétisés en une seule étape, avec de très bons rendements, le Polyéthylèneimine MéthylCarboxylate (PEI-MC), analogue polymérique du DTPA, et le Polyéthylèneimine MéthylPhosphonate (PEI-MP), analogue polymérique et phosphonate du DTPA. Ces composés ont déjà montré leurs capacités à séquestrer à la fois l'uranium(VI) et les actinides (Th(IV) et Pu(IV)).

Dans le but de proposer des stratégies de ciblage plus adaptées afin de pallier les points faibles liés à l'utilisation i.v du DTPA, nous avons exploré la capacité de ces polymères chélatants à cibler les deux compartiments principaux de rétention des actinides : l'os et les poumons. Nous avons ainsi évalué les propriétés de décontamination par les PEI-MC et PEI-MP vis-à-vis du Th(IV), utilisé en tant qu'analogue du Pu(IV) et incorporé, sous une forme soluble dans une matrice d'hydroxyapatite (élément constitutif majoritaire de l'os) ou sous forme colloïdale (nanoparticules de Th) dans des macrophages (cellules réservoirs lors d'une contamination par inhalation).

La première étude expérimentale concerne l'étude de l'efficacité de décontamination des polymères chélatants sur l'hydroxyapatite (HAp) contaminée. Afin de cibler les milieux de rétention biologiques des actinides, il est important que les molécules chélatantes possèdent une affinité pour ceux-ci. Ainsi l'affinité des molécules chélatantes (PEI-MP, PEI-MC et DTPA) pour la HAp a été évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG). Le PEI-MP possède une affinité 15 fois supérieure à celle du DTPA. A l'aide d'un processus d'échanges d'ions, cette matrice osseuse a pu être contaminée (0,7 % en thorium). Les études thermodynamiques et cinétiques permettent d'envisager l'utilisation du PEI-MP comme agent décontaminant de la matrice osseuse, d'autant plus que le PEI-MP ne montre pas de cytotoxicité sur les cellules constitutives de l'os (ostéoblastes et ostéocytes). Cette stratégie d'utilisation d'un polymère fonctionnalisé pourrait donc constituer une approche tout à fait complémentaire de celle liée à l'utilisation du DTPA.

En effet, il apparait intéressant de noter que, dans les conditions d'expériences utilisées, un taux de décontamination du thorium de 68 % a pu être obtenu.

Ce travail a été valorisé par une publication.[206]

La méthodologie acquise lors de cette thèse pourrait permettre d'effectuer des tests *in vitro* avec des formes insolubles du thorium. On pourrait en effet étudier la décontamination de HAp par des formes colloïdales de thorium sur lesquelles le DTPA reste très peu efficace. Cette partie a déjà été initiée et fait l'objet de plusieurs essais de contamination de la HAp par nos nanoparticules de thorium qui se sont avérées reproductibles. Cette méthodologie pourrait par ailleurs être appliquée à une matrice osseuse contaminée par du plutonium, même si la forte activité spécifique du Pu nécessiterait certainement d'adapter les manipulations.

A l'issue de ces travaux, plusieurs autres pistes d'études semblent également pertinentes, pour améliorer l'efficacité du PEI-MP vis-à-vis de la matrice osseuse. L'étude cinétique a montré que malgré une cinétique lente (21 jours), l'efficacité du PEI-MP n'atteignait pas 100 %. Or il faut noter que tous nos essais ont été réalisés avec un taux de contamination de HAp à 0,7 % en Th, ce qui reste élevé, même si on peut penser que des points chauds peuvent exister *in vivo*. On pourrait donc envisager de réitérer ces expériences en diminuant les taux de contamination de la HAp ce qui devrait inévitablement se traduire par une augmentation de l'efficacité du/des PEI-MP. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier les capacités de décontamination de la matrice osseuse de polymères plus petits, ceux-ci pourraient en effet montrer une cinétique de désorption plus favorable que leurs analogues de poids moléculaires plus élevés.

Même si le PEI-MP, dans notre étude, ne présente pas ou très peu de toxicité, il pourrait être formulé sous forme calcique et/ou zincique afin de limiter la déplétion des cations endogènes s'il venait à être testé *in vivo*. Au-delà de l'effet sur la toxicité, cela pourrait se traduire par un effet sur sa biodistribution comme cela est le cas lors du remplacement du technétium par l'étain. Cet aspect est donc à étudier.

Nous envisageons également de tester le PEI-MP pour complexer l'uranium qui pose également un gros problème vis-à-vis de la contamination du squelette en cas d'exposition (par blessures notamment).

La deuxième étude expérimentale a été consacrée à l'étude de la décontamination des formes insolubles du plutonium au sein de leur site principal de séquestration en cas d'inhalation : les poumons. Les nanoparticules de plutonium seront particulièrement délétères en raison de leur rétention prolongée au sein des macrophages alvéolaires. Afin de mimer au mieux ces formes insolubles rencontrées en cas de contamination par inhalation, nous avons synthétisé des nanoparticules de thorium. Cette synthèse a permis d'obtenir des nanoparticules (NPs) de taille homogène (environ 55 nm), qui ont par la suite été utilisées pour visualiser, par microscopie électronique en transmission, les différentes étapes de la phagocytose (phagosomes, phagolysosomes …) et l'évolution des NPs à l'intérieur des macrophages contaminés. Ainsi, nous avons pu déterminer que, pour la concentration en NPs utilisée lors de notre étude (0,015 µM), un temps de contact d'une heure était suffisant pour aboutir à l'internalisation totale des nanoparticules de thorium. Aucune excrétion n'a été observée et *in fine* les NPs sont retrouvées intactes au sein du cytoplasme des macrophages alvéolaires. Ces paramètres clés pour un traitement décontaminant efficace ont permis de mettre en place une expérience de décontamination *in cellulo* par nos molécules chélatantes. Même si les résultats obtenus sont préliminaires et nécessitent d'autres investigations, il apparait néanmoins que nos polymères chélatants retardent l'internalisation des nanoparticules de thorium lorsqu'ils sont administrés très rapidement (ici 30 minutes après la contamination). Le PEI-MC semble avoir un léger effet décontaminant lors de son administration 1 h après la contamination, ce résultat reste malgré tout à confirmer par d'autres expériences.

Ces travaux ont aussi permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la phagocytose des nanoparticules insolubles d'actinides (ici du thorium). Il ne fait nul doute que ces connaissances seront utiles en vue de proposer un traitement efficace en cas de contamination par inhalation, notamment pour permettre d'administrer le traitement dans la/les bonne(s) fenêtre(s) et concentration(s) afin d'obtenir une meilleure efficacité.

Concernant la décontamination pulmonaire, il convient dans un premier temps de compléter les études déjà réalisées au cours de ce travail. Ainsi, même si l'étude cinétique de solubilisation du thorium à partir de sa forme colloïdale vers sa forme soluble (*via* les polymères chélatants) a été entreprise au cours de ce travail, elle nécessite d'autres expériences.

Concernant la décontamination par stratégie per-internalisation, il est essentiel de refaire cette étude, en augmentant notamment le nombre de prélèvements en tout début d'étude (avant 24 h) afin d'obtenir une cinétique plus précise d'internalisation des nanoparticules de thorium en présence de nos polymères chélatants. Il serait intéressant de déterminer beaucoup plus précisément le retard d'internalisation des NPs en fonction de la contre-mesure et du temps auquel elle est administrée. Cela pourrait permettre de gagner un peu de temps avant que les macrophages ne soient contaminés.

Il faudra par ailleurs refaire une série d'études cinétiques en stratégie post-internalisation à des concentrations en chélates pour lesquelles aucune toxicité n'apparait tout au long de l'expérience. Ces expériences de décontamination pourraient être réalisées grâce au dispositif de simulation de décorporation utilisé par Anne Van der Meeren afin de limiter le biais lié au phénomène continu de phagocytose. Ce dispositif consiste à cultiver les macrophages contaminés dans des cellules doublement compartimentées séparées par une membrane semi-perméable. Après administration des contre-mesures, le Th excrété serait dosé après son passage sélectif à travers la membrane. Cependant, si *in vivo* l'excrétion est directement compensée par la phagocytose *de novo* par d'autres macrophages, il convient de se demander si une telle approche globale s'avèrerait utile.

Enfin, et si la faible efficacité de décontamination des polymères *in cellulo* venait à se confirmer, nous pourrions également tenter de modifier la fonctionnalisation des polymères afin :

- D'essayer d'augmenter la solubilisation d'actinides lorsqu'ils sont sous des formes peu solubles (colloïdes).

- D'augmenter leur perméabilité transmembranaire en contrôlant leur balance hydrophile/hydrophobe afin de faciliter leur excrétion des macrophages.

Pour ce dernier point, un travail de synthèse a déjà été entrepris au cours de ma 1ère année de thèse mais il présente des difficultés en raison du couplage d'une fonction amphiphile sur le polymère.

La méthodologie mise en place durant cette thèse permet désormais de tester ces polymères chélatants en conditions physiologiques sur leur(s) cible(s) biologique(s) réelle(s) : os, poumons voire foie.

En effet, ces mêmes polymères pourraient également être testés pour le ciblage du foie, autre compartiment de rétention des actinides, sur lequel le traitement au DTPA est peu efficace. On pourrait dans un premier temps envisager d'étudier la décontamination sur des hépatocytes ainsi que des cellules de Kupffer (macrophages hépatiques).

Tout ceci pourrait permettre d'offrir des approches préliminaires avant d'effectuer de véritables tests *in vivo*.

Références

(1) Katz, J. J.; Morss, L. R.; Edelstein, N. M.; Fuger, J. Introduction. In *The chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; Vol. 1, pp 1–17.

(2) Cotton, S. Introduction to the Actinides. In *Lanthanide and actinide chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, New Jersey, 2006; pp 145–153.

(3) Wickleder, M.; Fourest, B.; Dorhout, P. Thorium. In *The chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; Vol. 1, pp 52–160.

(4) Bailey, R. A.; Clark, H. M.; Ferris, J. P.; Krause, S.; Strong, R. L. 14 - The Nuclear Environment. In *Chemistry of the Environment (Second Edition)*; Bailey, R. A., Clark, H. M., Ferris, J. P., Krause, S., Strong, R. L., Eds.; Academic Press: San Diego, 2002; pp 561–686. https://doi.org/10.1016/B978-012073461-0/50061-2.

(5) Clark, D. L.; Hecker, S. S.; Jarvinen, G. S.; Neu, M. P. Plutonium. In *The chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; Vol. 2, pp 813–1264.

(6) *Sources and Effects of Ionizing Radiation: United Nations Committee on the Effects of Atomic Radiation*; United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Ed.; United Nations: New York, 1993.

(7) Kratz, J.; Lieser, K. H. Nuclear Energy, Nuclear Reactors, Nuclear Fuel, and Fuel Cycles. In *Nuclear and Radiochemistry: Fundamentals and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2013; Vol. 2, pp 507–558. https://doi.org/10.1002/9783527653331.

(8) Beaugelin-Seiller, K.; Fraysse, B.; Roussel-Debet, S.; Boust, D.; Germain, P. Plutonium et Environnement, 2004.

(9) France; Commissariat à l'Energie Atomique. Quelques caractéristiques des combustibles nucléaires, intéressant leur traitement. In *Le traitement-recyclage du combustible nucléaire usé: La séparation de actinides - Application à la gestion des déchets*; Le Moniteur: Paris, 2008; Vol. 1.

(10) Anonyme. Rapport de Synthèse : Inventaire National Des Matières et Déchets Radioactifs, Rapport de l'ANDRA, 2021.

(11) Zurita, C. Mécanismes d'interaction Du Plutonium et Du Thorium Avec Deux Protéines Impliquées Dans Le Cycle Du Fer: Transferrine et Ferritine, Université Côte d'Azur, Nice, 2022.

(12) Voelz, G.; Buican, I. Plutonium and Health How Great Is the Risk ? *Los Alamos Science* **2000**, No. 26, 74–89.

(13) International Commission on Radiological Protection, Occupational Intakes of Radionuclides: Part 1. ICRP Publication *Ann. ICRP* **2015**, *44* (2) https://doi.org/10.1177/0146645315577539.

(14) McMurray, B. J. 1976 Hanford Americium Exposure Incident: Accident Description. *Health Phys.* **1983**, *45* (4), 847–853.

(15) Azizova, T.; Moseeva, M.; Grigoryeva, E.; Zhuntova, G.; Bannikova, M.; Sychugov, G.; Kazachkov, E. Registry of Plutonium-Induced Lung Fibrosis in a Russian Nuclear Worker Cohort. *Health Phys.* **2020**, *118* (2), 185–192. https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001131.

(16) Grappin, L.; Bérard, P.; Ménétrier, F.; Carbone, L.; Courtay, C.; Castagnet, X.; Goff, J. P. L.; Néron, M. O.; Beau, P.; Piechowski, J. Exposure to Actinides: Report on Ca-DTPA Injections in CEA-AREVA Centres. *Radioprotection* **2007**, *42* (2), 163–196. https://doi.org/10.1051/radiopro:2006031.

(17) Groneberg, D. A.; Witt, C.; Wagner, U.; Chung, K. F.; Fischer, A. Fundamentals of Pulmonary Drug Delivery. *Respir. Med.* **2003**, *97* (4), 382–387. https://doi.org/10.1053/rmed.2002.1457.

(18) van Rijt, S. H.; Bein, T.; Meiners, S. Medical Nanoparticles for next Generation Drug Delivery to the Lungs. *Eur. Respir. J.* **2014**, *44* (3), 765–774. https://doi.org/10.1183/09031936.00212813.

(19) International Commission on Radiological Protection, Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66. *Ann. ICRP* **1994,** *24 (1-3)*

(20) Bailey, M. The New ICRP Model for the Respiratory Tract. *Radiat. Prot. Dosim.* **1994**, *53* (1–4), 107–114. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a082260.

(21) Metivier, H.; Masse, R.; Rateau, G.; Lafuma, J. Experimental Study of Respiratory Contamination by a Mixed Oxide Aerosol Formed From the Combustion of a Plutonium Magnesium Alloy. *Health Phys.* **1980**, *38* (5), 769–776. https://doi.org/10.1097/00004032-198005000-00005.

(22) Stradling, G. N.; Loveless, B. W.; Ham, G. J.; Smith, H. The Biological Solubility in the Rat of Plutonium Present in Mixed Plutonium-Sodium Aerosols: *Health Phys.* **1978**, *35* (2), 229–235. https://doi.org/10.1097/00004032-197808000-00005.

(23) Bailey, M. R.; Ansoborlo, E.; Guilmette, R. A.; Paquet, F. Updating the ICRP Human Respiratory Tract Model. *Radiat. Prot. Dosim.* **2007**, *127* (1–4), 31–34. https://doi.org/10.1093/rpd/ncm249.

(24) Lagerquist, C. R.; Putzier, E. A.; Piltingsrud, C. W. Bio-Assay and Body Counter Results for the First Years Following an Acute Plutonium Exposure. *Health Phys.* **1967**, *13* (9), 965–972. https://doi.org/10.1097/00004032-196709000-00002.

(25) Stover, B.; Atherton, D. R.; Keller, N.; Buster, D. Metabolism of the Th^{228} Decay Series in Adult Beagle Dogs. I. Th^{228} (RdTh). *Radiat. Res.* **1960**, *12* (6), 657–671. https://doi.org/10.2307/3571000.

(26) Taylor, D. M. The Bioinorganic Chemistry of Actinides in Blood. *J. Alloys Compd.* **1998**, *271–273*, 6–10. https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00014-0.

(27) Taylor, D. M. The Biodistribution and Toxicity of Plutonium, Americium and Neptunium. *Sci. Total Environ.* **1989**, *83* (3), 217–225. https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90094-6.

(28) Leggett, R. W. Reliability of the ICRP's Dose Coefficients for Members of the Public: US Government III. Plutonium as a Case Study of Uncertainties in the Systemic Biokinetics of Radionuclides. *Radiat. Prot. Dosim.* **2003**, *106* (2), 103–120. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006340.

(29) Ansoborlo, E.; Prat, O.; Moisy, P.; Den Auwer, C.; Guilbaud, P.; Carriere, M.; Gouget, B.; Duffield, J.; Doizi, D.; Vercouter, T.; Moulin, C.; Moulin, V. Actinide Speciation in Relation to Biological Processes. *Biochimie* **2006**, *88* (11), 1605–1618. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.011.

(30) Creff, G.; Safi, S.; Roques, J.; Michel, H.; Jeanson, A.; Solari, P. L.; Basset, C.; Simoni, E.; Vidaud, C.; Auwer, C. den. Actinide(IV) Deposits on Bone: Potential Role of the Osteopontin–Thorium Complex. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (1), 29–36. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02349.

(31) Chipperfield, A. R.; Taylor, D. M. The Binding of Thorium(IV), Plutonium(IV), Americium(III) and Curium(III) to the Constituents of Bovine Cortical Bone In Vitro. *Radiat. Res.* **1972**, *51* (1), 15–30. https://doi.org/10.2307/3573641.

(32) Creff, G.; Zurita, C.; Jeanson, A.; Carle, G.; Vidaud, C.; Den Auwer, C. What Do We Know about Actinides-Proteins Interactions? *Radiochim. Acta* **2019**, *107* (9–11), 993–1009. https://doi.org/10.1515/ract-2019-3120.

(33) Richardson, R. B. A Physiological Skeletal Model for Radionuclide and Stable Element Biokinetics in Children and Adults. *Health Phys.* **2010**, *99* (4), 471–482. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181d0cd4a.

(34) International Commission on Radiological Protection, Age-Dependent Doses to Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 2 Ingestion Dose Coefficients. ,ICRP Publication 67. *Ann. ICRP* **1993**, *23* (3–4).

(35) Priest, N. D.; Giannola, S. J. ^{241}Plutonium Deposition and Redistribution in the Rat Rib. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys., Chem. Med.* **1980**, *37* (3), 281–298. https://doi.org/10.1080/09553008014550331.

(36) Jee, W. S. S. Distribution and Toxicity of ^{239}Pu in Bone. *Health Phys.* **1972**, *22* (6), 583–595. https://doi.org/10.1097/00004032-197206000-00008.

(37) Wronski, T. J.; Smith, J. M.; Jee, W. S. S. The Microdistribution and Retention of Injected ^{239}Pu on Trabecular Bone Surfaces of the Beagle: Implications for the Induction of Osteosarcoma. *Radiat. Res.* **1980**, *83* (1), 74. https://doi.org/10.2307/3575260.

(38) Vidaud, C.; Bourgeois, D.; Meyer, D. Bone as Target Organ for Metals: The Case of f-Elements. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (6), 1161–1175. https://doi.org/10.1021/tx300064m.

(39) Hewson, G. S. Inhalation and Retention of Thorium Dusts by Mineral Sands Workers. *Ann. Occup. Hyg.* **1997**, *41*, 92–98.

(40) Leiterer, A.; Berard, Ph.; Menetrier, F. *Thorium and Health: State of the Art*; CEA-R-6251; France, 2010; p 48.

(41) Dos Santos Silva, I.; Malveiro, F.; Jones, M. E.; Swerdlow, A. J. Mortality after Radiological Investigation with Radioactive Thorotrast: A Follow-up Study of up to Fifty Years in Portugal. *Radiat. Res.* **2003**, *159* (4), 521–534. https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0521:mariwr]2.0.co;2.

(42) Boecker, B. Thorium Distribution and Excretion Studies: III. Single Inhalation Exposure to the Citrate Complex and Multiple Inhalation Exposures to the Chloride. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **2007**, *24* (2), 155–163. https://doi.org/10.1080/00028896309342943.

(43) Thomas, R. G.; Lie, R.; Scott, J. K. Thorium Distribution and Excretion Studies I. Patterns Following Parenteral Administration. *Health Phys.* **1963**, *9* (2), 153–163. https://doi.org/10.1097/00004032-196302000-00004.

(44) Boecker, B. B.; Thomas, R. G.; Scott, J. K. Thorium Distribution and Excretion Studies II. General Patterns Following Inhalation and the Effect of the Size of the Inhaled Dose: *Health Phys.* **1963**, *9* (2), 165–176. https://doi.org/10.1097/00004032-196302000-00005.

(45) Syao-Shan, Y. The Behavior of Thorium Dioxide in Rats after Intratracheal and Intraperitoneal Administration. In *The toxicology of radioactive substances*; Pergamon Pr: New York, 1970; Vol. 4, pp 30–41.

(46) Ibrahim, S. A.; Wrenn, M. E.; Singh, N. P.; Cohen, N.; Saccomano, G. Thorium Concentration in Human Tissues from Two U.S. Populations. *Health Phys.* **1983**, *44 Suppl 1*, 213–220. https://doi.org/10.1097/00004032-198306001-00018.

(47) Peter-Witt, E.; Volf, V. The Distribution and Decorporation of ^{234}Th in the Rat as Influenced by the Mass of Thorium Administered. *Strahlentherapie Sonderb* **1985**, *80*, 183–185.

(48) Singh, N. P.; Zimmerman, C. J.; Taylor, G. N.; Wrenn, M. E. The Beagle: An Appropriate Experimental Animal for Extrapolating the Organ Distribution Pattern of Th in Humans. *Health Phys.* **1988**, *54* (3), 293–299. https://doi.org/10.1097/00004032-198803000-00006.

(49) Kaul, A.; Muth, H. Thorotrast Kinetics and Radiation Dose: Results from Studies in Thorotrast Patients and from Animal Experiments. *Radiat Environ Biophys* **1978**, *15* (3), 241–259. https://doi.org/10.1007/BF02176793.

(50) McInroy, J. F.; Gonzales, E. R.; Miglio, J. J. Measurement of Thorium Isotopes and ^{228}Ra in Soft Tissues and Bones of a Deceased Thorotrast Patient: *Health Phys.* **1992**, *63* (1), 54–71. https://doi.org/10.1097/00004032-199207000-00008.

(51) International Commission on Radiological Protection, Limits for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP Publication 30 (Part 1). *Ann. ICRP* **1979**, *2* (3–4).

(52) Moody, J. C.; Stradling, G. N.; Britcher, A. R. Biokinetics of Three Industrial Plutonium Nitrate Materials: Implications for Human Exposure. *Radiat. Prot. Dosim.* **1994**, *53* (1–4), 169–172. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a082269.

(53) Suslova, K. G.; Sokolova, A. B.; Khokhryakov, V. V.; Miller, S. C. ^{238}Pu: Accumulation, Tissue Distribution, and Excretion in Mayak Workers after Exposure to Plutonium Aerosols. *Health Phys.* **2012**, *102* (3), 243–250. https://doi.org/10.1097/hp.0b013e3182348ad4.

(54) Hahn, F. F.; Romanov, S. A.; Guilmette, R. A.; Nifatov, A. P.; Diel, J. H.; Zaytseva, Y. Plutonium Microdistribution in the Lungs of Mayak Workers. *Radiat. Res.* **2004**, *161* (5), 568–581. https://doi.org/10.1667/rr3175.

(55) Van der Meeren, A.; Gremy, O.; Renault, D.; Miroux, A.; Bruel, S.; Griffiths, N.; Tourdes, F. Plutonium Behavior after Pulmonary Administration According to Solubility Properties, and Consequences on Alveolar Macrophage Activation. *J. Radiat. Res.* **2012**, *53* (2), 184–194. https://doi.org/10.1269/jrr.11112.

(56) Van der Meeren, A.; Moureau, A.; Griffiths, N. M. Macrophages as Key Elements of Mixed-Oxide [U-Pu(O_2)] Distribution and Pulmonary Damage after Inhalation? *Int. J. Radiat. Biol.* **2014**, *90* (11), 1095–1103. https://doi.org/10.3109/09553002.2014.943848.

(57) Dudoignon, N.; Guillet, K.; Fritsch, P. Evaluation of Risk Factors for Lung Tumour Induction in Rats Exposed to Either NpO_2 or PuO_2 Aerosols. *Int. J. Radiat. Biol.* **2003**, *79* (3), 169–174. https://doi.org/10.1080/0955300031000086299.

(58) Muggenburg, B.; Guilmette, R. A.; Hahn, F. F.; Diel, J. H.; Mauderly, J.; Seilkop, S.; Boecker, B. Radiotoxicity of Inhaled $^{239}PuO_2$ in Dogs. *Radiat Res.***2008**, *170* (6), 736–757.

(59) Griffiths, N. M.; Van der Meeren, A.; Fritsch, P.; Abram, M.-C.; Bernaudin, J.-F.; Poncy, J. L. Late-Occurring Pulmonary Pathologies Following Inhalation of Mixed Oxide (Uranium + Plutonium Oxide) Aerosol in the Rat. *Health Phys.* **2010**, *99* (3), 347–356. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181c75750.

(60) Newman, L.; Mroz, M.; Arnold, J. S. Lung Fibrosis in Plutonium Workers. *Radiat. Res.* **2005**, *2* (164), 123–131. https://doi.org/10.1667/rr3407.

(61) Sychugov, G.; Azizova, T.; Osovets, S.; Kazachkov, E.; Revina, V.; Grigoryeva, E. Morphological Features of Pulmonary Fibrosis in Workers Occupationally Exposed to Alpha Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96* (4), 448–460. https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1721601.

(62) Metivier, H. Le Plutonium. In *Toxiques nucléaires*; P. Galle Editeur Masson, Paris, 1997; pp 225–245.

(63) Stover, B. J.; Atherton, D. R.; Keller, N. Metabolism of Pu^{239} in Adult Beagle Dogs. *Radiat. Res.* **1959**, *10* (2), 130. https://doi.org/10.2307/3570755.

(64) Katz, J. J. Plutonium Metabolism. A Literature Review, 1951.

(65) Griffiths, N. M.; Wilk, J. C.; Abram, M. C.; Renault, D.; Chau, Q.; Helfer, N.; Guichet, C.; Van der Meeren, A. Internal Contamination by Actinides After Wounding: A Robust Rodent Model for Assessment of Local and Distant Actinide Retention. *Health Phys.* **2012**, *103* (2), 187–194. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e31825aa202.

(66) Tretyakov, F.; Romanov, S. A. Radioactive Sources and Radiation Exposureeffects on the Mayak PA Workers and Population Living in the Area of Nuclear Facility Influence. *Chelyabinsk: Chelyabinsk Publishing House* **2009**, *II*, 7–28.

(67) Romanov, S. A.; Efimov, A. V.; Aladova, E. E.; Suslova, K. G.; Kuznetsova, I. S.; Sokolova, A. B.; Khokhryakov, V. V.; Sypko, S. A.; Ishunina, M. V.; Khokhryakov, V. F. Plutonium Production and Particles Incorporation into the Human Body. *J. Environ. Radioact.* **2020**, *211*, 106073. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106073.

(68) Buldakov, L.; Lyubchansky, E.; Moskalyov, Y.; Nifatov, A. Aspects of Plutonium Toxicology. *Moscow: Atomizdat* **1969**.

(69) Khokhryakov, V. F.; Menshikh, Z.; Migunova, N. Chances for Pneumosclerosis and Lung Cancer Development in Workers Exposure to Plutonium Aerosols via Inhalation. *Bulletin Radiat Med* **1978**, *4*, 72–75.

(70) Ilyin, L.; Kochetkov, O.; Romanov, S. A. Plutonium. Radiation Safety. *Moscow: AT* **2005**.

(71) Park, J. F.; Watson, C. R.; Buschbom, R. L.; Dagle, G. E.; Strom, D. J.; Weller, R. E. Biological Effects of Inhaled $^{239}PuO_2$ in Beagles. *Radiat. Res.* **2012**, *178* (5), 447–467. https://doi.org/10.1667/RR2504.1.

(72) Guskova, A.; Baisogolov, G. Radiation Sickness of Human. *Moscow: Medicine Publisher* **1971**.

(73) International Commission on Radiological Protection, ICRP Statement on Tissue Reactions/Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs—Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. ICRP Publication 118. *Ann. ICRP* **2012,** *41*(1/2)

(74) Suslova, K. G.; Khokhryakov, V. F.; Tokarskaya, Z. B.; Nifatov, A. P.; Krahenbuhl, M. P.; Miller, S. C. Extrapulmonary Organ Distribution of Plutonium in Healthy Workers Exposed by Chronic Inhalation at the Mayak Production Association. *Health Phys.* **2002**, *82* (4), 432–444. https://doi.org/10.1097/00004032-200204000-00002.

(75) Suslova, K. G.; Khokhryakov, V. F.; Tokarskaya, Z. B.; Nifatov, A. P.; Sokolova, A. B.; Kudryavtzeva, T. I.; Miller, S. C.; Krahenbuhl, M. P. The Effect of State of Health on Organ Distribution and Excretion of Systemic Plutonium in the Mayak Workers. *Radiat. Prot. Dosim.* **2003**, *105* (1–4), 229–233. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006228.

(76) Suslova, K. G.; Khokhryakov, V. F.; Tokarskaya, Z. B.; Nifatov, A. P.; Sokolova, A. B.; Miller, S. C.; Krahenbuhl, M. P. Modifying Effects of Health Status, Physiological, and Dosimetric Factors on Extrapulmonary Organ Distribution and Excretion of Inhaled Plutonium in Workers at the Mayak Production Association. *Health Phys.* **2006**, *90* (4), 299–311. https://doi.org/10.1097/01.HP.0000183759.39785.9c.

(77) Suslova, K. G.; Khokhryakov, V. F.; Tokarskaya, Z. B.; Kudryavtseva, T. I.; Nifatov, A. P. Distribution of Plutonium in Organs of Extrapulmonary Pool in Remote Periods after the Beginning of Inhalation in Workers of Radiochemical Plant. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost'* **2000**, *45* (1), 17–25.

(78) Fattal, E.; Tsapis, N.; Phan, G. Novel Drug Delivery Systems for Actinides (Uranium and Plutonium) Decontamination Agents. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *90*, 40–54. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.009.

(79) Fukuda, S.; Iida, H.; Yamagiwa, J. Toxicological Study of DTPA as a Drug. (II) Chronic Side Effects of Orally Administered DTPA to Rats. *Jpn. J. Health Phys.* **1984**, *19* (2), 119–126. https://doi.org/10.5453/jhps.19.119.

(80) Fukuda, S.; Iida, H. Toxicological Study of DTPA as a Drug. (III). Side Effects of Orally Administered Zn-DTPA to Beagles. *Jpn. J. Health Phys.* **1987**, *22* (4), 439–444. https://doi.org/10.5453/jhps.22.439.

(81) Grappin, L.; Berard, P.; Menetrier, F.; Carbone, L.; Courtay, C.; Castagnet, X.; Le Goff, J.-P.; Neron, M.-O.; Piechowski, J. Treatment of Actinide Exposures: A Review of Ca-DTPA Injections inside CEA-COGEMA Plants. *Radiat. Prot. Dosim.* **2007**, *127* (1–4), 435–439. https://doi.org/10.1093/rpd/ncm296.

(82) Norwood, W. D. Therapeutic Removal of Plutonium in Humans. *Health Phys.* **1962**, *8* (6), 747–750.

(83) Grappin, L.; Bérard, P. Autorisation de mise sur le marché du Ca-DTPA. *Radioprotection* **2008**, *43* (3), 465–466. https://doi.org/10.1051/radiopro:2008047.

(84) *Ca-DTPA/Zn-DTPA (Diethylentriamene pentaacetate) - Radiation Emergency Medical Management*. https://www.remm.nlm.gov/dtpa.htm#use (accessed 2020-05-04).

(85) Taylor, D. M. Plutonium in Vivo and Drugs to Remove It from Man. *Inorg. Chim. Acta* **1983**, *79*, 43–44. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)95069-2.

(86) Serandour, A. L.; Tsapis, N.; Gervelas, C.; Grillon, G.; Frechou, M.; Deverre, J. R.; Benech, H.; Fattal, E.; Fritsch, P.; Poncy, J. L. Decorporation of Plutonium by Pulmonary Administration of Ca-DTPA Dry Powder: A Study in Rat after Lung Contamination with Different Plutonium Forms. *Radiat. Prot. Dosim.* **2007**, *127* (1–4), 472–476. https://doi.org/10.1093/rpd/ncm300.

(87) Grémy, O.; Tsapis, N.; Chau, Q.; Renault, D.; Abram, M.-C.; Van der Meeren, A. Preferential Decorporation of Americium by Pulmonary Administration of DTPA Dry Powder after Inhalation of Aged PuO_2 Containing Americium in Rats. *Radiat. Res.* **2010**, *174* (5), 637–644. https://doi.org/10.1667/RR2203.1.

(88) Miccoli, L.; Ménétrier, F.; Laroche, P.; Grémy, O. Chelation Treatment by Early Inhalation of Liquid Aerosol DTPA for Removing Plutonium after Rat Lung Contamination. *Radiat. Res.* **2019**, *192* (6), 630. https://doi.org/10.1667/RR15451.1.

(89) Gervelas, C.; Serandour, A.-L.; Geiger, S.; Grillon, G.; Fritsch, P.; Taulelle, C.; Le Gall, B.; Benech, H.; Deverre, J.-R.; Fattal, E.; Tsapis, N. Direct Lung Delivery of a Dry Powder Formulation of DTPA with Improved Aerosolization Properties: Effect on Lung and Systemic Decorporation of Plutonium. *J. Controlled Release* **2007**, *118* (1), 78–86. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.027.

(90) Rahman, Y.-E.; Rosenthal, M. W.; Cerny, E. A. Intracellular Plutonium: Removal by Liposome-Encapsulated Chelating Agent. *Science* **1973**, *180* (4083), 300–302. https://doi.org/10.1126/science.180.4083.300.

(91) Rahman, Y. E.; Lindenbaum, A.; Westfall, W. M. Lysosome Particles and Subcellular Distributions of Polymeric Tetravalent Plutonium-239. *Radiat. Res.* **1964**, *21* (4), 575. https://doi.org/10.2307/3571652.

(92) Phan, G.; Gall, B. R.; Manceau, J.; Fanet, M.; Benech, H.; Fritsch, P.; Fattal, E.; Deverre, J. -R. Targeting of Diethylene Triamine Pentaacetic Acid Encapsulated in Liposomes to Rat Liver: An Effective Strategy to Prevent Bone Deposition and Increase Urine Elimination of Plutonium in Rats. *Int. J. Radiat. Biol.* **2004**, *80* (6), 413–422. https://doi.org/10.1080/09553000410001702300.

(93) Phan, G.; Herbet, A.; Cholet, S.; Benech, H.; Deverre, J.-R.; Fattal, E. Pharmacokinetics of DTPA Entrapped in Conventional and Long-Circulating Liposomes of Different Size for Plutonium Decorporation. *J. Controlled Release* **2005**, *110* (1), 177–188. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.029.

(94) Phan, G.; Le Gall, B.; Grillon, G.; Rouit, E.; Fouillit, M.; Benech, H.; Fattal, E.; Deverre, J.-R. Enhanced Decorporation of Plutonium by DTPA Encapsulated in Small PEG-Coated Liposomes. *Biochimie* **2006**, *88* (11), 1843–1849. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.010.

(95) Grémy, O.; Miccoli, L.; Lelan, F.; Bohand, S.; Cherel, M.; Mougin-Degraef, M. Delivery of DTPA through Liposomes as a Good Strategy for Enhancing Plutonium Decorporation Regardless of Treatment Regimen. *Radiat. Res.* **2018**, *189* (5), 477–489. https://doi.org/10.1667/RR14968.1.

(96) Miller, S. C.; Bruenger, F. W.; Kuswik-Rabiega, G.; Lloyd, R. D. Decorporation of Plutonium by Oral Administration of a Partially Lipophilic Polyaminocarboxylic Acid. *Health Phys.* **1992**, *63* (2), 195–197.

(97) Miller, S. C.; Liu, G.; Bruenger, F. W.; Lloyd, R. D. Efficacy of Orally Administered Amphipathic Polyaminocarboxylic Acid Chelators for the Removal of Plutonium and Americium: Comparison with Injected Zn-DTPA in the Rat. *Radiat. Prot. Dosim.* **2006**, *118* (4), 412–420. https://doi.org/10.1093/rpd/nci367.

(98) Griffiths, N. M.; Van der Meeren, A.; Grémy, O. Comparison of Local and Systemic DTPA Treatment Efficacy According to Actinide Physicochemical Properties Following Lung or Wound Contamination in the Rat. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 289. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.635792.

(99) Lloyd, R. D.; Bruenger, F. W.; Mays, C. W.; Atherton, D. R.; Jones, C. W.; Taylor, G. N.; Stevens, W. Removal of Pu and Am from Beagles and Mice by 3,4,3-LICAM(C) or 3,4,3-LICAM(S). *Radiat. Res.* **1984**, *99* (1), 106–128. https://doi.org/10.2307/3576450.

(100) Duffield, J. R.; Taylor, D. M.; Proctor, S. A. 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 Catecholamide Ligand LICAMC(C). *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **1986**, *12* (6), 483–487. https://doi.org/10.1016/S0047-0740(86)80012-2.

(101) Volf, V. Chelation Therapy of Incorporated Plutonium-238 and Americium-241: Comparison of LICAM(C), DTPA and DFOA in Rats, Hamsters and Mice. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys., Chem. Med.* **1985**, *49* (3), 449–462. https://doi.org/10.1080/09553008514552671.

(102) Gerasimo, P.; Duserre, C.; Metivier, H. Biological Behaviour of Pu Administered to Animals as Pu-Standard LICAM(C) Complex: Therapeutical Attempts to Decrease Pu Kidney Burden. *Hum. Toxicol.* **1986**, *5* (5), 309–318. https://doi.org/10.1177/096032718600500503.

(103) Stradling, G. N.; Stather, J. W.; Gray, S. A.; Moody, J. C.; Ellender, M.; Hodgson, A.; Volf, V.; Taylor, D. M.; Wirth, P.; Gaskin, P. W. The Efficacies of Pure LICAM(C) and DTPA on the Retention of Plutonium-238 and Americium-241 in Rats after Their Inhalation as Nitrate and Intravenous Injection as Citrate. *Int. J. Radiat. Biol.* **1989**, *56* (4), 503–514. https://doi.org/10.1080/09553008914551641.

(104) Paquet, F.; Chazel, V.; Houpert, P.; Guilmette, R.; Muggenburg, B. Efficacy of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) for Decorporation of Pu,Am and U from Rats Injected Intramuscularly with High-Fired Particles of MOX. *Radiat. Prot. Dosim.* **2003**, *105* (1–4), 521–525. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006296.

(105) W. Durbin, P.; Kullgren, B.; Xu, J.; N. Raymond, K.; Hengé-Napoli, M.-H.; Bailly, T.; Burgada (INVITED), R. Octadentate Hydroxypyridinonate (HOPO) Ligands for Plutonium (IV): Pharmacokinetics and Oral Efficacy. *Radiat. Prot. Dosim.* **2003**, *105* (1–4), 503–508. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006292.

(106) Abergel, R. J.; Durbin, P. W.; Kullgren, B.; Ebbe, S. N.; Xu, J.; Chang, P. Y.; Bunin, D. I.; Blakely, E. A.; Bjornstad, K. A.; Rosen, C. J.; Shuh, D. K.; Raymond, K. N. Biomimetic Actinide Chelators : An Update on the Preclinical Developement of the Orally Active Hydroxypyridonate Decorporation Agents 3,4,3-Li(1,2-HOPO) and 5-LiO(Me-3,2-HOPO). *Health Phys.* **2010**, *99* (3), 401–407. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181c21273.

(107) Choi, T. A.; Furimsky, A. M.; Swezey, R.; Bunin, D. I.; Byrge, P.; Iyer, L. V.; Chang, P. Y.; Abergel, R. J. In Vitro Metabolism and Stability of the Actinide Chelating Agent 3,4,3-LI(1,2-HOPO). *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (5), 1832–1838. https://doi.org/10.1002/jps.24394.

(108) An, D. D.; Kullgren, B.; Jarvis, E. E.; Abergel, R. J. From Early Prophylaxis to Delayed Treatment: Establishing the Plutonium Decorporation Activity Window of Hydroxypyridinonate Chelating Agents. *Chem.-Biol. Interact.* **2017**, *267*, 80–88. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.034.

(109) Lahrouch, F. Approche macromoléculaire pour la décorporation d'actinides, Université Côte d'Azur, Nice, 2017.

(110) Lahrouch, F.; Siberchicot, B.; Fèvre, J.; Leost, L.; Aupiais, J.; Solari, P. L.; Den Auwer, C.; Di Giorgio, C. Carboxylate- and Phosphonate-Modified Polyethylenimine: Toward the Design of Actinide Decorporation Agents. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (1), 128–137. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02014.

(111) Lahrouch, F.; Chamayou, A. C.; Creff, G.; Duvail, M.; Hennig, C.; Lozano Rodriguez, M. J.; Den Auwer, C.; Di Giorgio, C. A Combined Spectroscopic/Molecular Dynamic Study for Investigating a Methyl-Carboxylated PEI as a Potential Uranium Decorporation Agent. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (3), 1300–1308. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02408.

(112) Lahrouch, F.; Sofronov, O.; Creff, G.; Rossberg, A.; Hennig, C.; Auwer, C. D.; Giorgio, C. D. Polyethyleneimine Methylphosphonate: Towards the Design of a New Class of Macromolecular Actinide Chelating Agents in the Case of Human Exposition. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (40), 13869–13877. https://doi.org/10.1039/C7DT02643A.

(113) Lahrouch, F.; Siberchicot, B.; Leost, L.; Aupiais, J.; Rossberg, A.; Hennig, C.; Den Auwer, C.; Di Giorgio, C. Polyethyleneimine Methylenecarboxylate: A Macromolecular DTPA Analogue to Chelate Plutonium (IV). *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54* (83), 11705–11708. https://doi.org/10.1039/c8cc05206a.

(114) Masotti, A.; Giuliano, A.; Ortaggi, G. Efficient Complexation-Ultrafiltration Process for Metal Ions Removal from Aqueous Solutions Using a Novel Carboxylated Polyethylenimine Derivative (PEI-COOH). *Curr. Anal. Chem.* **2010**, *6* (1), 37–42. https://doi.org/10.2174/157341110790069673.

(115) Abderrahim, O.; Didi, M. A.; Villemin, D. Polyethyleneimine Methylenephosphonic Acid for the Solid-Phase Sorption of Lead(II). *Anal. Lett.* **2009**, *42* (9), 1233–1244. https://doi.org/10.1080/00032710902901723.

(116) Abderrahim, O.; Didi, M. A.; Moreau, B.; Villemin, D. A New Sorbent for Selective Separation of Metal: Polyethylenimine Methylenephosphonic Acid. *Solvent Extr. Ion Exch.* **2006**, *24* (6), 943–955. https://doi.org/10.1080/07366290600952519.

(117) Popwell, S. J.; Schulz, M. D.; Wagener, K. B.; Batich, C. D.; Milner, R. J.; Lagmay, J.; Bolch, W. E. Synthesis of Polymeric Phosphonates for Selective Delivery of Radionuclides to Osteosarcoma. *Cancer Biother.Radiopharm.* **2014**, *29* (7), 273–282. https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1615.

(118) Ferreira, S.; Laranjo, M.; Brito, A.; Abrantes, A.; Metello, L.; Zeevart, J.; Louw, W.; Dormehl, I. An in Vivo Study to Analyse the Potential of ^{188}Re-PEI-MP for Metabolic Radiotherapy of Osteosarcoma and Bladder Carcinoma. 2.

(119) Dinse, C.; Baglan, N.; Cossonnet, C.; Bouvier, C. New Purification Protocol for Actinide Measurement in Excreta Based on Calixarene Chemistry. *Appl. Radiat. Isot.* **2000**, *53* (1–2), 381–386. https://doi.org/10.1016/s0969-8043(00)00175-5.

(120) Bouvier-Capely, C.; Manoury, A.; Legrand, A.; Bonthonneau, J. P.; Cuenot, F.; Rebière, F. The Use of Calix[6]Arene Molecules for Actinides Analysis in Urine and Drinking Water: An Alternative to Current Procedures. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2009**, *282* (2), 611. https://doi.org/10.1007/s10967-009-0152-1.

(121) Rodik, R.; Boyko, V.; Kalchenko, V. Calixarenes in Bio-Medical Researches. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (13), 1630–1655. https://doi.org/10.2174/092986709788186219.

(122) Reddy, J. D.; Cobb, R. R.; Dungan, N. W.; Matthews, L. L.; Aiello, K. V.; Ritter, G.; Eppler, B.; Kirk, J. F.; Abernethy, J. A.; Tomisaka, D. M.; Talton, J. D. Preclinical Toxicology, Pharmacology, and Efficacy of a Novel Orally Administered Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) Formulation. *Drug Dev. Res.* **2012**, *73* (5), 232–242. https://doi.org/10.1002/ddr.21018.

(123) Wilson, J. P.; Cobb, R. R.; Dungan, N. W.; Matthews, L. L.; Eppler, B.; Aiello, K. V.; Curtis, S.; Boger, T.; Guilmette, R. A.; Weber, W.; Doyle-Eisele, M.; Talton, J. D. Decorporation of Systemically Distributed Americium by a Novel Orally Administered Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) Formulation in Beagle Dogs. *Health Phys.* **2015**, *108* (3), 308–318. https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000199.

(124) Almalki, M. Extended Release of DTPA via Encapsulation into Nanoparticles for the Decorporation of Deposited Radioactive Contaminants in the Lungs. Doctor of Philosophy, Carleton University, Ottawa, Ontario, 2020. https://doi.org/10.22215/etd/2020-14204.

(125) Lee, K. Y.; Ha, W. S.; Park, W. H. Blood Compatibility and Biodegradability of Partially N-Acylated Chitosan Derivatives. *Biomaterials* **1995**, *16* (16), 1211–1216. https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)98126-Y.

(126) Onishi, H.; Machida, Y. Biodegradation and Distribution of Water-Soluble Chitosan in Mice. *Biomaterials* **1999**, *20* (2), 175–182. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00159-8.

(127) Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *1* (62), 3–11. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004.

(128) Lehr, C.-M.; Bouwstra, J. A.; Schacht, E. H.; Junginger, H. E. In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers. *Int. J. Pharm.* **1992**, *78* (1–3), 43–48. https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90353-4.

(129) Mitra, S.; Gaur, U.; Ghosh, P. C.; Maitra, A. N. Tumour Targeted Delivery of Encapsulated Dextran-Doxorubicin Conjugate Using Chitosan Nanoparticles as Carrier. *J. Controlled Release* **2001**, *74* (1–3), 317–323. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00342-x.

(130) De Campos, A. M.; Sánchez, A.; Alonso, M. J. Chitosan Nanoparticles: A New Vehicle for the Improvement of the Delivery of Drugs to the Ocular Surface. Application to Cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* **2001**, *224* (1–2), 159–168. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00760-8.

(131) Bhumkar, D. R.; Pokharkar, V. B. Studies on Effect of pH on Cross-Linking of Chitosan with Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech* **2006**, *7* (2), E138–E143. https://doi.org/10.1208/pt070250.

(132) Zhou, L.; Jia, Y.; Peng, J.; Liu, Z.; Al-Zaini, E. Competitive Adsorption of Uranium(VI) and Thorium(IV) Ions from Aqueous Solution Using Triphosphate-Crosslinked Magnetic Chitosan Resins. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2014**, *302* (1), 331–340. https://doi.org/10.1007/s10967-014-3125-y.

(133) Léost, L.; Roques, J.; Van Der Meeren, A.; Vincent, L.; Sbirrazzuoli, N.; Hennig, C.; Rossberg, A.; Aupiais, J.; Pagnotta, S.; Den Auwer, C.; Di Giorgio, C. Towards the Development of Chitosan Nanoparticles for Plutonium Pulmonary Decorporation. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (33), 11605–11618. https://doi.org/10.1039/C8DT02419G.

(134) Chen, S.; Ko, R.; Lai, E. P. C.; Wyatt, H.; Abergel, R. J.; Li, C. Encapsulated 3,4,4-Li(1,2-HOPO) in Chitosan Nanoparticles for Decorporation via Inhalation. *Radiat. Prot. Dosim.* **2018**, *182* (1), 107–111. https://doi.org/10.1093/rpd/ncy139.

(135) Miao, Y.; Sheng, J.; Wang, X.; Shi, C.; Sun, Q.; Liu, T.; Diwu, J. Melanin Nanoparticles as an Actinide in Vivo Sequestration Agent with Radiation Protection Effect. *New J. Chem.* **2021**, *45* (21), 9518–9525. https://doi.org/10.1039/D1NJ00999K.

(136) Nolibé, D.; Métivier, H.; Masse, R.; Chrétien, J. Benefits and Risks of Bronchopulmonary Lavage: A Review. *Radiat. Prot. Dosim.* **1989**, *26* (1–4), 337–343.

(137) IAEA. Lung Lavage. In *Medical management of persons internally contamined with radionuclides in a nuclear or radiological emergency , a manual for medical personnel.*; Austria, 2018; p 28.

(138) Morgan, C.; Bingham, D.; Holt, D. C. B.; Jones, D. M.; Lewis, N. J. Therapeutic Whole Lung Lavage for Inhaled Plutonium Oxide Revisited. *J. Radiol. Prot.* **2010**, *30* (4), 735–746. https://doi.org/10.1088/0952-4746/30/4/007.

(139) Sugarman, S. L.; Findley, W. M.; Toohey, R. E.; Dainiak, N. Rapid Response, Dose Assessment, and Clinical Management of a Plutonium-Contaminated Puncture Wound. *Health Phys.* **2018**, *115* (1), 57–64. https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000821.

(140) Klumpp, J.; Bertelli, L.; Dumit, S.; Gadd, M.; Poudel, D.; Waters, T. L. Response to a Skin Puncture Contaminated with ^{238}Pu at Los Alamos National Laboratory. *Health Phys.* **2020**, *119* (6), 704–714. https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001250.

(141) Stather, J. W.; Smith, H.; Bailey, M. R.; Birchall, A.; Bulman, R. A.; Crawley, F. E. The Retention of ^{14}C-DTPA in Human Volunteers after Inhalation or Intravenous Injection. *Health Phys.* **1983**, *44* (1), 45–52. https://doi.org/10.1097/00004032-198301000-00006.

(142) McAfee, J. G.; Gagne, G.; Atkins, H. L.; Kirchner, P. T.; Reba, R. C.; Blaufox, M. D.; Smith, E. M. Biological Distribution and Excretion of DTPA Labeled with Tc-99m and In-111. *J. Nucl. Med.* **1979**, *20* (12), 1273–1278.

(143) Boukhalfa, H.; Reilly, S. D.; Smith, W. H.; Neu, M. P. EDTA and Mixed-Ligand Complexes of Tetravalent and Trivalent Plutonium. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (19), 5816–5823. https://doi.org/10.1021/ic035484p.

(144) Bonin, L.; Aupiais, J.; Kerbaa, M.; Moisy, P.; Topin, S.; Siberchicot, B. Revisiting Actinide–DTPA Complexes in Aqueous Solution by CE-ICPMS and Ab Initio Molecular Dynamics. *RSC Adv.* **2016**, *6* (67), 62729–62741. https://doi.org/10.1039/C6RA08121E.

(145) Meyer, M.; Burgat, R.; Faure, S.; Batifol, B.; Hubinois, J.-C.; Chollet, H.; Guilard, R. Thermodynamic Studies of Actinide Complexes. 1. A Reappraisal of the Solution Equilibria between Plutonium(IV) and Ethylenediaminetetraacetic Acid ($EDTAH_4$) in Nitric Media. *Comptes Rendus Chimie* **2007**, *10* (10–11), 929–947. https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.04.006.

(146) Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *3 Suppl 3*, S131-139. https://doi.org/10.2215/CJN.04151206.

(147) Manolagas, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* **2000**, *21* (2), 115–137. https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395.

(148) Rochefort, G. Y.; Pallu, S.; Benhamou, C. L. Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue. *Osteoporosis Int.* **2010**, *21* (9), 1457–1469. https://doi.org/10.1007/s00198-010-1194-5.

(149) Mullender, M. G.; Huiskes, R.; Versleyen, H.; Buma, P. Osteocyte Density and Histomorphometric Parameters in Cancellous Bone of the Proximal Femur in Five Mammalian Species. *J. Orthop. Res.* **1996**, *14* (6), 972–979. https://doi.org/10.1002/jor.1100140618.

(150) Bonewald, L. F. The Amazing Osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26* (2), 229–238. https://doi.org/10.1002/jbmr.320.

(151) Schaffler, M. B.; Cheung, W.-Y.; Majeska, R.; Kennedy, O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif. Tissue Int.* **2014**, *94* (1), 5–24. https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y.

(152) Chen, H.; Senda, T.; Kubo, K. The Osteocyte Plays Multiple Roles in Bone Remodeling and Mineral Homeostasis. *Med. Mol. Morphol.* **2015**, *48* (2), 61–68. https://doi.org/10.1007/s00795-015-0099-y.

(153) Low, S. A.; Kopeček, J. Targeting Polymer Therapeutics to Bone. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64* (12), 1189–1204. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.012.

(154) Kane, R.; Ma, P. X. Mimicking the Nanostructure of Bone Matrix to Regenerate Bone. *Mater. Today* **2013**, *16* (11), 418–423. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.001.

(155) Moore, R. C.; Gasser, M.; Awwad, N.; Holt, K. C.; Salas, F. M.; Hasan, A.; Hasan, M. A.; Zhao, H.; Sanchez, C. A. Sorption of Plutonium(VI) by Hydroxyapatite. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2005**, *263* (1), 97–101. https://doi.org/10.1007/s10967-005-0019-z.

(156) Thomson, B. M.; Smith, C. L.; Busch, R. D.; Siegel, M. D.; Baldwin, C. Removal of Metals and Radionuclides Using Apatite and Other Natural Sorbents. *J. Environ. Eng.* **2003**, *129* (6), 492–499. https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:6(492).

(157) Mitterhauser, M.; Toegel, S.; Wadsak, W.; Mien, L.-K.; Eidherr, H.; Kletter, K.; Viernstein, H.; Kluger, R.; Engel, A.; Dudczak, R. Binding Studies of [^{18}F]-Fluoride and Polyphosphonates Radiolabelled with [^{99m}Tc], [^{111}In], [^{153}Sm] and [^{188}Re] on Bone Compartments: Verification of the Pre Vivo Model? *Bone* **2005**, *37* (3), 404–412. https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.027.

(158) Claessens, R. A. M. J.; Kolar, Z. I. Affinity of Tin(II) and Tin(II) Diphosphonates for Hydroxyapatite: An Experimental and Model Study. *Langmuir* **2000**, *16* (3), 1360–1367. https://doi.org/10.1021/la9812166.

(159) Wang, X.; Dai, X.; Shi, C.; Wan, J.; Silver, M. A.; Zhang, L.; Chen, L.; Yi, X.; Chen, B.; Zhang, D.; Yang, K.; Diwu, J.; Wang, J.; Xu, Y.; Zhou, R.; Chai, Z.; Wang, S. A 3,2-Hydroxypyridinone-Based Decorporation Agent That Removes Uranium from Bones In Vivo. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 2570. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10276-z.

(160) Nelson, M. L. Chapter 11. The Chemistry and Biology of the Tetracyclines. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Academic Press, 2002; Vol. 37, pp 105–114. https://doi.org/10.1016/S0065-7743(02)37012-X.

(161) Perrin, D. D. Binding of Tetracyclines to Bone. *Nature* **1965**, *208* (5012), 787–788. https://doi.org/10.1038/208787a0.

(162) Davies, A. K.; Cundall, R. B.; Dandiker, Y.; Slifkin, M. A. Materials Science Photo-Oxidation of Tetracycline Adsorbed on Hydroxyapatite in Relation to the Light-Induced Staining of Teeth. *J. Dent. Res.* **1985**, *64* (6), 936–939. https://doi.org/10.1177/00220345850640061701.

(163) Demers, P.; Fraser, D.; Goldbloom, R. B.; Haworth, J. C.; LaRochelle, J.; MacLean, R.; Murray, T. K. Effects of Tetracyclines on Skeletal Growth and Dentition. A Report by the Nutrition Committee of the Canadian Paediatric Society. *Can. Med. Assoc. J.* **1968**, *99* (17), 849–854.

(164) Neale, J. R.; Richter, N. B.; Merten, K. E.; Grant Taylor, K.; Singh, S.; Waite, L. C.; Emery, N. K.; Smith, N. B.; Cai, J.; Pierce, W. M. Bone Selective Effect of an Estradiol Conjugate with a Novel Tetracycline-Derived Bone-Targeting Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (3), 680–683. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.051.

(165) Jung, A.; Bisaz, S.; Fleisch, H. The Binding of Pyrophosphate and Two Diphosphonates by Hydroxyapatite Crystals. *Calcif. Tissue Res.* **1973**, *11* (4), 269–280. https://doi.org/10.1007/BF02547227.

(166) El-Mabhouh, A.; Angelov, C.; McEwan, A.; Jia, G.; Mercer, J. Preclinical Investigations of Drug and Radionuclide Conjugates of Bisphosphonates for the Treatment of Metastatic Bone Cancer. *Cancer Biother.Radiopharm.* **2004**, *19* (5), 627–640. https://doi.org/10.1089/cbr.2004.19.627.

(167) Yewle, J. N. Bifunctional Bisphosphonates for Delivering Biomolecules to Bone, Kentucky, U.S.A, 2012.

(168) Liepe, K. ^{188}Re-HEDP Therapy in the Therapy of Painful Bone Metastases. *World J. Nucl. Med.* **2018**, *17* (3), 133–138. https://doi.org/10.4103/wjnm.WJNM_85_17.

(169) Brown, J. P.; Morin, S.; Leslie, W.; Papaioannou, A.; Cheung, A. M.; Davison, K. S.; Goltzman, D.; Hanley, D. A.; Hodsman, A.; Josse, R.; Jovaisas, A.; Juby, A.; Kaiser, S.; Karaplis, A.; Kendler, D.; Khan, A.; Ngui, D.; Olszynski, W.; Ste-Marie, L.-G.; Adachi, J. Bisphosphonates for Treatment of Osteoporosis: Expected Benefits, Potential Harms, and Drug Holidays. *Can Fam Physician* **2014**, *60* (4), 324–333.

(170) Woo, S.-B.; Hellstein, J. W.; Kalmar, J. R. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Ann. Intern. Med.* **2006**, *144* (10), 753. https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009.

(171) Lange, R.; ter Heine, R.; Knapp, R. (FF); de Klerk, J. M. H.; Bloemendal, H. J.; Hendrikse, N. H. Pharmaceutical and Clinical Development of Phosphonate-Based Radiopharmaceuticals for the Targeted Treatment of Bone Metastases. *Bone* **2016**, *91*, 159–179. https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.08.002.

(172) Sartor, O. Overview of Samarium Sm 153 Lexidronam in the Treatment of Painful Metastatic Bone Disease. *Rev Urol* **2004**, *6* (Suppl 10), S3–S12.

(173) Anderson, P.; Nuñez, R. Samarium Lexidronam (153Sm-EDTMP): Skeletal Radiation for Osteoblastic Bone Metastases and Osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2007**, *7* (11), 1517–1527. https://doi.org/10.1586/14737140.7.11.1517.

(174) Ando, A.; Ando, I.; Tonami, N.; Kinuya, S.; Kazuma, K.; Kataiwa, A.; Nakagawa, M.; Fujita, N. 177Lu-EDTMP: A Potential Therapeutic Bone Agent. *Nucl. Med. Commun.* **1998**, *19* (6), 587–591.

(175) Kasugai, S.; Fujisawa, R.; Waki, Y.; Miyamoto, K.-I.; Ohya, K. Selective Drug Delivery System to Bone: Small Peptide $(Asp)_6$ Conjugation. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *15* (5), 936–943. https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.5.936.

(176) Stubbs, J. T.; Mintz, K. P.; Eanes, E. D.; Torchia, D. A.; Fisher, L. W. Characterization of Native and Recombinant Bone Sialoprotein: Delineation of the Mineral-Binding and Cell Adhesion Domains and Structural Analysis of the RGD Domain. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12* (8), 1210–1222. https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.8.1210.

(177) Fujisawa, R.; Wada, Y.; Nodasaka, Y.; Kuboki, Y. Acidic Amino Acid-Rich Sequences as Binding Sites of Osteonectin to Hydroxyapatite Crystals. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, *1292* (1), 53–60. https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00190-5.

(178) Sekido, T.; Sakura, N.; Higashi, Y.; Miya, K.; Nitta, Y.; Nomura, M.; Sawanishi, H.; Morito, K.; Masamune, Y.; Kasugai, S.; Yokogawa, K.; Miyamoto, K.-I. Novel Drug Delivery System to Bone Using Acidic Oligopeptide: Pharmacokinetic Characteristics and Pharmacological Potential. *J. Drug Targeting* **2001**, *9* (2), 111–121. https://doi.org/10.3109/10611860108997922.

(179) Ishizaki, J.; Waki, Y.; Takahashi-Nishioka, T.; Yokogawa, K.; Miyamoto, K. Selective Drug Delivery to Bone Using Acidic Oligopeptides. *J. Bone Miner. Metab.* **2009**, *27* (1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s00774-008-0004-z.

(180) Bassi, A. K.; Gough, J. E.; Zakikhani, M.; Downes, S. The Chemical and Physical Properties of Poly(ε-Caprolactone) Scaffolds Functionalised with Poly(Vinyl Phosphonic Acid-Co-Acrylic Acid). *J. Tissue Eng.* **2011**, 615328. https://doi.org/10.4061/2011/615328.

(181) Dormehl, I. C.; Louw, W. K. A.; Milner, R. J.; Kilian, E.; Schneeweiss, F. H. A. Biodistribution and Pharmacokinetics of Variously Sized Molecular Radiolabelled Polyethyleneiminomethyl Phosphonic Acid as a Selective Bone Seeker for Therapy in the Normal Primate Model. *Arzneimittelforschung* **2001**, *51* (3), 258–263. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300033.

(182) Zeevaart, J.; Louw, W.; Kolar, Z.; Kilian, E.; Rensburg, F.; Dormehl, I. Biodistribution and Pharmacokinetics of Variously Molecular Sized ^{117m}Sn(II)-Polyethyleneiminomethyl Phosphonate Complexes in the Normal Primate Model as Potential Selective Therapeutic Bone Agents. *Arzneimittelforschung* **2011**, *54* (06), 340–347. https://doi.org/10.1055/s-0031-1296981.

(183) Jarvis, N.; Zeevaart, J.; Wagener, J.; Louw, W.; Dormehl, I.; Milner, R.; Killian, E. Metal-Ion Speciation in Blood Plasma Incorporating the Water-Soluble Polymer, Polyethyleneimine Functionalised with Methylenephosphonate Groups, in Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Radiochim. Acta* **2002**, *90*, 237–246. https://doi.org/10.1524/ract.2002.90.4_2002.237.

(184) Rand, M.; Fuger, J.; Grenthe, I.; Neck, V.; Rai, D. Carbon Compounds and Complexes. In *Chemical Thermodynamics of Thorium*; OECD NEA; Paris (France), 2009; Vol. 11, p 359.

(185) Astrup, P. A Simple Electrometric Technique for the Determination of Carbon Dioxide Tension in Blood and Plasma, Total Content of Carbon Dioxide in Plasma, and Bicarbonate Content in "Separated" Plasma at a Fixed Carbon Dioxide Tension (40 Mm Hg). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1956**, *8* (1), 33–43. https://doi.org/10.3109/00365515609049241.

(186) Siddiqi, S. A.; Azhar, U. Carbonate Substituted Hydroxyapatite. In *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites,* 1st ed.; Samar Khan, A., Anwar Chaudhry, A., Eds.*;* Elsevier: Amsterdam, The Netherlands 2020; pp 149–173. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102834-6.00006-9.

(187) Taylor, D. M.; Sowby, F. D.; Kember, N. F. The Metabolism of Americium and Plutonium in the Rat. *Phys. Med. Biol.* **1961**, *6* (1), 73–86. https://doi.org/10.1088/0031-9155/6/1/206.

(188) Bruenger, F. W.; Smith, J. M.; Atherton, D. R.; Miller, S. C.; Jee, W. S. S.; Stevens, W. Radiation Dose Rates to the Proximal Humerus of Growing Beagles Injected with 239 Pu. *Radiat. Res.* **1984**, *97* (2), 302. https://doi.org/10.2307/3576281.

(189) Bénard, P.; Brandel, V.; Dacheux, N.; Jaulmes, S.; Launay, S.; Lindecker, C.; Genet, M.; Louër, D.; Quarton, M. $Th_4(PO_4)_4P_2O_7$, a New Thorium Phosphate: Synthesis, Characterization, and Structure Determination. *Chem. Mater.* **1996**, *8* (1), 181–188. https://doi.org/10.1021/cm950302d.

(190) Zurita, C.; Tsushima, S.; Bresson, C.; Garcia Cortes, M.; Solari, P. L.; Jeanson, A.; Creff, G.; Den Auwer, C. How Does Iron Storage Protein Ferritin Interact with Plutonium (and Thorium)? *Chem. - Eur. J.* **2021**, *27* (7), 2393–2401. https://doi.org/10.1002/chem.202003653.

(191) Collier, C. G.; James, A. C.; Ellender, M. The Effect of Alpha Irradiation on Retention of Particles in the Rat Lung. *Ann Occup Hyg* **1988**, *32* (inhaled_particles_VI), 1007–1015. https://doi.org/10.1093/annhyg/32.inhaled_particles_VI.1007.

(192) Donaldson, K.; Li, X. Y.; MacNee, W. Ultrafine (Nanometre) Particle Mediated Lung Injury. *J. Aerosol Sci.* **1998**, *29* (5–6), 553–560. https://doi.org/10.1016/S0021-8502(97)00464-3.

(193) Lizon, C.; Fritsch, P. Chemical Toxicity of Some Actinides and Lanthanides towards Alveolar Macrophages: An in Vitro Study. *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75* (11), 1459–1471. https://doi.org/10.1080/095530099139322.

(194) Van der Meeren, A.; Moureau, A.; Laurent, D.; Laroche, P.; Angulo, J. F. In Vitro Assessment of Plutonium Uptake and Release Using the Human Macrophage-like THP-1 Cells. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *37*, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.015.

(195) Rudolph, C.; Ortiz, A.; Schillinger, U.; Jauernig, J.; Plank, C.; Rosenecker, J. Methodological Optimization of Polyethylenimine (PEI)-Based Gene Delivery to the Lungs of Mice via Aerosol Application. *J. Gene Med.* **2005**, *7* (1), 59–66. https://doi.org/10.1002/jgm.646.

(196) Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J. Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2006**, *114* (1), 100–109. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014.

(197) Wang, L.; Zhao, R.; Wang, X.; Mei, L.; Yuan, L.; Wang, S.; Chai, Z.; Shi, W. Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Thorium Dioxide Nanoparticles and Their Performance on the Adsorption of Dye Molecules. *CrystEngComm* **2014**, *16* (45), 10469–10475. https://doi.org/10.1039/C4CE01731E.

(198) Brown, E. J. Phagocytosis. *Bioessays* **1995**, *17* (2), 109–117. https://doi.org/10.1002/bies.950170206.

(199) Mukherjee, S.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiol. Rev.* **1997**, *77* (3), 759–803. https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.759.

(200) Moulin, C.; Amekraz, B.; Steiner, V.; Plancque, G.; Ansoborlo, E. Speciation Studies on DTPA Using the Complementary Nature of Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (9), 1151–1161. https://doi.org/10.1366/00037020360696026.

(201) Tomson, M. B.; Kan, A. T.; Oddo, J. E. Acid/Base and Metal Complex Solution Chemistry of the Polyphosphonate DTPMP versus Temperature and Ionic Strength. *Langmuir* **1994**, *10* (5), 1442–1449. https://doi.org/10.1021/la00017a021.

(202) Moedritzer, K.; Irani, R. R. The Direct Synthesis of α-Aminomethylphosphonic Acids. Mannich-Type Reactions with Orthophosphorous Acid. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (5), 1603–1607. https://doi.org/10.1021/jo01343a067.

(203) von Harpe, A.; Petersen, H.; Li, Y.; Kissel, T. Characterization of Commercially Available and Synthesized Polyethylenimines for Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2000**, *69* (2), 309–322. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(00)00317-5.

(204) Ravel, B.; Newville, M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data Analysis for X-Ray Absorption Spectroscopy Using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, *12* (4), 537–541. https://doi.org/10.1107/S0909049505012719.

(205) Kato, Y.; Boskey, A.; Spevak, L.; Dallas, M.; Hori, M.; Bonewald, L. F. Establishment of an Osteoid Preosteocyte-like Cell MLO-A5 That Spontaneously Mineralizes in Culture. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16* (9), 1622–1633. https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.9.1622.

(206) Fèvre, J.; Leveille, E.; Jeanson, A.; Santucci-Darmanin, S.; Pierrefite-Carle, V.; Carle, G. F.; Den Auwer, C.; Di Giorgio, C. Chelating Polymers for Targeted Decontamination of Actinides: Application of PEI-MP to Hydroxyapatite-Th(IV). *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (9), 4732. https://doi.org/10.3390/ijms23094732.

Annexes

Annexe I : Caractérisation du polymère de départ (polyéthylèneimine 25 kDa), détermination du pourcentage d'amine I : II : III.

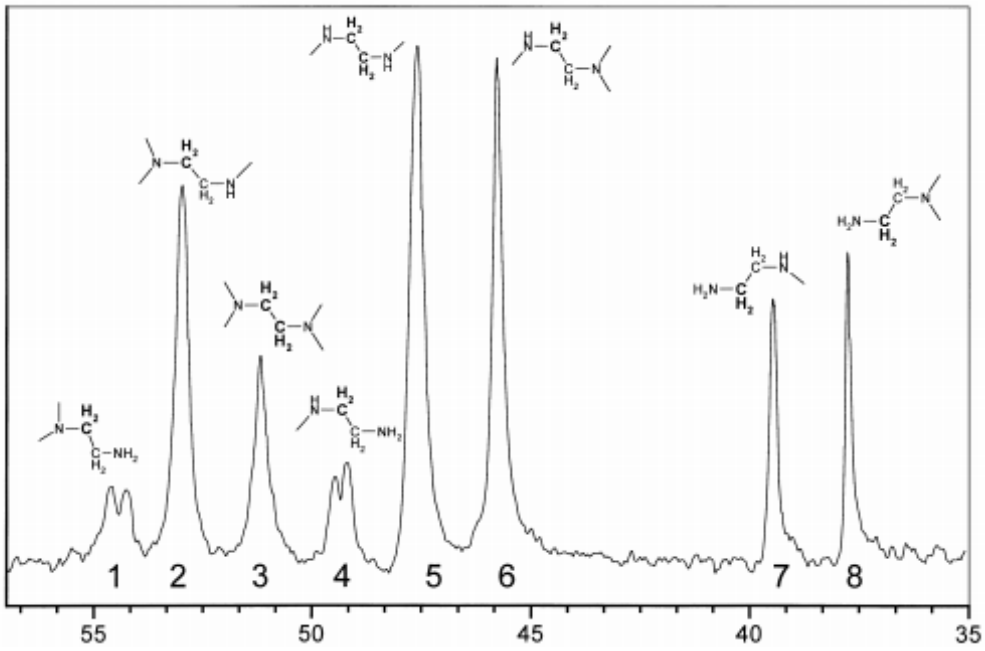


Figure 64 : RMN ^{13}C d'un polyéthylèneimine.[203]

D'après Von Harpe *& al.*[203] le pourcentage d'amines primaires secondaires et tertiaires au sein du polymère peut être déterminé en utilisant l'aire sous la courbe d'un spectre RMN ^{13}C (Figure 64). Le chevauchement de plusieurs pics correspondant à des carbones liés à différents types d'amines (Figure 65) ne permet par de déterminer le pourcentage d'amines primaires, secondaires et tertiaires dans notre polymère dans notre cas, malgré des essais sur un appareil 500 MHz avec une durée d'accumulation de 24 h.

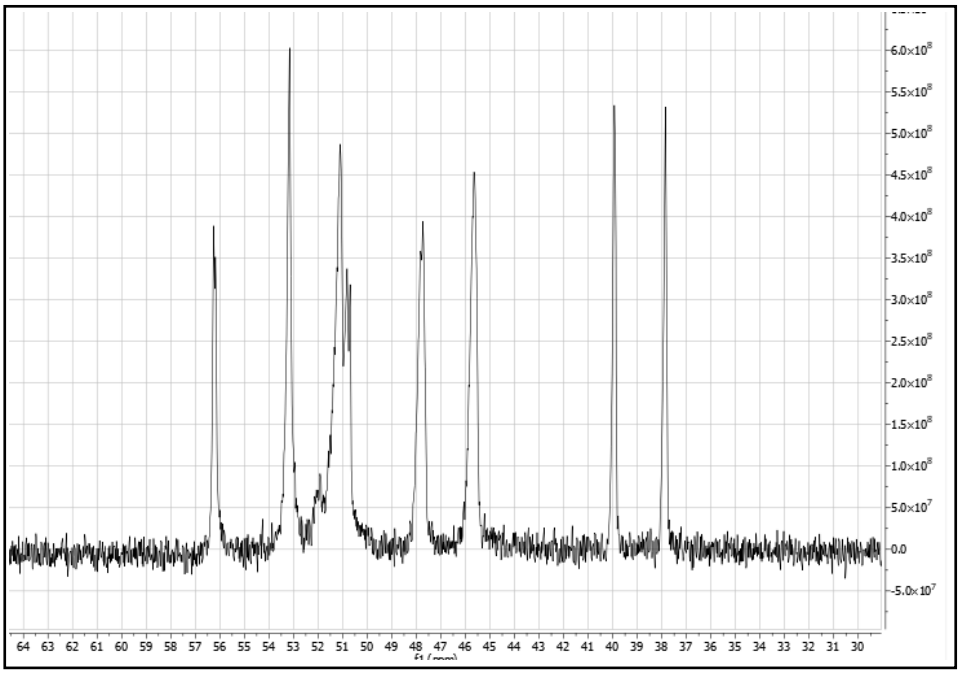


Figure 65 : RMN ^{13}C du polyéthylèneimine de départ (PEI 25 kDa) utilisé lors de notre étude.

Annexe II : Caractérisation du PEI-MC et du PEI-MP

1. Titration des ions sodium par ICP-MS

La courbe d'étalonnage du sodium est présentée en Figure 66.

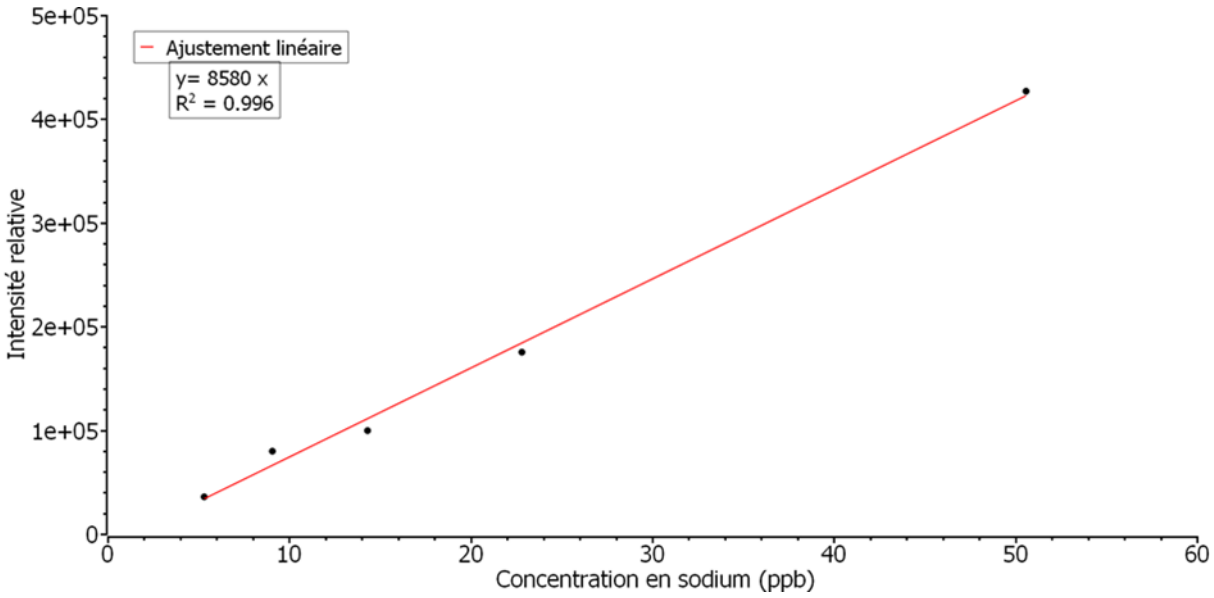


Figure 66 : Courbe d'étalonnage du sodium (Na^+) par ICP – MS.

Après minéralisation du PEI-MC ou du PEI-MP (15 mg), 2,18 mg de sodium soit 2,2 ± 0,2 Na / monomère a été trouvé pour le PEI-MC et 2,46 mg de sodium soit 3,5 ± 0,4 Na/monomère dans le cas du PEI-MP.

2. Titration des ions chlorures par chromatographie ionique

La solution de chlorure utilisée pour la gamme de calibration a été préparée à partir d'une solution commerciale standard (100 $mg.L^{-1}$). Les résultats sont exprimés en faisant la moyenne de 3 mesures.

Tableau 17 :Signal (hauteur du pic) en fonction de la concentration en anions chlorure.

Signal (hauteur des pics)	[Cl^-] (mg/L)
0,51	3,91
1,17	7,81
2,56	15,62
5,24	31,25
12,01	62,5
27,2	125

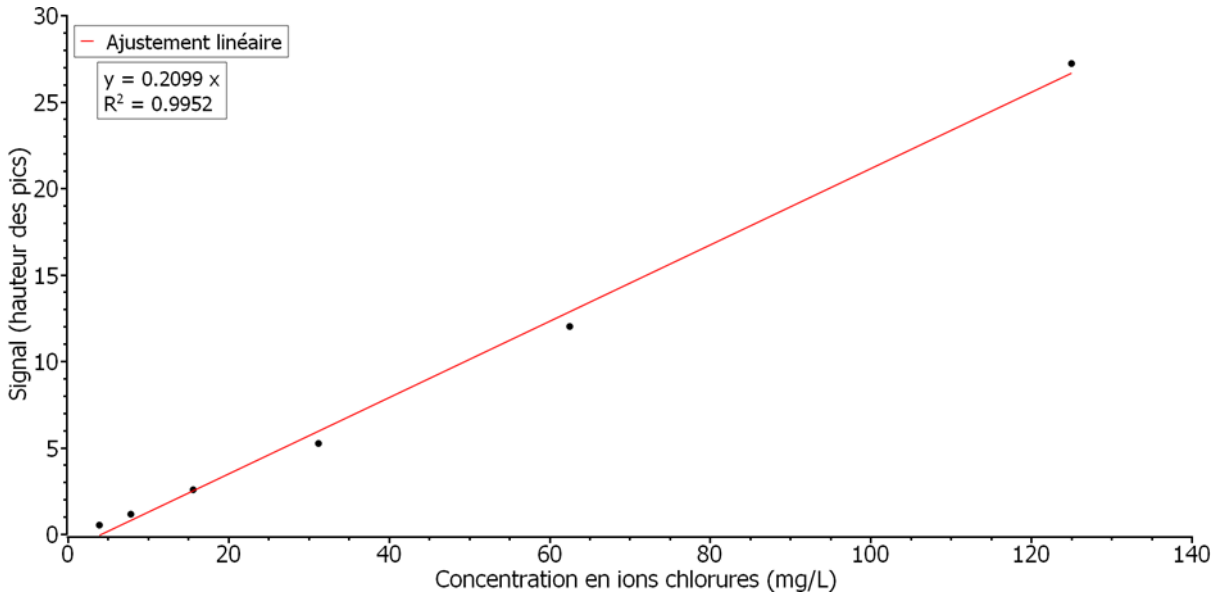


Figure 67 : Courbe d'étalonnage des ions chlorures (Cl^-).

Tableau 18 : Pourcentage de chlore en masse par polymère

Echantillons	Signal (hauteur du pic)	[Cl^-] (mg/L)	[PEI comme monomère] (mg/L)	Cl^- (% massique)
PEI- MC (1/10)	0,85	4,05	3512	0,12
PEI-MP (1/10)	0,12	0,572	2320	0,02

Dans les deux cas (PEI-MC et PEI-MP), le pourcentage massique en ions chlorures est négligeable.

Annexe III : Dosage du thorium et contamination de la HAp

1. Courbe d'étalonnage du Th par ICP-MS

Avant chaque mesure du Th par ICP-MS, une courbe d'étalonnage (calibration externe) du Th est réalisée.

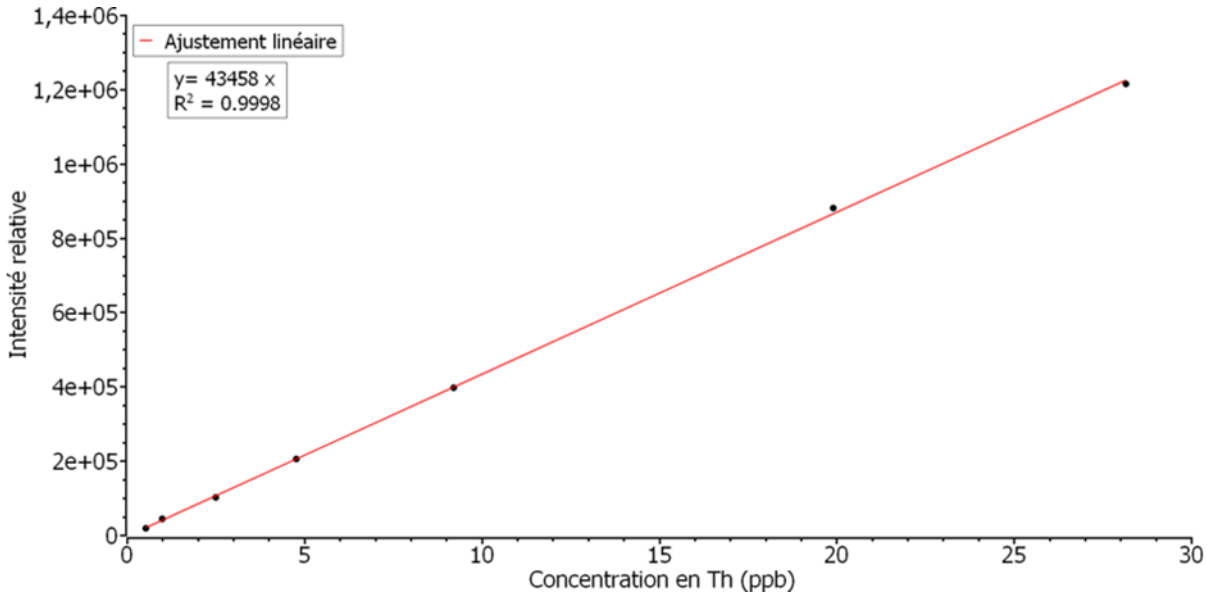


Figure 68 :Courbe d'étalonnage du Th par ICP-MS.

2. Dosage du Th dans plusieurs échantillons de HAp

Deux lots de HAp ont été préparés au cours de notre étude. Les résultats du dosage du thorium sur chacun de ces lots (n= 3 pour 6 échantillons indépendants) pour 5 mg de HAp sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Masse de thorium (en µg) pour 5 mg de HAp.

Lot	Th (µg)
1	35,0 ± 1,2
2	34,6 ± 0,9

La contamination de la HAp par notre méthode est donc reproductible et homogène au sein d'un lot de HAp.

3. Concentration en Th après chaque étape de lavage de la HAp.

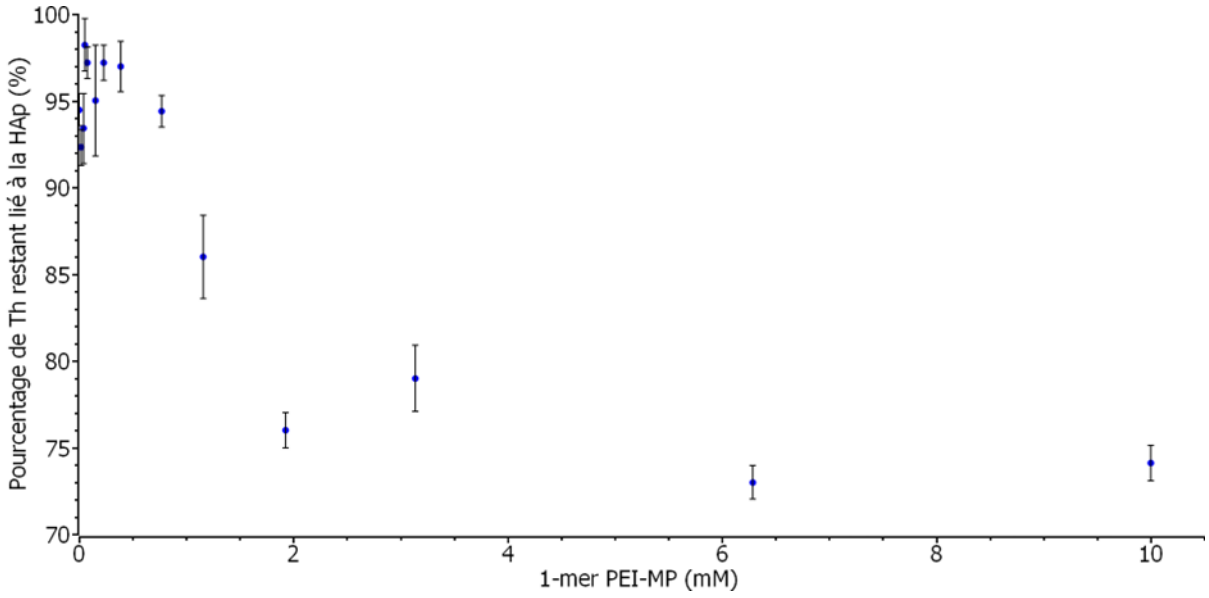
Après contamination de la HAp avec du carbonate de thorium $Th(CO_3)_5^{6-}$, la poudre de HAp a subi trois cycles de centrifugation/lavage à l'eau ultrapure jusqu'à l'absence de détection de thorium dans les eaux de lavage (ICP-MS). Lors du 1er lavage, une quantité de thorium de 3,40 ± 0,04 mg est mesurée. Dans le second filtrat on obtient 1,90 ± 0,06 mg de Th . Le troisième et dernier filtrat ne contient pas une quantité de thorium détectable par ICP-MS (< 0,1 ppb dans 10 mL).

Annexe IV : Dosage du thorium restant lié à la matrice osseuse (HAp) pour les études dose-réponse et cinétique

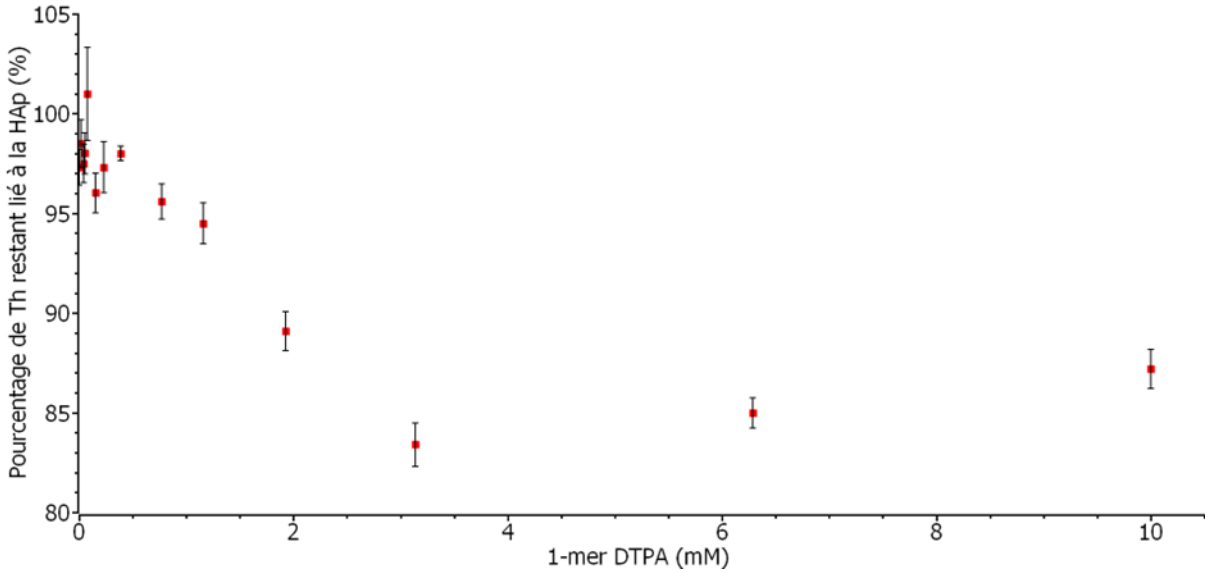
Pour chaque échantillon, la partie « complémentaire », soit 1 mL de surnageant restant ainsi que les 5 mg de poudre de HAp introduits initialement, sont minéralisés comme décrit en partie expérimentale (5 mL d'acide nitrique 67-70 %, Plasmapure plus degree, SCP Science, à 120 °C au DigiPrep pendant 2 h). Les échantillons minéralisés sont ensuite évaporés à sec à 90 °C au DigiPrep. La concentration en thorium est déterminée par ICP-MS comme décrit en partie expérimentale, au moyen d'une calibration externe. Chaque point représente la moyenne de 3 expériences (± écart type). Les Figures 69 et 70 représentent le pourcentage de thorium restant lié à la matrice osseuse (HAp), dans le cas des expériences de type dose réponse et cinétique, respectivement.

1. Etude de type dose-réponse

a)



b)



c)

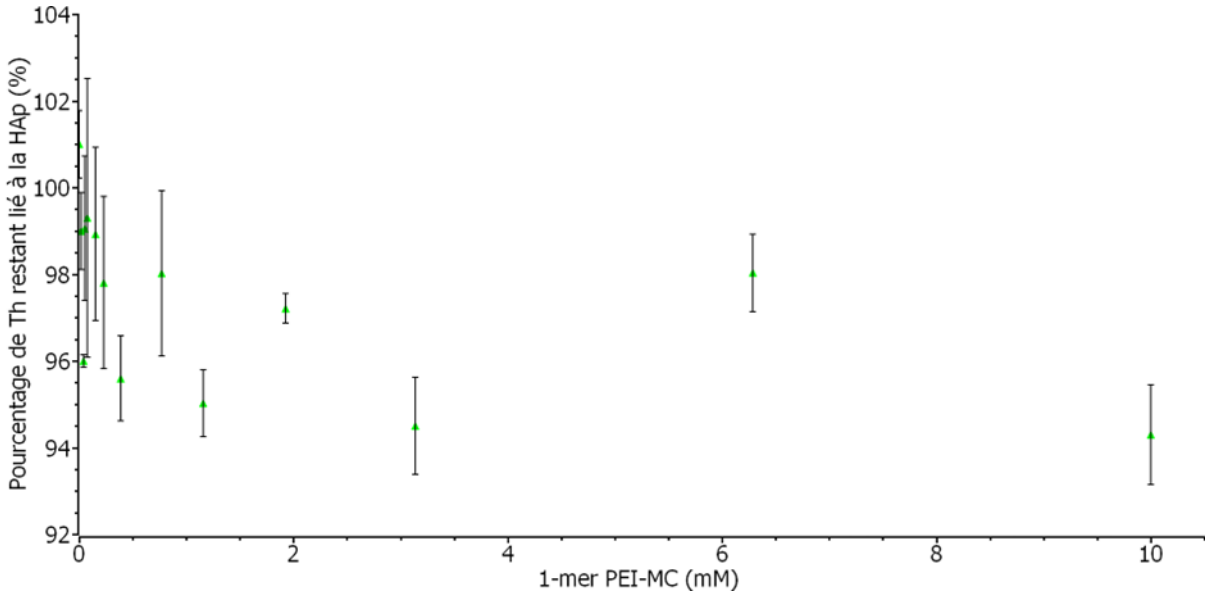
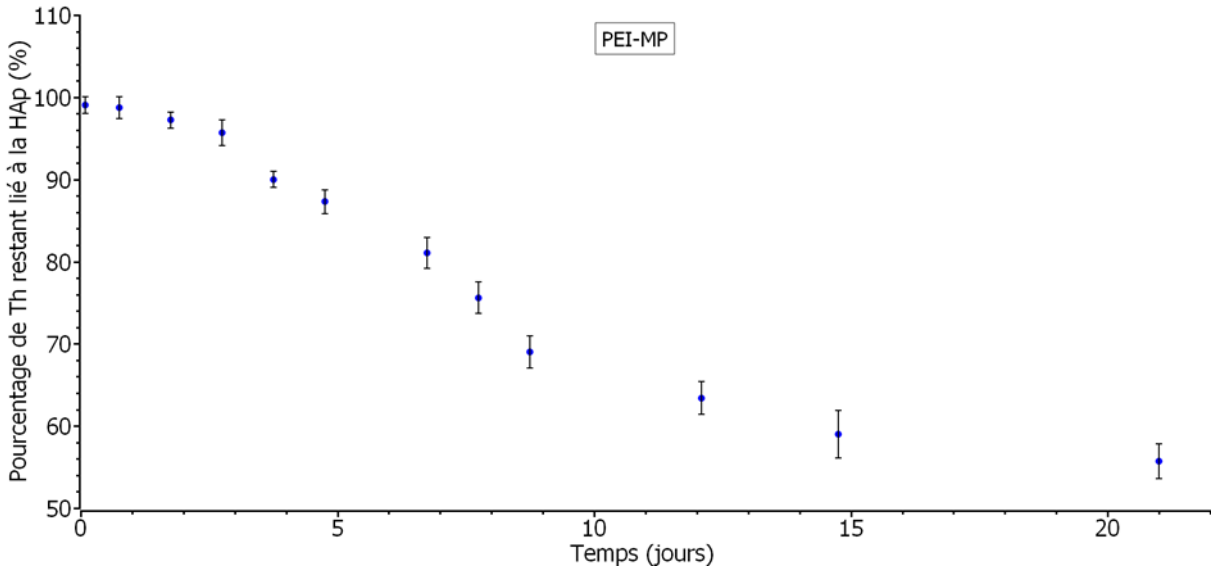


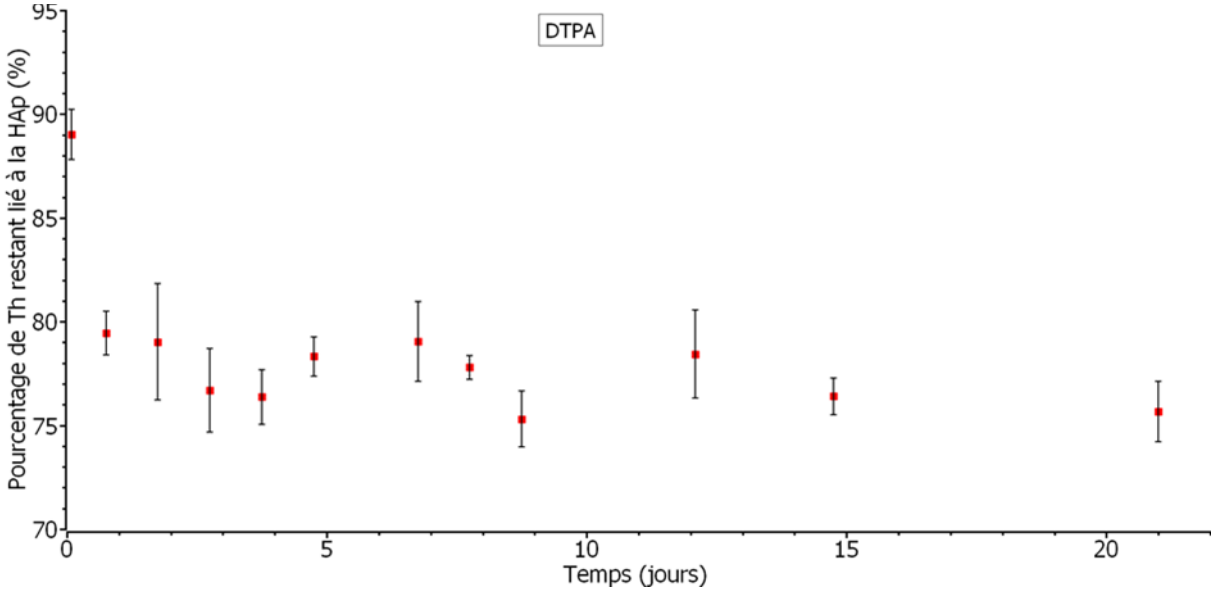
Figure 69 : Pourcentage de Th restant lié à la HAp lors de l'expérience dose-réponse. a) PEI-MP b) DTPA c) PEI-MC.

2. Etude cinétique

a)



b)



c)

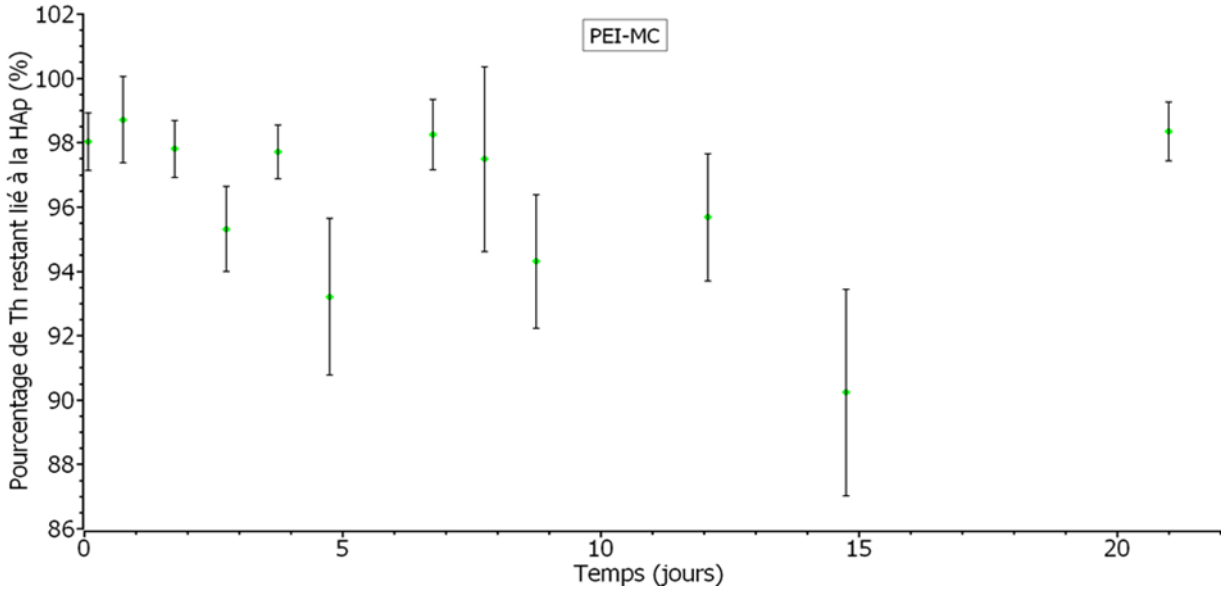


Figure 70 : Pourcentage de Th restant lié à la HAp lors de l'expérience cinétique. a) PEI-MP b) DTPA c) PEI-MC.

Tableau 20: Pourcentage de thorium restant lié à la HAp après l'administration de plusieurs doses

	% de Th à j_{12}	**% de Th à j_{21}**
1 dose seulement à j_1		54,8 ± 2,9
2 doses [a]	64,3 ± 1,0	36,2 ± 0,9

[a] expérience indépendante: le milieu a été retiré à j_{12} et remplacé par un échantillon frais de PEI-MP (6,3 mM 1-mer)

Annexe V: Tests statistiques : test de Student et de Welch

Le but est de comparer si deux moyennes sont significativement différentes. On compare donc chaque échantillons à son blanc respectif, dans le but ici soit d'évaluer la présence d'un éventuel effet cytotoxique, ou d'évaluer la significativité d'un pourcentage de thorium décontaminé.

On appliquera un test bilatéral car on cherche à déterminer si la moyenne de la série 1 (blanc, notée μ_1) est différente de la moyenne de la série 2 (notée μ_2).

Avant d'effectuer un test de Student, il est nécessaire d'effectuer un test de Fisher-Snedecor afin de vérifier que les variances des deux séries de mesures (notées respectivement s_1^2 et s_2^2) ne sont pas significativement différentes.

On part de l'hypothèse : $H_0 : s_1^2 = s_2^2$

On calcule : $F_{calc} : s_1^2 / s_2^2$ (on prend au numérateur la plus grande des deux variances afin d'avoir $F_{calc} > 1$).

On lit F_{crit} dans la table de Fisher-Snedecor pour un niveau de confiance fixé (ici 95 %) (Tableau 21).

Si $F_{calc} > F_{crit}$ alors on rejette H_0 et on applique un test de Welch. Si $F_{calc} < F_{crit}$ on accepte H_0, on applique alors un test de Student.

Tableau 21 : Table F de Fisher Snedecor 95 % de confiance (utilisation bilatérale).

$\nu_2 \setminus \nu_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.6	963.3	968.6	973.0	976.7	979.8	982.5	984.9
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.41	39.42	39.43	39.43
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.37	14.34	14.30	14.28	14.25
4	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90	8.84	8.79	8.75	8.72	8.68	8.66
5	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68	6.62	6.57	6.52	6.49	6.46	6.43
6	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52	5.46	5.41	5.37	5.33	5.30	5.27
7	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82	4.76	4.71	4.67	4.63	4.60	4.57
8	7.57	6.06	5.42	5.05	4.82	4.65	4.53	4.43	4.36	4.30	4.24	4.20	4.16	4.13	4.10
9	7.21	5.71	5.08	4.72	4.48	4.32	4.20	4.10	4.03	3.96	3.91	3.87	3.83	3.80	3.77
10	6.94	5.46	4.83	4.47	4.24	4.07	3.95	3.85	3.78	3.72	3.66	3.62	3.58	3.55	3.52
11	6.72	5.26	4.63	4.28	4.04	3.88	3.76	3.66	3.59	3.53	3.47	3.43	3.39	3.36	3.33
12	6.55	5.10	4.47	4.12	3.89	3.73	3.61	3.51	3.44	3.37	3.32	3.28	3.24	3.21	3.18
13	6.41	4.97	4.35	4.00	3.77	3.60	3.48	3.39	3.31	3.25	3.20	3.15	3.12	3.08	3.05
14	6.30	4.86	4.24	3.89	3.66	3.50	3.38	3.29	3.21	3.15	3.09	3.05	3.01	2.98	2.95
15	6.20	4.77	4.15	3.80	3.58	3.41	3.29	3.20	3.12	3.06	3.01	2.96	2.92	2.89	2.86

Pour chaque type de test on part de l'hypothèse $H_0 : \mu_1 = \mu_2$

Le tableau 22 présente les deux types de tests.

Tableau 22 : Les paramètres du test de Student et du test de Welch

	Test de Student	**Test de Welch**
Hypothèse sur la variance	$s_1^2 = s_2^2$	$s_1^2 \neq s_2^2$
Ecart type groupé (s_p)	$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	
Test statistique (t)	$t = \frac{\lvert\mu_1 - \mu_2\rvert}{s_p} \times \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	
Degrés de liberté (ν)	$\nu = n_1 + n_2 - 2$	$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$

A partir du degrés de liberté de la valeur de t, on détermine une valeur appelée « p-value » (notée p). Si la p-value est inférieure ou égale au seuil de significativité 0,05, nous pouvons rejeter l'hypothèse nulle et accepter l'hypothèse alternative. En d'autres termes, nous pouvons conclure que les valeurs moyennes des séries 1 et 2 sont significativement différentes.

Annexe VI : Etude de la cytotoxicité au moyen d'un test MTT

Le test MTT est un test qui permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules et ainsi, leur viabilité. Après 24 ou 48 h les cellules sont incubées en présence d'une solution de MTT à 37°C pendant une heure. Pour des cellules viables, l'activité mitochondriale est constante : une augmentation ou une diminution du nombre de cellules viables est linéairement liée à l'activité mitochondriale. Si la cellule est vivante, elle métabolise le MTT en cristaux de formazan au sein des mitochondries (Figure 71). Ces cristaux sont de couleur violette. L'absorbance à 570 nm (absorbance du formazan) et à 690 nm (bruit de fond) est donc mesurée. L'absorbance moyenne des cellules non exposées aux molécules chélatantes est prise comme référence. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé suivant le rapport, pour chaque échantillon, entre l'absorbance des cellules exposées aux molécules chélatantes par rapport à l'absorbance moyenne des cellules non exposées (blanc). Chaque résultat est la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées sous forme de triplicat. Les résultats sont exprimés en moyenne (pourcentage) ± écart type.

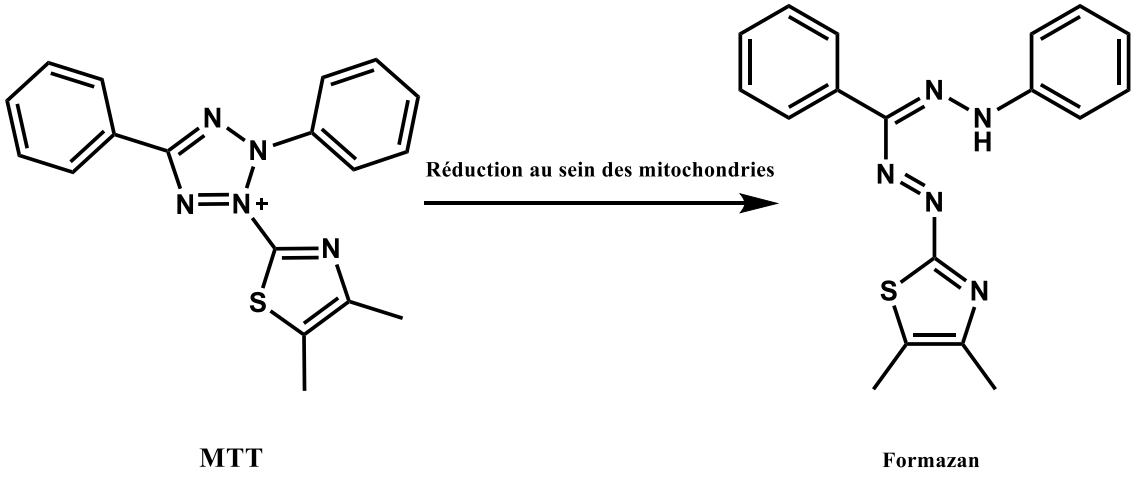
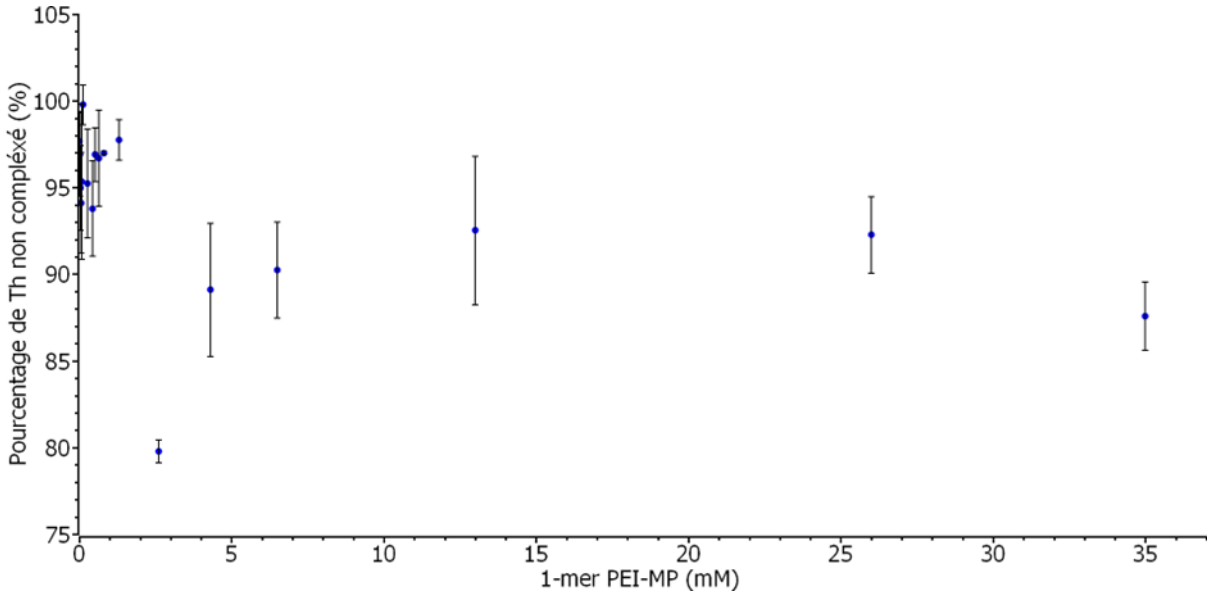


Figure 71 : Schéma de la réaction de réduction du MTT se déroulant au sein des mitochondries des cellules vivantes.

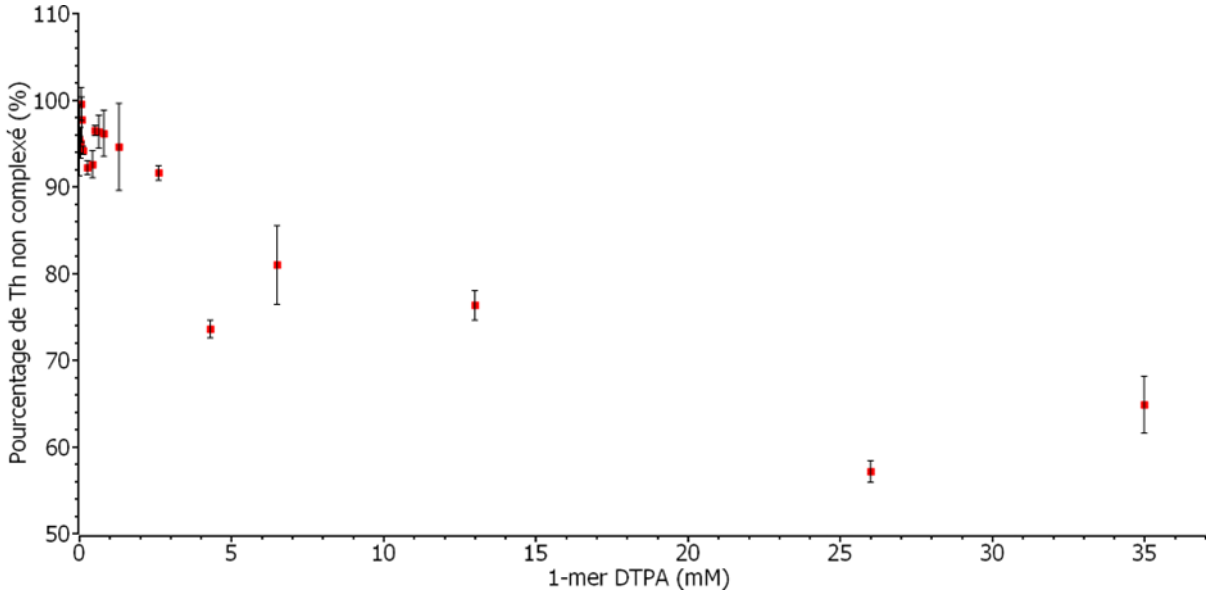
Annexe VII : Etude thermodynamique de l'équilibre NPs de Th sous forme solide *vs* forme soluble en présence de molécules chélatantes : dosage du Th non complexé par les molécules chélatantes.

Pour chaque échantillon, la partie « complémentaire », soit environ 1,15 mL de surnageant restant ainsi que les NPs de thorium ,sont minéralisés comme décrit en partie expérimentale (5 mL d'acide nitrique 67-70 %, Plasmapure plus degree, SCP Science, à 120 °C au DigiPrep pendant 2 h). Les échantillons minéralisés sont ensuite évaporés à sec à 90 °C au DigiPrep. La concentration en thorium des NPs (culot) est déterminée par ICP-MS comme décrite en partie expérimentale, au moyen d'une calibration externe. Chaque point représente la moyenne de 3 expériences (± écart type).

a)



b)



c)

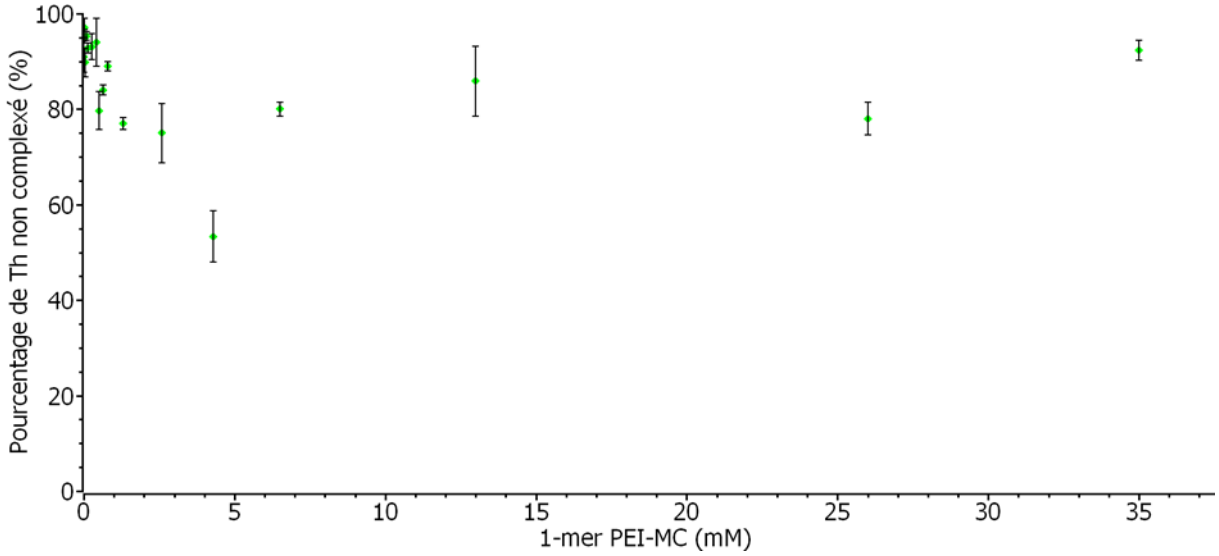


Figure 72 : Pourcentage de Th non complexé par les molécules chélatantes lors de l'expérience dose-réponse. a) PEI-MP b) DTPA c) PEI-MC.

Annexe VIII : Suivi de la phagocytose, dosage du thorium intracellulaire

Pour chaque échantillon, les cellules sont minéralisées directement au sein de la plaque 24 puits par ajout de 1 mL d'une solution d'acide nitrique 30 % (la concentration de l'acide nitrique est volontairement diminuée pour éviter de « minéraliser » la plaque 24 puits). Cette solution est ensuite introduite dans un volume de 4 mL d'acide nitrique 67-70 % , puis chauffée à 120 °C pendant 2 h au DigiPrep. Les échantillons minéralisés sont ensuite évaporés à sec à 90 °C au DigiPrep. La concentration en thorium est déterminée par ICP-MS comme décrit en partie expérimentale, au moyen d'une calibration externe. Chaque point représente la moyenne de 2 expériences réalisées en 3 fois (± écart type). Les Figures 73 et 74 représentent le pourcentage de thorium intracellulaire en fonction du temps d'incubation des nanoparticules de thorium avec les cellules RAW 264.7 et après une heure d'incubation (+ rinçage) des NPs de thorium pour une masse de thorium par puits de 2,5 ± 0,1 µg.

1. Pourcentage de thorium intracellulaire lors des expériences de suivi de la phagocytose

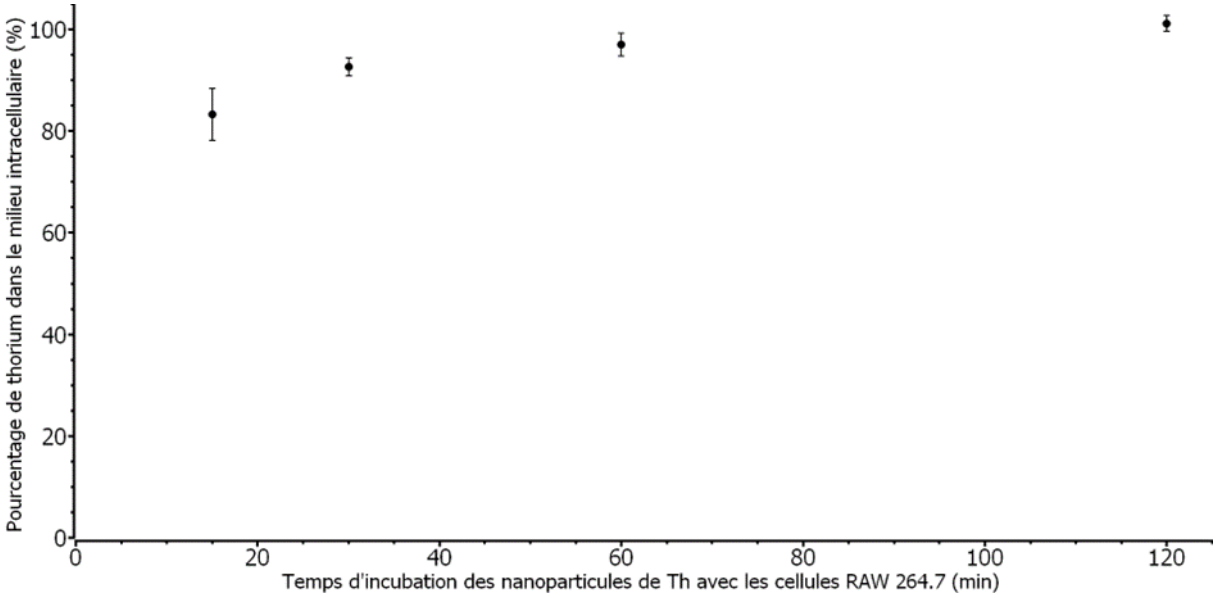


Figure 73 : Pourcentage de thorium présent dans le milieu intracellulaire en fonction du temps d'incubation des nanoparticules de Th (min) avec les cellules RAW 264.7.

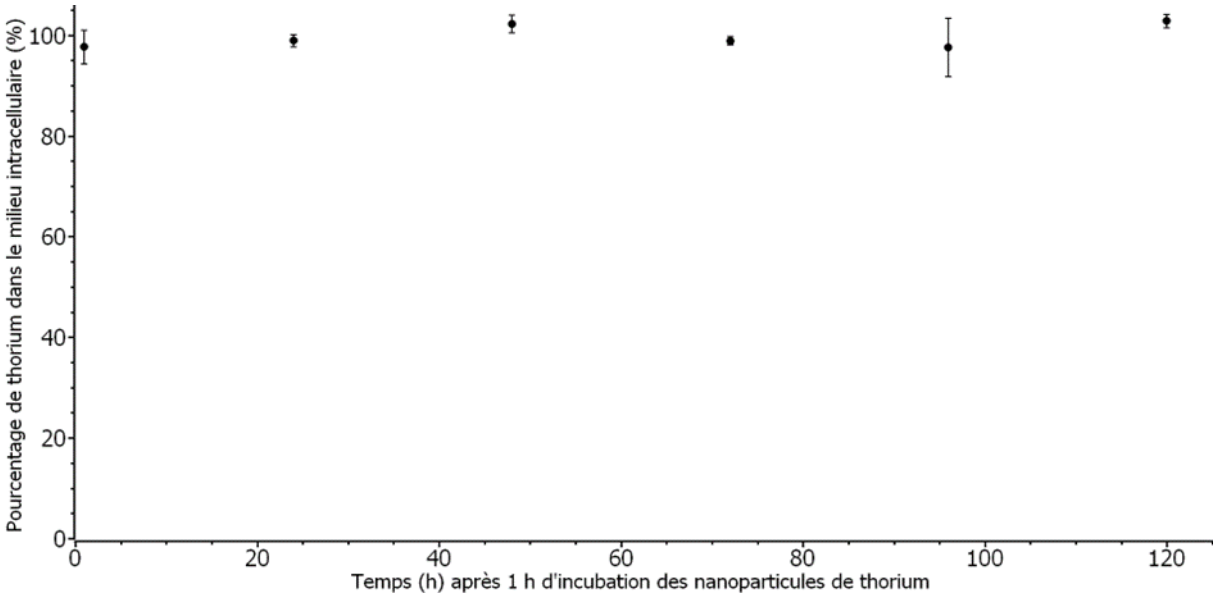


Figure 74 : Pourcentage de thorium présent dans le milieu intracellulaire après 1 h d'incubation des NPs de thorium (Th 2,5 ± 0,1 µg en masse) avec les cellules RAW 264.7.

2. Pourcentage de thorium extracellulaire dans le cas d'une contamination initiale de 24,0 ± 1,0 µg en masse de Th, soit environ 1000 NPs par cellules

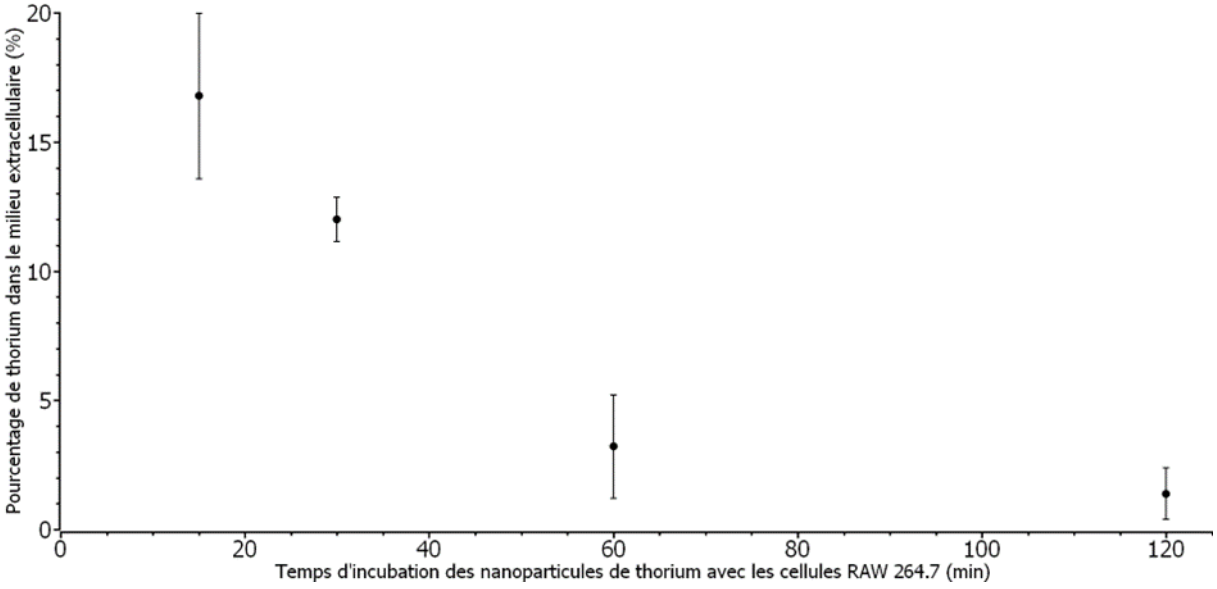


Figure 75: Pourcentage de thorium dans le milieu extracellulaire en fonction du temps d'incubation des nanoparticules de Th (Th 24,0 ± 1,0 µg en masse) avec les cellules RAW 264.7.

Annexe IX : Evaluation de la cytotoxicité au moyen d'un test à la résazurine

1. Principe du test

Cette méthode est basée sur la conversion du composé appelé bleu d'alamar (résazurine) en résorufine par les cellules vivantes. Lorsqu'elle est ajoutée aux cellules, la résazurine passe librement à travers la membrane cellulaire pour pénétrer dans la cellule, où elle modifiée par l'environnement réducteur des cellules viables et transformée en résorufine de couleur rose (Figure 76). Les cellules mortes ne peuvent pas réduire la résazurine en raison d'une perte d'activité métabolique. Les changements de viabilité peuvent être facilement détectés à l'aide d'un lecteur de plaques basé sur l'absorbance ou la fluorescence. L'absorbance est mesurée à 570 nm (forme réduite « rose) et à 600 nm (forme oxydée « bleue »).

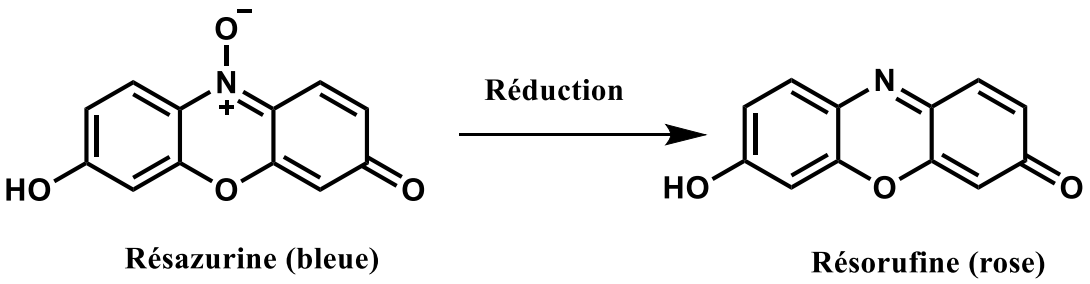


Figure 76 : Schéma de la réduction de la résazurine en résorufine

2. Optimisation

La mise en place de ce test nécessite quelques étapes d'optimisation . Il faut s'assurer qu'il n'y ait pas de réactivité croisée avec les composés à tester en l'absence de cellules. En l'absence de cellules , en présence de nos molécules chélatantes, la réduction de la résazurine est nulle (< 1 %, mesurée par UV). Un temps optimal d'incubation doit être déterminé en fonction du nombre des cellules initial afin de rester dans la gamme de linéarité du test et d'éviter de se trouver dans des conditions limites : une réduction de la résorufine en dihydroresorufine. Ainsi pour chaque test, la gamme linéaire du pourcentage de réduction de la résazurine en fonction du temps d'incubation a été déterminée. L'aspect visuel d'une gamme linéaire est présenté en Figure 77. Les différentes gammes utilisées sont disponibles en Figure 78

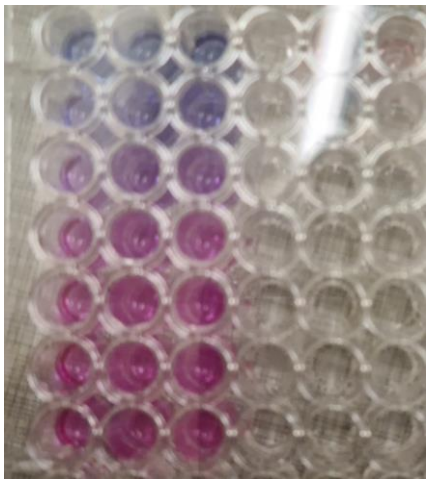
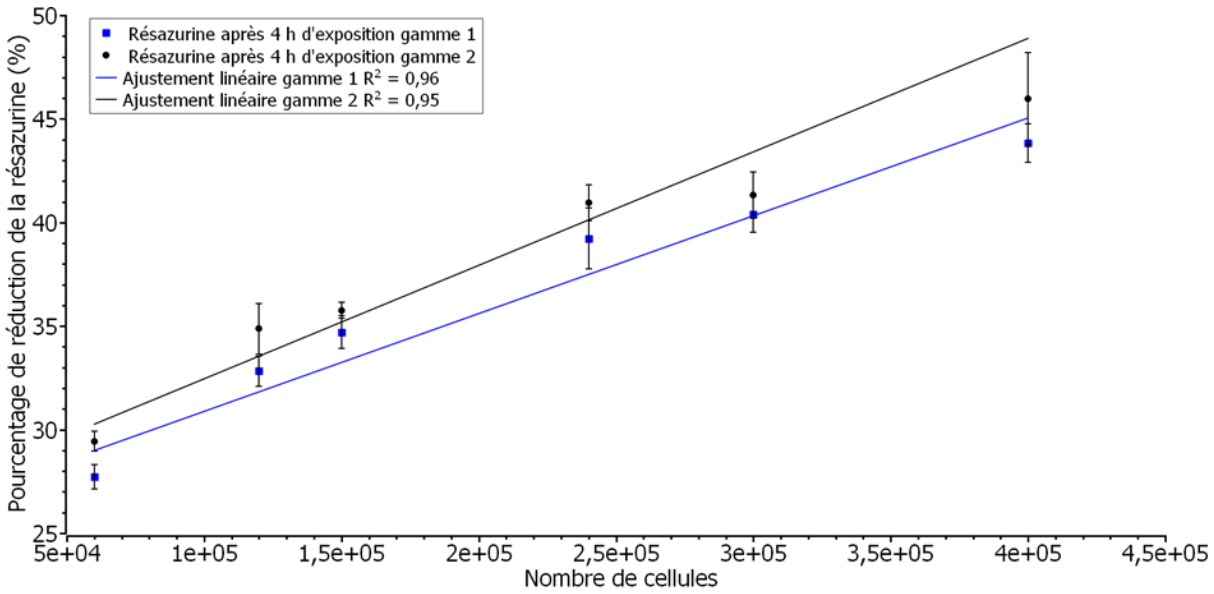
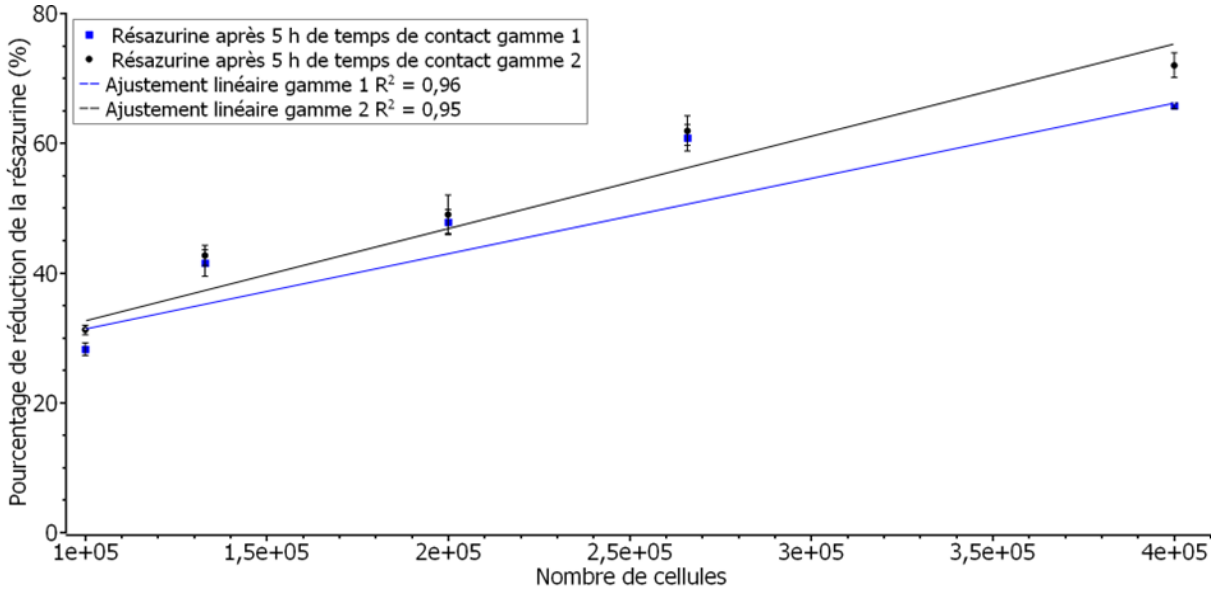


Figure 77 : Aspect visuel d'une gamme à la résazurine pour un nombre croissant de cellules.

a)



b)



c)

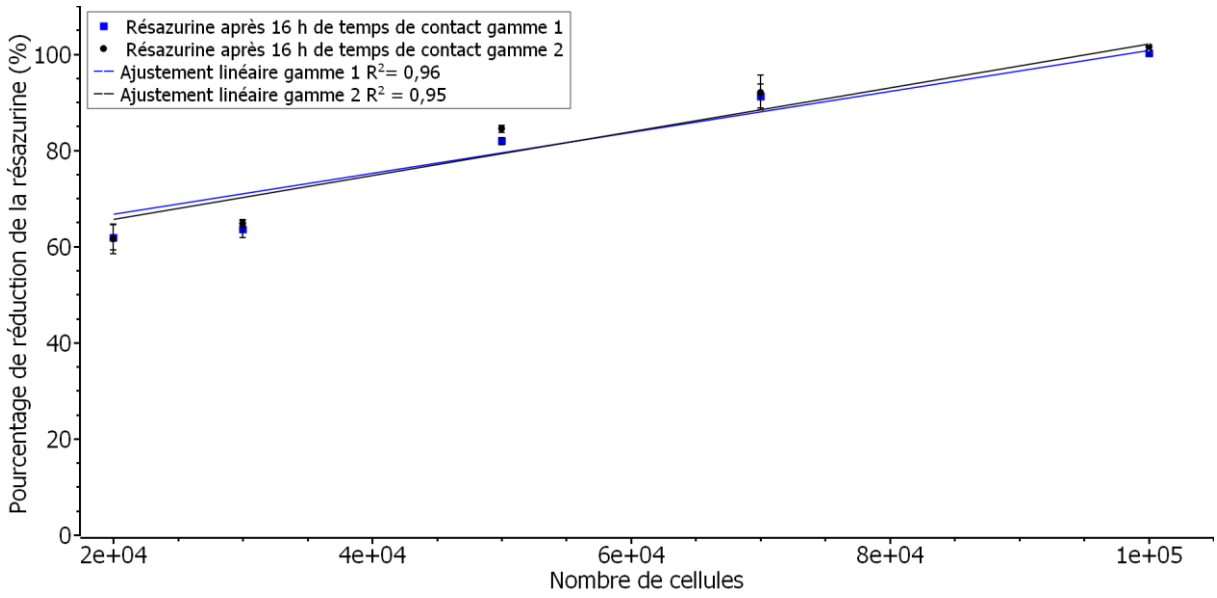


Figure 78 : Pourcentage de réduction de la résazurine en fonction du nombre de cellules et du temps. a) 4 h, b) 5 h, c) 16 h.

3. Cytotoxicité de la solution de résazurine

La cytotoxicité de la solution de résazurine a été évaluée pour un temps de contact avec les cellules RAW 264.7 allant jusqu'à 28 h. La solution mère de résazurine a été préparée en dissolvant 4,5 mg de résazurine (certified by the Biological Stain Commission, Sigma-Aldrich) dans un volume de 30 mL de PBS. Durant notre étude la résazurine a été utilisée à une concentration de 0,11 mM en diluant 10 mL de solution mère de résazurine ([Résazurine] = 0,6 mM) dans 40 mL de RPMI 1640.

Brièvement, 24 h avant l'expérience les RAW 264.7 sont ensemencées dans des plaques 24 puits (polystyrène, fond plat, Sigma-Aldrich) à 28 000 cellules par puits, dans un volume de 500 µL. Après 24 h les cellules sont alors rincées avec une solution de PBS (2 x 500 µL), puis 500 µL de resazurine sont ajoutés. Après un temps de contact de 4 h 30, 5 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h et 28 h, la cytotoxicité est évaluée par comparaison avec l'absorbance moyenne des cellules exposées à la résazurine pour un temps plus faible (4 h).(Figure 79).

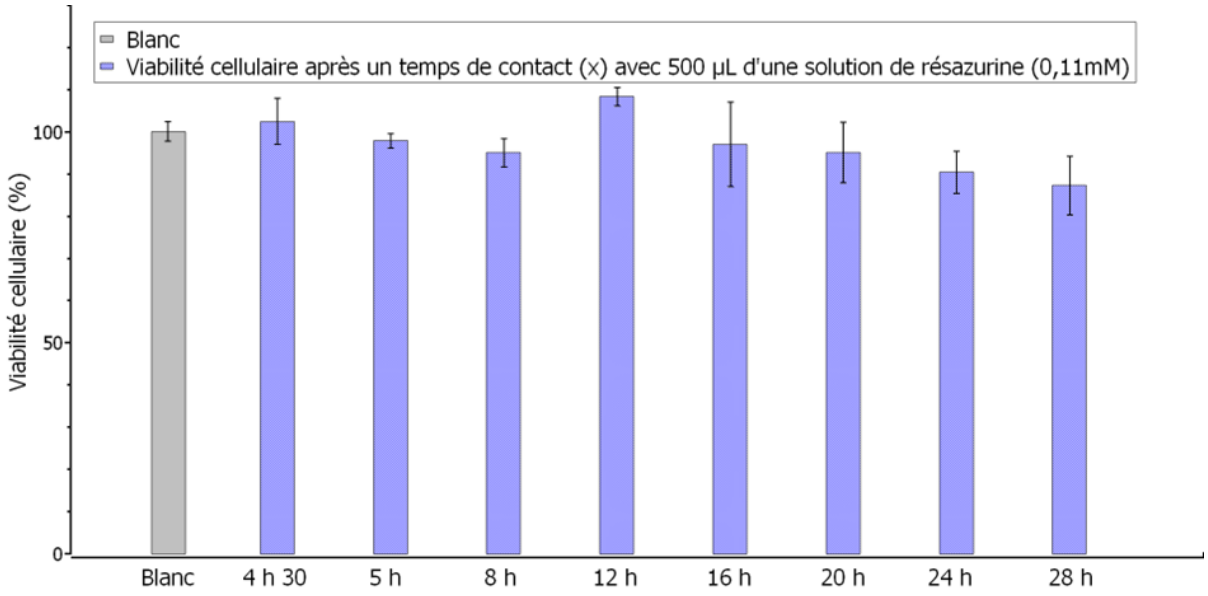


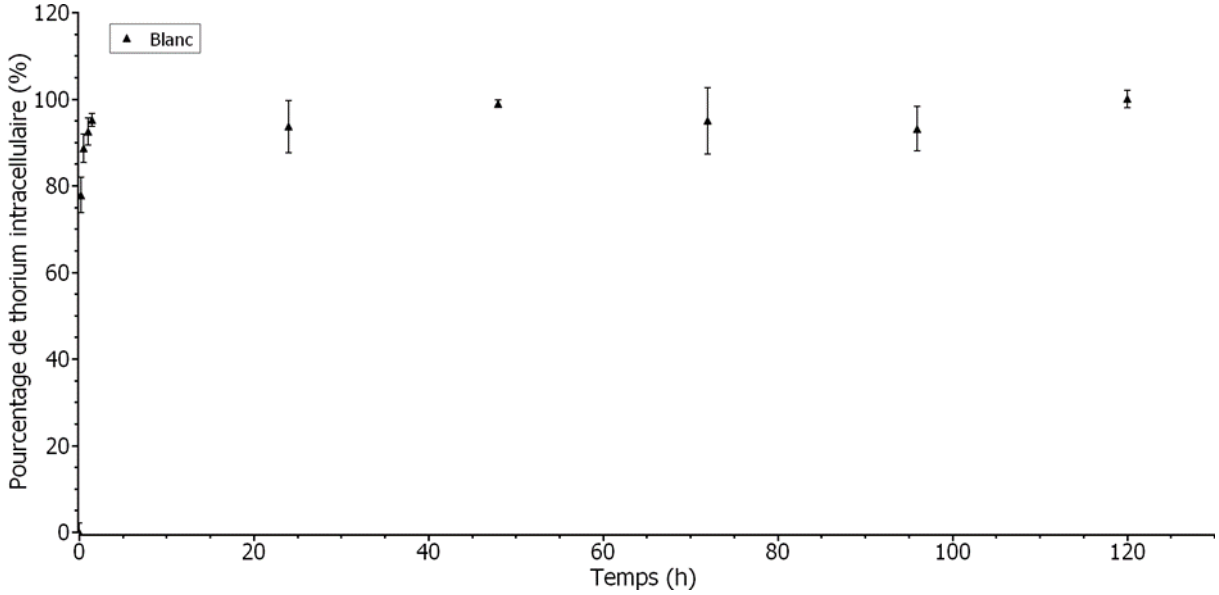
Figure 79 : Test de cytotoxicité sur les cellules RAW 264.7 pour une concentration de 0,11 mM en résazurine à différents temps.

Annexe X : Dosage du thorium intracellulaire lors des expériences per-internalisation et post-internalisation

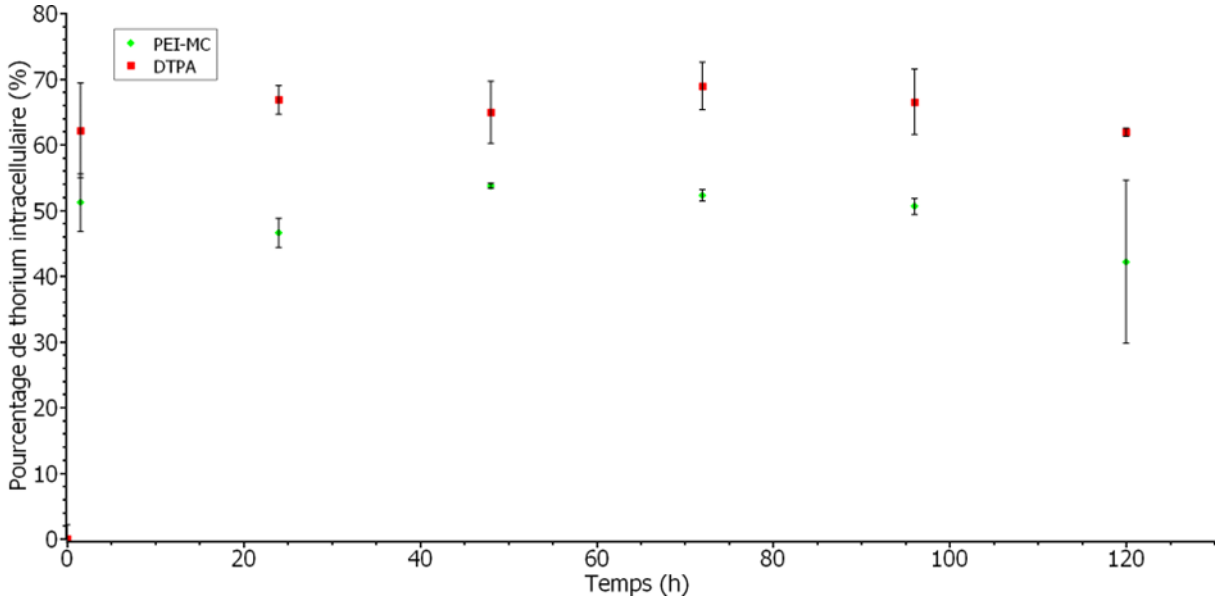
Pour chaque échantillon, les cellules sont minéralisées directement au sein de la plaque 24 puits par ajout de 1 mL d'une solution d'acide nitrique 30 % (la concentration de l'acide nitrique est volontairement diminuée pour éviter de « minéraliser » la plaque 24 puits). Cette solution est ensuite introduite dans un volume de 4 mL d'acide nitrique 67-70 % , puis chauffée à 120 °C pendant 2 h au DigiPrep. Les échantillons minéralisés sont ensuite évaporés à sec à 90 °C au DigiPrep. La concentration en thorium est déterminée par ICP-MS comme décrit en partie expérimentale, au moyen d'une calibration externe. Chaque point représente la moyenne de 2 expériences réalisées en 3 fois (± écart type). La Figure 80 représente le pourcentage de thorium intracellulaire dans le cas des expérience per-internalisation (ajout des chélates 30 minutes après contamination sans rinçage des NPs de Th) pour le blanc ainsi que les molécules chélatantes (PEI-MC, DTPA, PEI-MP et DTPMP) à différents temps. La Figure 81 présente le pourcentage de thorium « extracellulaire » dans le cadre de l'expérience « post-internalisation » (ajout des chélates après internalisation des NPs de Th) pour le blanc ainsi que les molécules carboxylates (PEI-MC et DTPA) à différents temps. Enfin la Figure 82 présente l'évolution du pourcentage de thorium intracellulaire en fonction du temps dans le cadre de l'expérience « post-internalisation » pour le blanc (sans chélates) ainsi que les quatre chélates.

1. Dosage du thorium intracellulaire pour l'expérience per-internalisation

a)



b)



c)

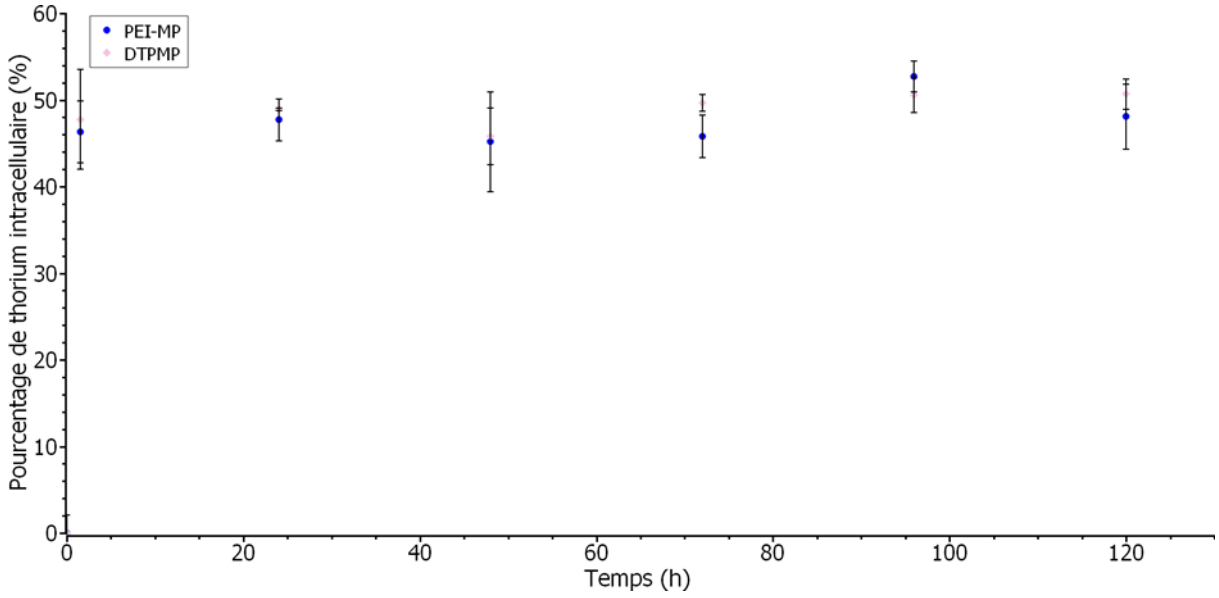


Figure 80 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium intracellulaire pour un traitement « per-internalisation » à des concentration de 5 mM en a) Blanc b) PEI-MC et DTPA ou c) PEI-MP et DTPMP jusqu'à j_5. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur 2 expériences indépendantes (n=3 par expériences).

2. Expérience « post-internalisation » étude sur les temps supérieurs à 1 jour pour le PEI-MC et le DTPA.

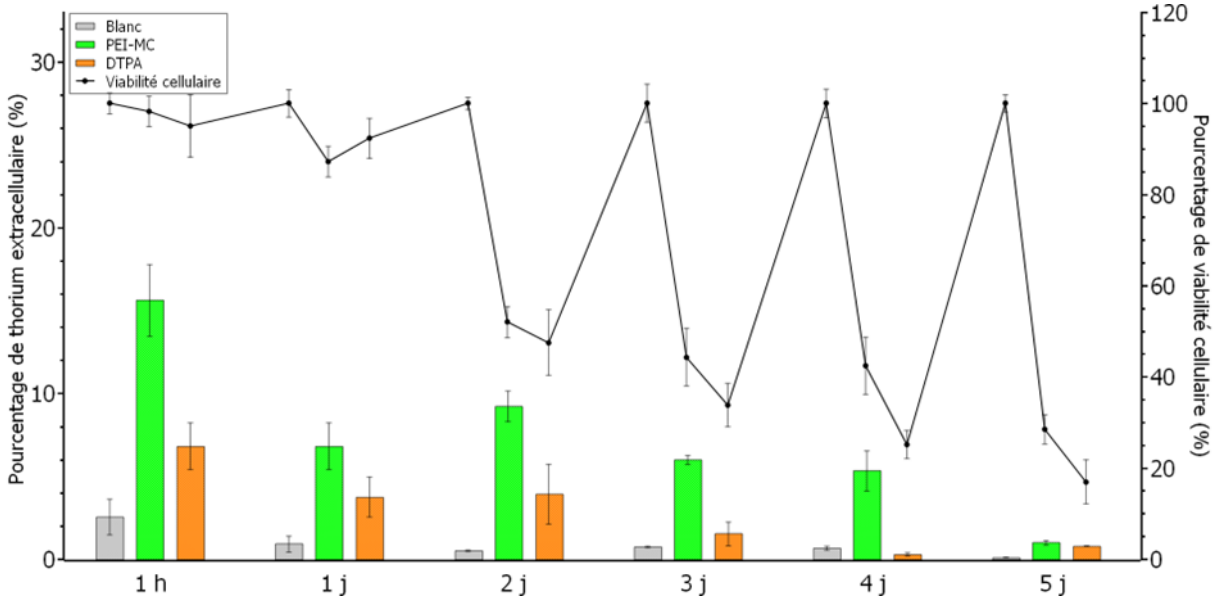
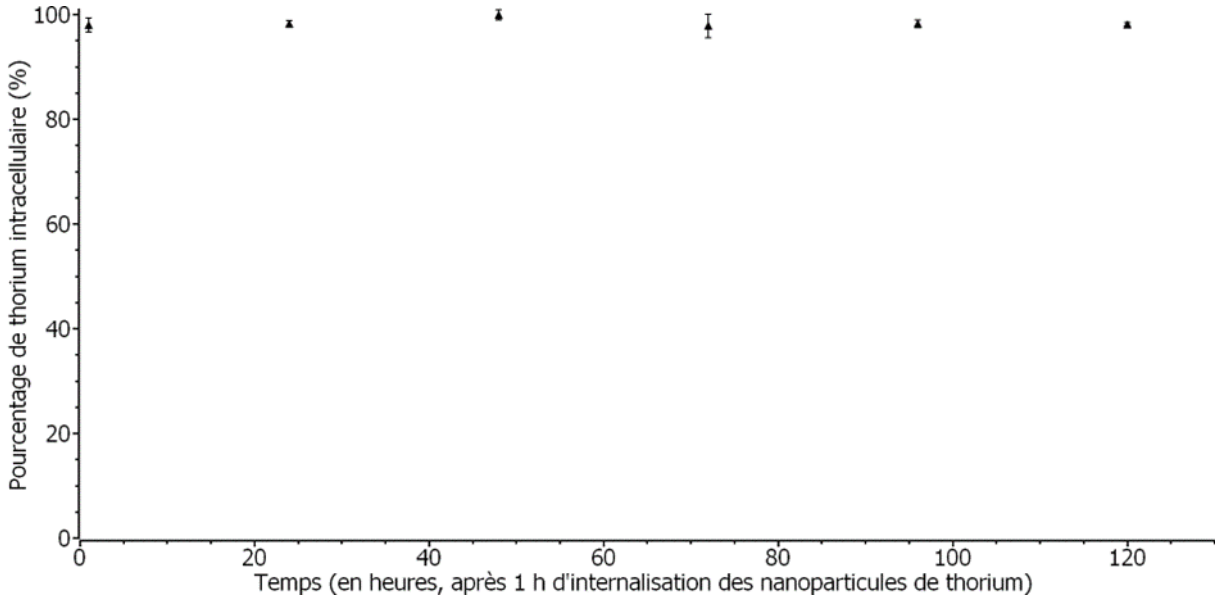


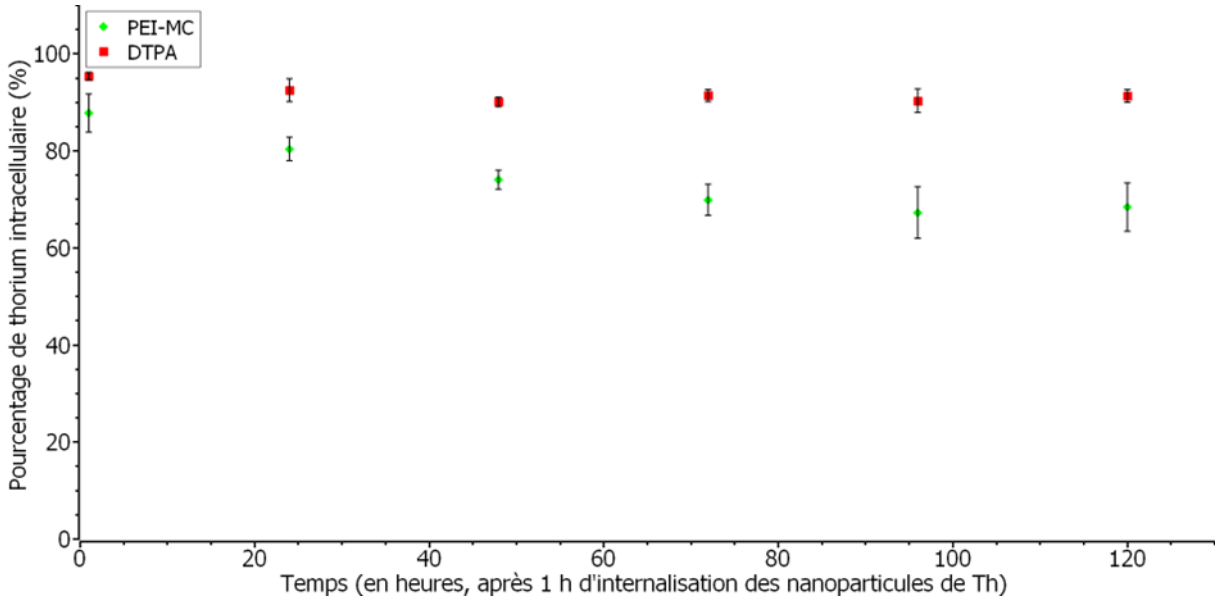
Figure 81 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium extracellulaire ainsi que le pourcentage moyen de viabilité cellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en PEI-MC et DTPA jusqu'à j_5. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur 2 expériences indépendantes (n=3 par expériences).

3. Dosage du thorium intracellulaire pour l'expérience post-internalisation

a)



b)



c)

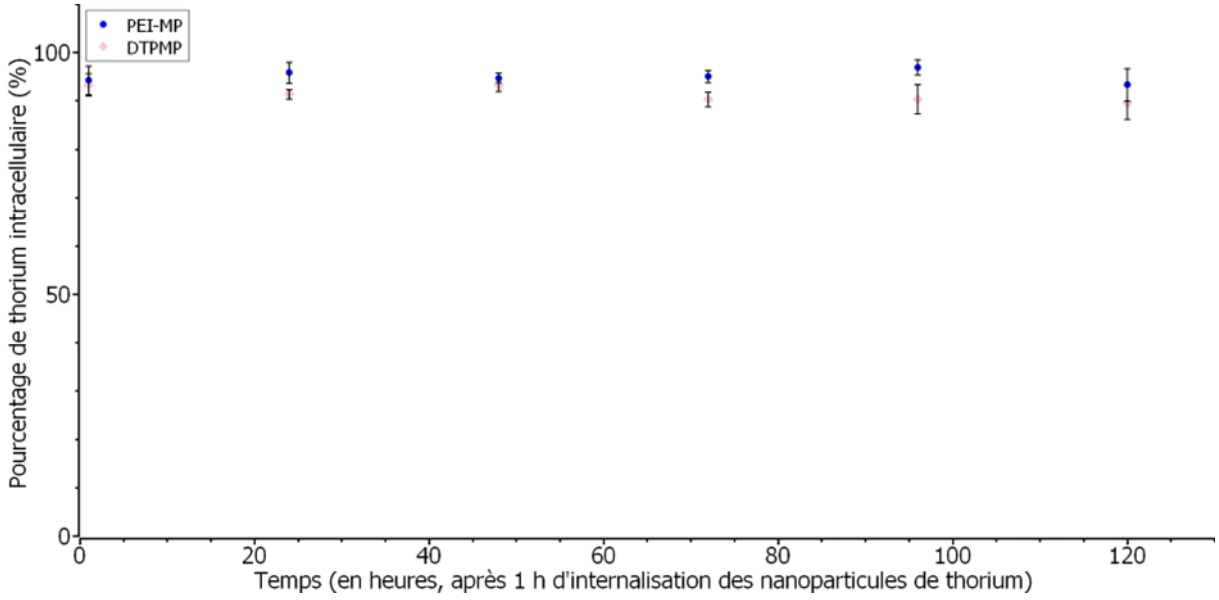


Figure 82 : Graphique représentant le pourcentage moyen de thorium intracellulaire pour un traitement « post-internalisation » à des concentration de 5 mM en a) Blanc b) PEI-MC et DTPA ou c) PEI-MP et DTPMP jusqu'à j_5. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur 2 expériences indépendantes (n=3 par expériences).