



**HAL**  
open science

# Quantification des espèces radicalaires produites en présence de nanoparticules d'or soumises à un rayonnement ionisant

Manon Gilles

► **To cite this version:**

Manon Gilles. Quantification des espèces radicalaires produites en présence de nanoparticules d'or soumises à un rayonnement ionisant. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112120 . tel-01249599

**HAL Id: tel-01249599**

**<https://theses.hal.science/tel-01249599>**

Submitted on 4 Jan 2016

**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 PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :  
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire de Chimie Physique

## THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

**Manon GILLES**

Quantification des espèces radicalaires produites en présence  
de nanoparticules d'or soumises à un rayonnement ionisant

**Date de soutenance : 06/07/2015**

**Composition du jury :**

Rapporteurs :

Hélène ELLEAUME  
Michel FROMM

Directeur de Recherche (Grenoble)  
Professeur (Besançon)

Examineurs :

Benoît GERVAIS  
Rachel MEALLET RENAULT  
Mehran MOSTAFAVI

Président du jury, Ingénieur CEA (Caen)  
Professeur (Orsay)

Directrice de thèse :

Cécile SICARD ROSELLI

Professeur (Orsay)  
Maître de Conférence (Orsay)



*A ma famille,*

*A mes amis*

*« Un véritable ami est un ami que l'on peut appeler à 3h du matin si l'on a un cadavre à enterrer... »*

*Guillaume Musso*



# Remerciements

---

*Me voilà arrivée à la toute dernière étape qui marque la clôture de ce travail : l'épreuve du feu, les remerciements ! Voilà donc pour moi l'occasion de remercier tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.*

***En tout premier lieu, je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du jury :***

*J'adresse mes plus sincères remerciements à Hélène Elleaume et à Michel Fromm pour avoir accepté les charges de rapporteurs de ce travail. Merci pour votre lecture attentive, pour le temps que vous y avez consacré et pour les discussions fructueuses que vous avez nourries.*

*Je tiens également à remercier Rachel Meallet-Renault qui a examiné ce travail et Benoît Gervais qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour la richesse que vous avez apportée aux discussions.*

*Enfin, un merci particulier à Mehran Mostafavi qui m'a accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour l'intérêt constant que vous avez porté à ce travail et pour le temps que vous avez consacré à nos nombreuses discussions. Un grand merci d'avoir apporté un regard nouveau à cette étude.*

***Les « Merci » incontournables :***

*« On ne se bat bien que pour les causes qu'on modèle soi-même et avec lesquelles on se brûle en s'identifiant. »*

*René Char - Fureur et Mystère (1948)*

*Merci à Cécile.*

*Cécile, c'est La Chef. Plus qu'une encadrante, tu m'as donné le goût de la recherche. Bien que j'aie récemment été promue « Mme Psychorigide », tu m'as donné l'envie de me lever chaque jour pour faire des manip et tu m'as appris que la phrase la plus excitante que l'on puisse entendre dans un labo est « mais c'est super beau ! ». Tu m'as permis de réaliser ma thèse dans les conditions idéales. Toujours pertinente, tu m'as chaque jour guidée et appris rigueur et persévérance. J'ai toujours été impressionnée par ta rigueur, ta pertinence, tes idées et ton ingéniosité. J'ai beaucoup appris durant ces trois années et je tiens à te dire que tu es une Chef exceptionnelle. Merci pour ta patience, ton sens critique, tes nombreux enseignements et pour la liberté essentielle que tu m'as laissée pour l'accomplissement de ce travail. Merci d'avoir été là et d'avoir toujours su me redonner la foi quand j'avais une baisse de régime, tu as chaque fois su me redonner la force d'avancer, d'y croire et d'aller toujours plus loin. Enfin, merci pour ton sens implacable des acronymes, la team TBS n'a qu'à bien se tenir (Très Belles S\*\*\*\*\*)!*

*Merci à Emilie.*

*Emilie c'est un peu trois femmes en une. Une chef, une collègue, une amie. Merci pour ta patience, ton attention, ton soutien permanent et ta disponibilité sans faille. Merci pour ton sens critique bien aiguisé et toujours pertinent. Merci pour les raids de pillages à Diamond, que ce soit pour du KCl, des cuves ou des tuyaux. Merci pour le temps que tu ne comptes pas, de très tôt le matin à très tard le soir, des petits dej' improvisés aux repas livrés soirs et weekends en passant par les Princes® au goûter, tu as fait du labo ma deuxième maison ! J'ai toujours admiré ta ténacité, ton altruisme, ta rigueur et tes ressources inépuisables. Tu m'as appris qu'il ne faut jamais renoncer et qu'il y a toujours une solution (même si quand à 3h du matin lorsqu'après de nombreuses tentatives infructueuse, lorsque l'on n'a plus d'idées, une de ces solutions est d'appeler La Chef)! J'espère que ce second volume de « la Bible » sera à la hauteur du premier. Merci pour tout !*

*Cécile, Emilie, vous m'avez beaucoup appris pendant ces trois belles années (trop courtes mais je reviendrai vous voir) et c'est grâce à vous, à votre accompagnement et à vos connaissances que j'en suis arrivée là aujourd'hui. Vous êtes et resterez des modèles. Vous allez me manquer... MERCI !*

*Merci à Stéphanie.*

*Voilà bien 10 ans maintenant que nous partageons le même bureau (j'exagère à peine mais c'est tout comme) ! Merci pour ta bonne humeur et ton aide quotidienne ! Merci pour les ragots et les enquêtes spéciales lorsque qu'il y a baleine sous gravillon dans le labo... Merci aussi pour les roulés au pesto, les petits croissants et surtout pour la méga blanquette de veau au labo : mémorable ! Merci pour ton temps, ta patience et pour ces nombreux moments partagés !*

***Je tiens également à remercier tous ceux qui ont participé de près, de loin ou même de très très loin à ce travail :***

*Merci à Philippe Maître qui a pris le relais à la direction du Laboratoire de Chimie Physique depuis janvier 2015.*

*Merci à Jacqueline Belloni. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance et mon plus grand respect. Merci pour le temps que vous m'avez alloué lors de discussions riches et enrichissantes. D'une connaissance et d'un recul incroyables, j'aurai énormément appris à vos côtés. Merci pour votre patience, votre gentillesse, votre disponibilité et vos nombreux enseignements.*

*Merci à Céline. Un merci un peu particulier pour toi. Bien que toute dernièrement arrivée, tu as toujours été là pour moi, tant scientifiquement qu'humainement. Un grand merci pour ton soutien dans les moments difficiles de cette fin de thèse. Au fait, est-ce que tu sais pourquoi il n'y a plus de mammoths ? – C'est parce qu'il n'y a plus de pappouths ! Un merci d'au moins cette taille-là ! Profite bien de ton séjour dans la team TBS, et toi aussi je reviendrai te voir !*



*Tu vois, finalement, j'ai réussi à caser une image de Manny le mammoth quelque part dans cette thèse !*

*Un grand Merci à Sophie, Delphine, Valérie, Pierre, Alexandre, Ariane, Anne-Lucie, Patricia. Merci pour votre temps, pour vos conseils et pour les nombreuses discussions scientifiques (ou pas..).*

*Merci à tous les stagiaires dont j'ai croisé la route : Matthieu (M. Faval est parti... à notre plus grand désespoir), Cuong (des nems, des nems !), Yoan (♪ Un jour mon prince viendra ♪), et les petits derniers Nathalie et Léo (Après le concours de cookies, on attend toujours le concours de gâteaux au chocolat...).*

*Une pensée également pour Dominique Favier, Valérie Decome Carré et Carole Bossard qui ont su lors de mon cursus me donner le goût de la chimie, des manips et de la recherche. C'est parce que j'ai eu la chance de croiser vos routes, que j'ai eu l'envie de suivre cette voie et de me battre pour avancer. Merci à chacun d'entre vous pour votre caractère passionné !*

**Les « Merci » du cœur :**

*« When I needed a place to hang my heart, you were there to wear it from the start, and with every breath of me, you'll be the only light I see »*

*Boyce Avenue – Every Breath*

*Une mention spéciale à Éric. Éric, compagnon de Just Dance®, de labo, de musique, de barbecue, de soirées, de Sly, d'Australiennes... Éric, ami dévoué, toujours présent. Éric, que j'ai embarqué dans mes plus grands délires, d'un costume de renard (What does the fox say ?) à des soirées que l'on n'oubliera jamais en passant par le remplissage d'une piscine à coup de seaux. Je pourrai développer ici plusieurs pages à ton sujet, te noyer de merci en tous genres mais je n'en ferai rien. Saches simplement que tu comptes. N'oublies pas : "Les folies que l'on regrette le plus sont celles que l'on n'a pas commises quand on en avait l'occasion..." (Helen Rowland). Simplement MERCI.*

*Citons à présent les amis de longues dates, 10 ou 11 ans plus tard... Marie, Clément, j'ai toujours cru en vous et vous avez été des soutiens indéfectibles dans les bons comme dans les mauvais moments. Autant l'un que l'autre, vous m'avez toujours encouragée et soutenue dans mes choix, vous avez été là et vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci d'avoir été et d'être toujours présents. Thibault, toujours loin des yeux mais toujours près du cœur, un aller-retour à l'autre bout du monde pour te retrouver en témoigne. Tu as toujours su me donner le sourire et m'as toujours donné le goût de la vie dans ses moindres détails aussi insignifiants puissent-ils paraître. Merci à vous trois !*

*Une pensée pour Aurélie, Dorothee et Tomas sans qui ces trois années auraient été bien différentes. Mention spéciale à Emmeline (Meiko), dixit les hommes c'est comme les crevettes...*

*Un merci particulier à ma petite famille : Marine, Gaëtan, Yoan, Manon. Merci pour les soirées Just Dance® et autres journées interfilleuls (Bonjour, bonjour,..., bonjour, bonjour, bonjour).*

*Pour finir, je dédie ce travail à ma famille. Aussi loin que le Sud soit de Paris, on ne devient pas Parisienne pour autant, toujours le cœur à la maison. Et même si une nanoparticule d'or ne signifie pas grand-chose de concret pour vous, cela n'empêche pas un soutien quotidien irremplaçable ! Un bol d'air à chaque 1000 km parcourus. Fièvre de faire partie de cette famille de Barjots !*

*Merci à tous !*





## Liste des Acronymes et des Abréviations

---

- ADN : Acide désoxyribonucléique  
ATR : *Attenuated total reflectance* (réflectance totale atténuée)
- C : Configuration circulaire d'un plasmide d'ADN  
CL : *Cross-link* (Associations covalentes de différentes configurations d'un plasmide d'ADN)  
CT : Forme concatémère
- DLS : *Dynamic Light Scattering* (diffusion dynamique de la lumière)  
DLVO : DeJarguin-Landau-Verwey-Oberbeek  
DSB : *Double Strand Break* (cassure double brin de l'ADN)
- EBE : Electron de basse énergie  
EF : *Enhancement factor* (facteur de radiosensibilisation)  
EI : Energie d'ionisation
- FTIR : *Fourier transformed infrared* (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)
- G : Rendement radiolytique
- HPLC : *High performance liquid chromatography* (chromatographie liquide haute performance)  
HSA : *Human serum albumin* (albumine de sérum humain)
- IBM : *International Business Machines corporation*  
INCa : Institut National du Cancer  
IMRT : *Intensity-modulated radiation therapy* (radiothérapie par modulation d'intensité)  
IRM : Imagerie par résonance magnétique
- L : Configuration linéaire d'un plasmide d'ADN  
LCP : Laboratoire de Chimie Physique  
LEM : *Local effect model* (modèle d'effet local)
- MET : Microscopie électronique à transmission
- NIST : *National Institute of Standards and Technology*  
NPo : Nanoparticules d'or
- PEG : Polyéthylène glycol
- SC : *Supercoiled* (configuration surenroulée d'un plasmide d'ADN)  
SSB : *Single Strand Break* (cassure simple brin de l'ADN)  
STM : *Scanning tunneling microscopy* (microscopie à effet tunnel)
- TEL : Transfert d'énergie linéique
- UV : Ultraviolet
- Z : Numéro atomique



# Sommaire

---

<b>LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>11</b>
<b>I. AVANT-PROPOS .....</b>	<b>17</b>
<b>II. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>21</b>
A. RADIOTHERAPIE.....	21
1. <i>Contexte actuel</i> .....	21
2. <i>Nanoparticules d'or comme radiosensibilisateurs</i> .....	23
a. Etude pionnière.....	23
b. Influence des caractéristiques des NPo : concentration, taille .....	24
c. Influence du rayonnement et de son énergie .....	25
d. Impact de la fonctionnalisation.....	27
3. <i>Autres utilisations potentielles des NPo</i> .....	28
B. NANOPARTICULES D'OR.....	31
1. <i>Propriétés optiques</i> .....	31
a. Diffusion de la lumière .....	31
b. Phénomène de résonance plasmonique.....	32
2. <i>Stabilité des solutions colloïdales : théorie DLVO</i> .....	34
3. <i>Chimie de surface</i> .....	35
4. <i>Synthèse (la méthode Turkevich)</i> .....	36
C. INTERACTION RAYONNEMENT-MATIERE .....	40
1. <i>Interaction photon-matière</i> .....	40
2. <i>Coefficients massiques d'absorption</i> .....	42
3. <i>Notions associées à la chimie sous rayonnement</i> .....	43
D. RADIOLYSE DE L'EAU .....	45
1. <i>Introduction</i> .....	45
2. <i>Mécanisme de la radiolyse de l'eau</i> .....	45
3. <i>Deux espèces de la radiolyse de l'eau</i> .....	47
a. Electron hydraté.....	47
b. Radical hydroxyle .....	48
4. <i>Capture des radicaux</i> .....	49
a. Notion de pouvoir de capture .....	49
b. Radiolyse de l'eau en présence de solutés.....	49

E.	DETECTION INDIRECTE DU RADICAL HYDROXYLE PAR LA COUMARINE.....	51
F.	CONCLUSIONS / ENJEUX / OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	54
<b>III.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>59</b>
A.	SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES D'OR NON FONCTIONNALISEES .....	59
1.	<i>Elaboration de nanoparticules d'or non fonctionnalisées</i> .....	59
2.	<i>Caractérisation du cœur d'or</i> .....	59
3.	<i>Caractérisation du recouvrement</i> .....	61
a.	Diffusion dynamique de la lumière .....	61
b.	FTIR .....	62
4.	<i>Caractérisation de la charge des nanoparticules d'or</i> .....	63
B.	CARACTERISATION DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISEES.....	65
1.	<i>Fonctionnalisation de nanoparticules d'or</i> .....	65
2.	<i>Caractérisation du recouvrement</i> .....	66
a.	Spectroscopie UV-visible.....	66
b.	Diffusion dynamique de la lumière .....	67
c.	FTIR .....	68
d.	Zétamétrie.....	69
3.	<i>Détermination de la concentration en nanoparticules d'or</i> .....	69
4.	<i>Discussion</i> .....	71
C.	OPTIMISATION DU DOSAGE DES RADICAUX HYDROXYLE EN PRESENCE DE NANOPARTICULES D'OR.....	75
1.	<i>Décroissance du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en présence de nanoparticules</i> ..	76
2.	<i>Rendements en hydroxycoumarines : régiosélectivité</i> .....	78
a.	Position du problème .....	78
b.	Interaction coumarine – NPo .....	84
3.	<i>Conversion du rendement de 7-hydroxycoumarine en rendement de radical hydroxyle</i> .....	87
4.	<i>Influence de la concentration en coumarine sur le rendement en 7-hydroxycoumarine</i> .....	90
5.	<i>Effet Čerenkov</i> .....	91
D.	QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX HYDROXYLE EN PRESENCE DE NANOPARTICULES D'OR.....	94
1.	<i>Production massive</i> .....	94
2.	<i>Impact de la quantité de dioxygène en solution</i> .....	94
3.	<i>Influence de la concentration en sel</i> .....	96
4.	<i>Influence du type de rayonnement (rayons <math>\gamma</math> versus rayons X)</i> .....	98
5.	<i>Impact de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or</i> .....	101
E.	QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION D'ELECTRONS EN PRESENCE DE NANOPARTICULES D'OR .....	109
1.	<i>Production massive</i> .....	110
2.	<i>Production d'espèces radicalaires en milieu salin (1,7mM NaCl)</i> .....	112
3.	<i>Influence du type de rayonnement (rayons <math>\gamma</math> versus rayons X)</i> .....	115
4.	<i>Influence de la fonctionnalisation</i> .....	116

F.	DISCUSSION, ASPECT MECANISTIQUE.....	122
1.	<i>Production massive</i> .....	123
2.	<i>Mécanisme de production</i> .....	126
G.	ADN .....	132
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>141</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>147</b>
A.	SYNTHESE DE NANOPARTICULES D'OR.....	147
1.	<i>Synthèse de nanoparticules (méthode Turkevitch)</i> .....	147
2.	<i>Fonctionnalisation des nanoparticules d'or</i> .....	147
a.	Fonctionnalisation par le PEG <sub>1000</sub> ou le PEG <sub>4000</sub> .....	147
b.	Fonctionnalisation par le HS-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub> ou le HS-PEG <sub>3500</sub> -COOH .....	148
c.	Fonctionnalisation par la HSA .....	148
B.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISEES .....	148
1.	<i>Caractérisation du cœur d'or</i> .....	148
a.	Microscopie électronique à transmission .....	148
b.	Spectroscopie d'absorption UV-Visible .....	149
2.	<i>Caractérisation de la fonctionnalisation</i> .....	149
a.	Diffusion dynamique de la lumière .....	149
b.	Spectroscopie Infrarouge .....	150
c.	Zétamétrie.....	150
3.	<i>Vérification de la concentration : Dosage de l'or</i> .....	150
C.	IRRADIATIONS EN SOLUTION .....	151
1.	<i>Irradiations X</i> .....	151
2.	<i>Irradiations Gamma</i> .....	152
3.	<i>Dosimétries</i> .....	152
a.	Dosimétrie de Fricke .....	152
b.	Dosimétrie Gafchromic® .....	153
D.	ADN .....	154
E.	QUANTIFICATION DE LA 7-HYDROXYCOUMARINE.....	155
1.	<i>Quantification du radical hydroxyle par la coumarine</i> .....	155
2.	<i>Extinction du signal de fluorescence en présence de NPo</i> .....	156
3.	<i>Effet Čerenkov</i> .....	156
4.	<i>HPLC</i> .....	157
F.	QUANTIFICATION DE LA QUANTITE DE DIOXYGENE EN SOLUTION .....	157
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>161</b>

**LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL**



---

# *Avant-propos*

---

*« Rien de grand ne s'est accompli dans le monde sans passion. »*

*Friedrich Hegel*

*Extrait d'Introduction à la philosophie de l'histoire*





# I. Avant-propos

---

La fin du 20<sup>e</sup> siècle a été marquée par l'avènement des nanotechnologies. Le début de cet engouement a souvent été daté au 29 décembre 1959, date du discours de Richard Feynman « *There is a plenty of room at the bottom* » lors de la réunion annuelle de la Société Américaine de Physique [Feynman, 1959]. Lors de ce discours, Feynman évoque l'infiniment petit comme un domaine de recherche jusqu'alors inexploré et laisse entrevoir des perspectives importantes concernant les capacités de stockage de l'information sur des surfaces de plus en plus petites. En 1981, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer mettent au point le premier microscope à effet tunnel (STM) au laboratoire IBM de Zurich, il est désormais possible de « voir » les atomes et les molécules [Binnig, 1986]. Cette invention vaudra à ses inventeurs le prix Nobel de physique en 1986. On peut alors travailler et observer la matière à une échelle nouvelle : le nanomètre, soit le milliardième de mètre. A cette échelle, les propriétés des matériaux changent et nécessitent de nouvelles approches scientifiques. Aujourd'hui, la compréhension des propriétés des matériaux à l'échelle atomique et des phénomènes mis en jeu reste un véritable enjeu pour les prochaines décennies et nécessite une synergie des disciplines. Ainsi, les nanotechnologies se placent à l'interface de la chimie, de la physique et concernent de nombreux domaines d'application de l'informatique à la biologie, en passant par l'électronique, la cosmétique ou encore la catalyse. Aussi, le secteur des nanotechnologies est en plein développement et les applications des nanoparticules de plus en plus étudiées [Chen, 2014; Stark, 2015].

Actuellement, le cancer est une problématique sociétale d'envergure. Cette pathologie particulièrement complexe et meurtrière regroupe un groupe de maladies toutes caractérisées par la multiplication et la propagation de cellules anormales. Si la progression de ces tumeurs malignes n'est pas stoppée, l'évolution de la maladie va mener plus ou moins rapidement au décès du malade. Avec 150 000 décès en France en 2012, le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans les pays développés [INCa, 2013]. Les nanotechnologies présentant un fort potentiel pour le traitement de cette pathologie, les nanoparticules et plus spécifiquement les nanoparticules d'or (NPo) sont particulièrement étudiées dans l'optique d'une thérapie. Par exemple, les NPo possèdent des propriétés de radiosensibilisation permettant d'augmenter les effets de la radiothérapie. C'est une stratégie de choix car malgré les nombreuses avancées dans ce domaine, notamment la radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT), la localisation de la dose et la minimisation des effets sur les tissus sains restent une problématique au centre des recherches. Par ailleurs, les NPo présentent l'avantage d'une chimie de surface riche leur permettant de s'imposer comme des nano-

transporteurs de médicaments, d'agents de contraste et d'agents d'internalisation cellulaire. Dans cette optique, les NPo pourraient agir tel un cheval de Troie en transportant des agents thérapeutiques spécifiquement vers les cellules tumorales et en constituant elles-mêmes des agents radiosensibilisateurs. L'application de l'effet radiosensibilisateur en clinique est prometteuse mais son optimisation nécessite une bonne connaissance du phénomène, de son origine et des paramètres qui le gouvernent. Généralement, il est admis que le mécanisme de radiosensibilisation par des NPo repose sur l'interaction entre nanoparticules et rayonnement ionisant, produisant de nombreuses espèces radicalaires. Cependant jusqu'à ce jour, les études réalisées sur plusieurs modèles biologiques (ADN, cellules, *in vivo*) n'ont pas permis de mettre en évidence le rôle et la quantité de chacune de ces espèces.

Ce travail de thèse résumé dans ce premier chapitre introductif, s'inscrit à l'interface de trois grandes thématiques : les NPo, l'interaction rayonnement-matière et la radiolyse. Ces trois sujets sont présentés dans le second chapitre de ce manuscrit. Un aperçu bibliographique visant à transcrire le large cadre de notre étude et ses objectifs est alors donné. Le troisième chapitre de ce manuscrit présente l'ensemble des résultats obtenus au sein de cette étude. En premier lieu, un protocole de « référence » permettant de quantifier les radicaux hydroxyle [Sicard-Roselli, 2014] et les électrons [Gilles, 2015] par mesure de l'oxydation de la coumarine a été développé en présence de NPo. Une attention toute particulière a été portée à l'optimisation de cette méthode de dosage. En second lieu, différentes conditions de production de ces radicaux ont été comparées : source (rayonnement X ou gamma), fonctionnalisation des NPo, milieu oxygéné ou non. Ces résultats ont alors permis de proposer un mécanisme rendant compte de la production des espèces radicalaires issues de l'interaction rayonnement-NPo. Une discussion de l'ensemble de ces résultats a alors fait émerger un nouveau mécanisme de production de radicaux en présence de NPo. Je me suis alors concentrée sur l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur l'effet radiosensibilisateur puisque l'application de ces nanos-objets en clinique ne peut être envisagée que s'ils sont fonctionnalisés. L'impact du recouvrement sur les productions radicalaires en présence de NPo soumises à un rayonnement X ayant préalablement été établi, la quantité de radicaux émis a été corrélée avec la capacité à dégrader une cible biologique, en l'occurrence l'ADN [Gilles, 2014]. Une telle comparaison vise à guider la conception des NPo les plus performantes pour la radiosensibilisation. Le chapitre IV est une conclusion de ce travail et présente ses perspectives. Enfin, le chapitre V est consacré aux descriptions des matériels et méthodes utilisés dans cette étude et le chapitre VI aux références bibliographiques.

Plusieurs publications ont été issues de ces travaux de thèse et sont présentées en annexe de ce manuscrit.

---

# *Introduction bibliographique*

---

*« Le progrès de la connaissance se résume peut-être en une meilleure  
compréhension de notre ignorance. »*

*Robert Mossé*

*Extrait de La Monnai*

<b>A. RADIOTHERAPIE.....</b>	<b>21</b>
<b>B. NANOPARTICULES D'OR.....</b>	<b>31</b>
<b>C. INTERACTION RAYONNEMENT-MATIERE .....</b>	<b>40</b>
<b>D. RADIOLYSE DE L'EAU.....</b>	<b>45</b>
<b>E. DETECTION INDIRECTE DU RADICAL HYDROXYLE PAR LA COUMARINE .....</b>	<b>51</b>
<b>F. CONCLUSIONS / ENJEUX / OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>54</b>



## II. Introduction bibliographique

---

Les nanoparticules métalliques sont à la base d'un réel engouement au sein des domaines de la chimie, de la physique, de la biologie et de la médecine étant données leurs propriétés optiques et catalytiques particulières [Bond, 2006; Daniel, 2003; Huang, 2007; Kelly, 2003; Viñes, 2014]. Sous rayonnement électromagnétique, elles ont la capacité de se comporter comme des sources nanométriques de chaleur grâce à une succession d'échanges énergétiques internes [Palpant, 2012]. L'étude d'Hainfeld en 2004 [Hainfeld, 2004] a créé l'avènement des travaux sur la radiosensibilisation par les NPo. Cependant depuis, et ce malgré l'abondance des travaux dans le domaine, le phénomène reste mal compris et les études cliniques sont rares. Comprendre l'effet radiosensibilisateur afin d'en optimiser les effets est donc une étape nécessaire dans le contexte actuel de la lutte contre le cancer.

### A. Radiothérapie

#### 1. Contexte actuel

En 2012, l'Institut National du Cancer (INCa) a estimé à 355 000 le nombre de nouveaux cas de cancer en France (200 000 hommes et 155 000 femmes). Environ 40% en décèderaient chaque année [INCa, 2013]. Ces chiffres représentent un accroissement du nombre de nouveaux cas de près de 110 % entre 1980 et 2012. Lancé le 4 février 2014, le troisième Plan Cancer vise à améliorer la condition des malades et à développer la recherche en France. Il est notamment axé sur la prévention et le dépistage de la maladie. Le cancer est donc une problématique au centre des préoccupations sociétales actuelles.

Il existe trois grands types de traitements qui dépendent du patient en raison des différents types cellulaires et du stade auquel intervient le diagnostic : la chirurgie (ablation chirurgicale de la tumeur et de ses extensions), la radiothérapie (traitement par rayonnement) et les traitements médicaux (chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie...). Plus de la moitié des patients diagnostiqués sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin. C'est un traitement phare en oncologie, souvent associé à d'autres tels que la chirurgie ou la chimiothérapie dans une approche de thérapies combinées. On distingue deux types majeurs de radiothérapies : la curiethérapie et la radiothérapie externe. La curiethérapie consiste à irradier la tumeur via une source radioactive directement implantée en son sein. Dans le cas de la radiothérapie externe, la tumeur du patient est irradiée avec des rayons émis par un accélérateur de particules situé à proximité du patient. Le rayonnement traverse alors la peau, les tissus et parfois même certains

organes pour atteindre la tumeur. La difficulté majeure de cette technique est donc la délivrance de la dose uniquement à la tumeur. En effet, le rayonnement ne distingue pas la tumeur des cellules saines. Tout le compromis réside dans l'application d'une dose suffisamment forte pour détruire les cellules cancéreuses et suffisamment faible pour permettre aux cellules saines touchées de se régénérer sans induire trop de dommages. Depuis presque 60 ans maintenant, des efforts parallèles sont déployés pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie et la tolérance à ce traitement. D'une part, les avancées technologiques permettent un ajustement spatial et temporel de la dose appliquée à la tumeur de plus en plus précis au cours du traitement (IMRT, Cyberknife®) [Dieterich, 2011; Levivier, 2011]. D'autre part, le fractionnement de la dose permet aux cellules saines d'être réparées entre deux séances d'irradiation et ainsi de limiter les dommages aux tissus sains. Les rayonnements les plus utilisés en radiothérapie externe sont les photons et les électrons qui sont produits par des accélérateurs linéaires de particules (LINAC). Les protons et ions carbone sont également utilisés mais toujours en cours de développement avec seulement deux centres en France [Lundkvist, 2005]. Cependant, malgré ces nombreuses avancées, la localisation de la dose et son augmentation spécifique au sein de la tumeur restent une thématique de recherche au centre des intérêts.

Une des stratégies pour augmenter la dose de manière spécifique consiste à développer des radiosensibilisateurs. Ce sont des matériaux, éléments ou molécules, qui visent à augmenter la dose localement sous l'effet du rayonnement. Dans cette optique, l'utilisation d'éléments possédant un numéro atomique élevé est connue depuis longtemps [Spiers, 1949]. Son principe repose sur l'interaction photon-matière qui, pour des éléments possédant un numéro atomique élevé, aboutit à la libération localisée de « produits » issus de l'effet photoélectrique ou Compton comprenant : photons caractéristiques, photoélectrons et cascades d'électrons Auger [Khan, 2014]. D'autres travaux ont également fait émerger l'utilisation de radiosensibilisateurs tels que des pyrimidines halogénées, des iododésoxyuridines [Nath, 1990; Rousseau, 2009], des bromodésoxyuridines et du platine [Pignol, 2003]. Le développement de ces complexes métalliques a alors eu un très fort impact sur la chimiothérapie et son développement. Cependant, l'utilisation de ces agents chimiothérapeutiques est limitée à un certain nombre de cancers et leur utilisation entraîne des effets secondaires importants. Au cours de ces dix dernières années, la recherche s'est donc concentrée sur la synthèse de nouveaux complexes contenant des atomes lourds différents du platine comme le fer, le cobalt, l'argent, le ruthénium, le titane, le cuivre ou encore l'or [Ceresa, 2014; Komeda, 2012]. Ces derniers sont actuellement utilisés dans des essais cliniques en phase I et phase II.

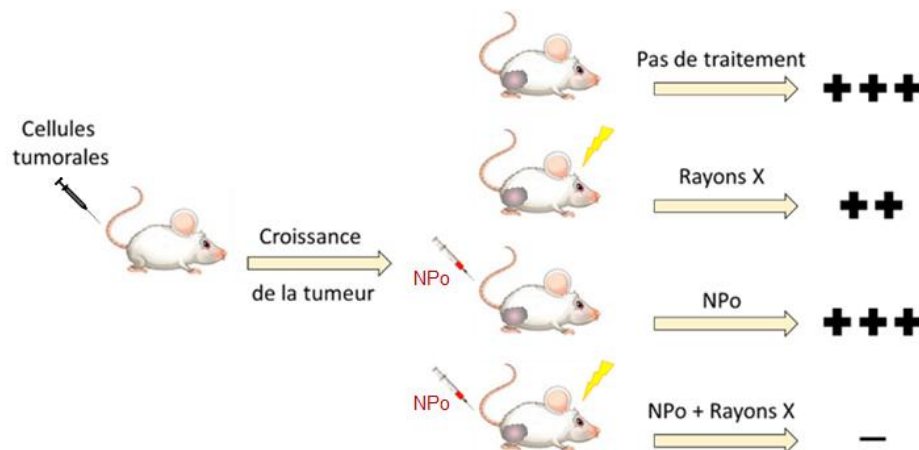
Avec l'avènement des nanotechnologies et des nanoparticules comme plateformes multifonctionnelles, de nouvelles voies de recherche ont vu le jour en vue d'applications thérapeutiques. Ces dernières années, les NPo ont été largement étudiées pour la radiosensibilisation en raison du numéro atomique élevé de l'or, de sa biocompatibilité générale [Alkilany, 2010; Carrière, 2012; Khlebtsov, 2011], d'une chimie de surface bien

adaptée pour la fonctionnalisation [Daniel, 2003] et donc, entre autres, pour la conjugaison à des fonctions de ciblage de la tumeur [Chattopadhyay, 2010; Conde, 2014; Giljohann, 2010].

## 2. Nanoparticules d'or comme radiosensibilisateurs

### a. Etude pionnière

L'expérience pionnière réalisée par James Hainfeld en 2004 est schématisée **Figure II 1** [Hainfeld, 2004]. Des cellules tumorales mammaires injectées en sous-cutané à des souris ont été laissées en croissance pendant une semaine jusqu'à atteindre un volume tumoral de 50 à 90 mm<sup>3</sup>. Les souris ont alors été séparées en plusieurs lots. Un lot de souris a subi une irradiation aux rayons X qui représente le traitement de radiothérapie conventionnel. Un autre lot de souris a subi cette même irradiation précédée d'une injection intraveineuse de NPo de 1,9 nm de diamètre à une concentration de 1,35 g d'or par kg. Enfin, un lot a seulement reçu une injection de NPo et un dernier n'a pas été traité.



**Figure II 1 :** Représentation schématique du protocole utilisé par J. Hainfeld au cours de son étude réalisée sur des souris.

Après 30 jours, l'expérience a montré que le lot traité par radiothérapie seule a vu son volume tumoral multiplié par cinq alors qu'au sein du lot traité avec la combinaison du traitement NPo et rayons X, 90% des souris n'ont plus de tumeur visible. Suite à ces résultats, une deuxième expérience a été conduite avec une concentration en or supérieure: 2,7 g d'or par kg. Cette fois-ci la survie des animaux a été suivie pendant un an: alors que seulement 20% de survie a été rapportée pour le lot de souris ayant subi une radiothérapie, le traitement NPo + Rayons X conduit à 86% de survie. Aucune souris du lot non-traité ou traité avec les NPo seule n'a survécu. Par ailleurs, en dépit des doses massives d'or injectées, aucune influence des NPo seules



sur la mortalité des animaux n'a été reportée. Cet article constitue la première étude *in vivo* démontrant l'effectivité des NPo pour la radiosensibilisation.

Depuis, un grand nombre d'expériences a été conduit pour confirmer l'effet radiosensibilisateur et identifier les paramètres qui le gouvernent. Cet effet radiosensibilisateur des NPo a notamment été observé dans des conditions d'irradiation d'animaux, de cellules, ou de plasmides d'ADN [Babaei, 2014; Butterworth, 2013; Jeremic, 2013]. Il est difficile de comparer ces résultats en raison des paramètres qui diffèrent d'une étude à l'autre et du manque de précisions sur les protocoles mis en oeuvre. Conclure quant aux conditions optimales pour l'utilisation des NPo en radiothérapie est donc difficile. Cependant la plupart des études ont l'avantage de démontrer l'efficacité potentielle des NPo comme agents radiosensibilisateurs et les résultats expérimentaux révèlent l'influence d'un grand nombre de paramètres physico-chimiques et biologiques. En effet, cet effet est dépendant de nombreux facteurs concernant le rayonnement (énergie, type de source, débit de dose, dose) et les NPo (concentration, taille, forme, recouvrement) [Babaei, 2014].

Au sein des paragraphes suivants, nous allons donc tenter de mettre en lumière les différents paramètres influençant le phénomène de radiosensibilisation.

#### b. Influence des caractéristiques des NPo : concentration, taille

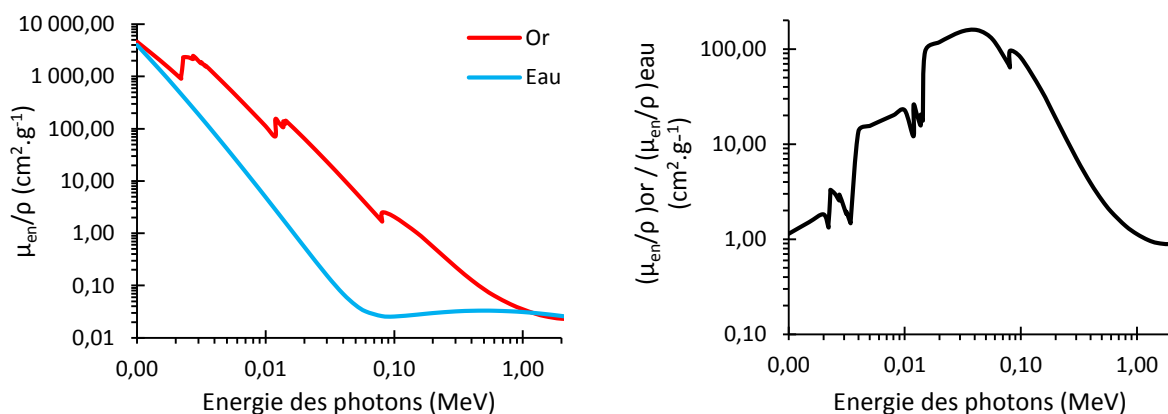
L'effet radiosensibilisateur est influencé par la forme de la nanoparticule, sa taille et la concentration en solution. Dans cette étude, nous nous intéressons exclusivement à des NPo sphériques. Aussi, nous ne décrivons ici que l'influence de la taille et de la concentration de ces NPo.

De manière attendue, *in vitro*, une augmentation de la concentration en NPo conduit à une augmentation du facteur de radiosensibilisation [Brun, 2009b; Rahman, 2009; Zheng, 2009]. Par ailleurs, Brun *et al.* [Brun, 2009b] ont utilisé des NPo de tailles comprises entre 8 et 92 nm sur un modèle de plasmide d'ADN pour explorer la dépendance en taille de l'effet radiosensibilisateur *in vitro*. L'étude montre que les plus grandes tailles sont les plus efficaces pour la radiosensibilisation. Lorsque le diamètre des NPo augmente entre 8 et 92 nm, le facteur de radiosensibilisation augmente quasi linéairement jusqu'à 3. Ces observations ont par la suite été corroborées par les simulations de Leung *et al.* [Leung, 2011] qui ont également avancé que l'effet radiosensibilisateur est plus efficace lorsque la taille des NPo augmente. De manière cohérente, le facteur taille influe aussi sur la capacité des NPo à produire des électrons secondaires et sur leurs énergies [Delorme, 2013; Jones, 2010].

*In cellulo*, le phénomène est plus complexe. En effet, dans ce cas, l'influence de la concentration et de la taille des NPo sont liées puisque l'internalisation des NPo au sein des cellules joue un rôle majeur. D'après certaines études, l'internalisation des NPo dans les cellules augmente l'impact du rayonnement [Chattopadhyay, 2013; Kong, 2008], ce qui serait alors cohérent avec les études *in vitro*. En effet, bien qu'aucune quantification de l'internalisation des NPo n'ait été réalisée, on peut penser que plus la concentration de NPo internalisées est grande, plus l'effet radiosensibilisateur sera fort. Comme la taille des NPo influence leur internalisation [Dykman, 2014; Tomić, 2014]. Taille, internalisation et concentration des NPo sont donc liées. Par ailleurs, augmenter la concentration en NPo au sein des cellules diminue leur capacité de croissance et augmente la toxicité des nano-objets [Carrière, 2012; Khlebtsov, 2011]. Il faut donc trouver un compromis afin de maximiser l'effet radiosensibilisateur tout en limitant la toxicité.

### c. Influence du rayonnement et de son énergie

Les NPo absorbent les rayons X. Pour rendre compte quantitativement de cette absorption, nous avons tracé sur la **Figure II 2** les coefficients d'absorption d'énergie massique de l'or (massif) et de l'eau ainsi que leur rapport en fonction de l'énergie du rayonnement incident.



**Figure II 2 :** Comparaison des coefficients d'absorption de l'or et de l'eau en fonction de l'énergie des photons.  $\mu_{en}/\rho$  donne une mesure de l'énergie déposée localement. Ces graphes sont issus des données du NIST : [NIST]

Ces coefficients quantifient l'énergie absorbée par un matériau ou un milieu. Leur rapport révèle une courbe en cloche avec un maximum d'absorption entre 40 et 50 keV. L'or absorbe donc jusqu'à 150 fois plus d'énergie par unité de masse que l'eau entre 0 et 1 MeV. Ce phénomène physique provoque une absorption supplémentaire due à l'or et doit conduire à une augmentation de la quantité d'énergie déposée dans une

solution d'or (massif) et donc de la dose (énergie absorbée par unité de masse). Sur la base de ces coefficients d'absorption d'énergie massique, de nombreuses modélisations ont été effectuées afin de mesurer le facteur d'augmentation de la dose dans la tumeur en présence de NPo [Cho, 2005; Cho, 2009; McMahon, 2008; Roeske, 2007]. Toutes ces études suggèrent que des concentrations en NPo de l'ordre de 0,1-1% en masse augmenteraient considérablement la dose locale lorsque ces dernières sont combinées à des rayons X d'énergie de l'ordre de la dizaine de keV. Ces études montrent également qu'il y aurait peu d'avantages à utiliser des photons d'énergie de l'ordre du MeV en raison de la faible différence d'absorption du rayonnement entre l'eau et l'or à ces énergies. De plus, la relation entre les distributions spatiales (trace) et énergétiques des électrons qui seraient émis des NPo suggère que des photons d'énergie de l'ordre du keV sont 2 à 3 ordres de grandeur plus efficaces pour générer des électrons secondaires que des photons d'énergies de l'ordre du MeV [Leung, 2011]. Dans la même optique, les simulations de Jones *et al.* ont montré pour des sources d'énergie de l'ordre du keV, que le flux d'électrons secondaires au sein de la tumeur est augmenté de près de deux ordres de grandeur en présence de NPo [Jones, 2010]. Par ailleurs, Lechtman *et al.* [Lechtman, 2011] ont, entre autres, modélisé l'impact de l'énergie du rayonnement sur le bilan énergétique de l'interaction rayonnement-NPo (énergie internalisée, émission de photoélectrons, émission d'électrons Auger, émission de rayons X secondaires). Ces auteurs ont alors proposé un scénario clinique potentiel au sein duquel l'effet radiosensibilisateur serait maximisé. Ils proposent l'utilisation de photons d'énergie inférieure au seuil K (80 keV) pour tirer parti des cascades d'électrons Auger extrêmement localisées associés à des NPo de petites tailles (plus efficaces pour produire les électrons Auger) situées au sein même de la tumeur. Ces premières simulations s'accordent donc à décrire l'effet radiosensibilisateur via les coefficients d'absorption d'énergie massique mais ne reflètent pas les résultats expérimentaux.

L'effet radiosensibilisateur des NPo a été observé pour de nombreux types de sources et dans une large gamme énergétique allant de quelques keV jusqu'à la dizaine de MeV. Des études *in vitro* ont notamment mis en évidence un effet radiosensibilisateur dans une gamme énergétique de l'ordre du MeV avec de faibles concentrations en NPo (0,05% en masse) [Butterworth, 2013]. A ces énergies, aucun effet n'était attendu dans les modélisations précédentes car il n'existe qu'une différence négligeable entre l'absorption énergétique de masse de l'or comparativement à l'eau. De plus, il a été montré sur de l'ADN plasmidique que l'effet radiosensibilisateur ne varie pas comme escompté en fonction de l'énergie des rayons X incidents dans la gamme du keV [McMahon, 2011a]. En effet, cette étude a mis en évidence une variation en forme de M entre 11,8 et 80 keV avec un minimum local entre 35 et 40 keV alors que la théorie prévoit un maximum autour de 50 keV. Cette dépendance énergétique en forme de M a également été retrouvée *in cellulo* bien que décalée en énergie, en effet dans cette étude un minimum est observé aux alentours de 50 keV [Rahman, 2014].

L'ensemble de ces résultats suggère que les coefficients d'absorption d'énergie massique ne sont pas adéquats pour décrire l'effet radiosensibilisateur des NPo.

Afin d'expliquer ces dépendances en énergie non prévues, McMahon *et al.* [McMahon, 2011b] ont modélisé les dépôts d'énergie à l'échelle nanométrique dans le voisinage de nanoparticules isolées au lieu de calculer une dose moyenne déposée dans tout le volume. Les auteurs ont alors simulé de fortes inhomogénéités de doses à l'échelle nanométrique lorsque les NPo sont soumises à des irradiations d'énergie de l'ordre du MeV, en utilisant un modèle d'effet local (LEM : Local Effect Model). Ce modèle considère que la dose locale à quelques nanomètres des NPo peut être très forte. Un facteur d'augmentation de la dose notable a alors été mis en évidence, en accord avec des résultats expérimentaux [Butterworth, 2013].

De ces études, nous pouvons conclure que les coefficients d'absorption d'énergie ne sont pas en mesure de rendre compte de l'augmentation de la dose et de l'effet radiosensibilisateur. D'autres phénomènes doivent être considérés pour rendre compte de tels effets.

#### d. Impact de la fonctionnalisation

Il existe différents types de fonctionnalisations intéressantes afin de conférer des propriétés particulières aux NPo en termes de furtivité, d'adressage et de vectorisation. Des anticorps, des hormones, des principes actifs, de l'ADN, des lipides, des glucides, des peptides ou encore des fragments organiques peuvent être liés aux NPo. Lorsque les chimistes conçoivent des NPo pour des applications biomédicales, un de leurs buts est d'augmenter leur furtivité c'est-à-dire d'éviter que les NPo soient reconnues comme des agents pathogènes. Parmi les ligands communément utilisés pour cela, le polyéthylène glycol (PEG) est l'un des plus rencontrés [Jokerst, 2011; Kolate, 2014; Muddineti, 2015]. En effet, il peut augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans le sang de plus d'une quinzaine d'heures [Owens, 2006; Prencipe, 2009] en limitant l'absorption des NPo par le système réticulo-endothélial [Tiwari, 2011] et donc l'identification des NPo comme agents pathogènes. De plus, compte tenu de la force de la liaison entre le soufre et l'or, les PEG thiolés sont souvent utilisés comme ligands d'ancrage stratégiques. Par ailleurs, il est bien documenté au sein de la littérature que lorsqu'une nanoparticule est introduite dans un fluide biologique, une couronne de protéines se forme rapidement quelle que soit la fonctionnalisation des NPo [Brun, 2014; Lynch, 2008; Rahman, 2013]. Mais cette dernière apparaît comme un paramètre déterminant pour la formation et la composition de cette couronne protéique. En effet, chaque type de ligand interagit différemment avec les protéines du fluide en question. Par exemple, un recouvrement de type PEG permet de réduire la quantité de protéine adsorbée en

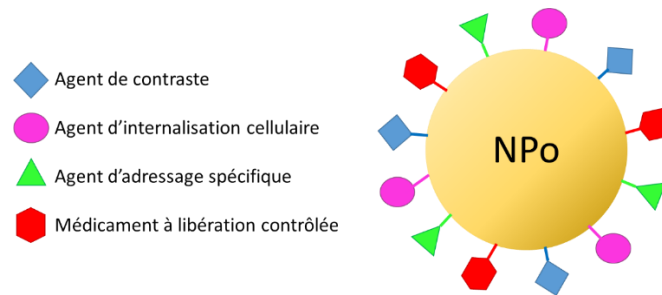
surface des NPo [Schäffler, 2013; Walkey, 2011] et cette quantité dépend également de la longueur des chaînes de PEG [Dobrovolskaia, 2009].

Les espèces radicalaires produites en présence de NPo pourraient être captées par les ligands qui les recouvrent. Ainsi, la fonctionnalisation pourrait avoir un impact sur l'effet radiosensibilisateur *in vitro*. Cependant, aucune étude systématique de l'influence de la fonctionnalisation n'a été reportée avant le début de cette thèse.

*In cellulo*, des effets radiosensibilisateurs ont été mis en évidence pour des NPo fonctionnalisées [Butterworth, 2010; Geng, 2011; Jain, 2011; Kong, 2008; Liu, 2010; Rahman, 2009; Roa, 2009; Zhang, 2009]. La fonctionnalisation peut jouer un rôle clef pour l'internalisation cellulaire et par conséquent avoir un impact sur le facteur de radiosensibilisation *in vivo*. A titre d'exemple, des NPo fonctionnalisées avec du glucose pénètrent mieux dans les cellules que les NPo non fonctionnalisées [Geng, 2011; Kaura, 2013; Roa, 2009; Wang, 2013; Zhang, 2008]. En effet, les cellules de carcinomes ont un métabolisme plus actif que celui des cellules normales, ce qui crée un besoin accru en glucose. Par conséquent, lorsque la surface des NPo est revêtue de glucose, les cellules tumorales internalisent le glucose et les NPo qui le transportent. Ceci peut expliquer les facteurs de radiosensibilisation plus grands reportés pour des NPo fonctionnalisées avec du glucose par rapport à des NPo non fonctionnalisées. Dans la continuité de ces travaux, une stratégie a récemment été développée par Hu *et al.* qui, afin de profiter de la consommation accrue de glucose par les cellules cancéreuses, ont fait jeûner les cellules avant irradiation en présence de NPo fonctionnalisées avec du glucose [Hu, 2015]. Les résultats montrent d'une part une meilleure efficacité des NPo recouvertes de glucose par rapport à des NPo non fonctionnalisées et d'autre part un meilleur effet radiosensibilisateur après 2h de jeûne. Ici encore, les résultats *in cellulo* sont plus difficiles à interpréter car ils résultent d'un ensemble de causes. En effet, la fonctionnalisation influence le taux d'internalisation cellulaire et par conséquent la concentration au sein de la cellule.

### 3. Autres utilisations potentielles des NPo

Outre leur utilisation en radiothérapie, les NPo présentent de nombreuses autres propriétés qui en font des candidats potentiels pour le traitement et le diagnostic du cancer. Les NPo présentent une chimie de surface très riche qui permet de les fonctionnaliser facilement via une liaison soufre ou amine. De plus en plus d'études se focalisent donc sur les NPo en tant que nano-transporteurs de médicaments, d'agents de contraste ou encore d'agents d'internalisation cellulaire : c'est le principe de la multi-fonctionnalisation (Figure II 3) [Ghosh, 2008; Jeremic, 2013; Lim, 2011].



**Figure II 3** : NPo utilisée comme nano-transporteur grâce à la multi-fonctionnalisation. La nanoparticule peut alors intervenir en tant qu'agent d'imagerie, de vectorisation et d'adressage spécifique. D'après [Sanvicens, 2008].

Dans l'idéal, les nano-transporteurs devraient permettre un adressage spécifique à la tumeur ainsi qu'une libération contrôlée du principe actif par exemple par photothermie [Guerrero, 2014] ou par variation locale de paramètres internes tel que le pH de la cible. Un autre avantage potentiel de ce nanotransport est que la molécule transportée peut présenter des caractéristiques différentes de la molécule libre et ainsi être plus stable et/ou moins toxique [Fleige, 2012]. Sa vectorisation par le nano-transporteur peut également modifier sa biodistribution *in vivo* [Khlebtsov, 2011].

Les NPo pourraient également être directement utilisées comme agents de contraste en Imagerie X et permettre ainsi de détecter les tumeurs, de suivre leur croissance et leur réponse au traitement [Cole, 2015; Hainfeld, 2014a; Kim, 2007; Popovtzer, 2008; Zeng, 2014]. Elles pourraient également être suivies par résonance magnétique (IRM) en étant fonctionnalisées par un agent de contraste comme le gadolinium. L'IRM présente l'avantage d'une très haute résolution 3D permettant l'étude de la plupart des tissus et organes. Cependant, c'est une technique peu sensible qui nécessite l'utilisation d'agents de contraste. Plusieurs études ont démontré que les NPo fonctionnalisées permettent d'obtenir un contraste spécifique pour la localisation de cellules tumorales en IRM [Alric, 2008; Debouttière, 2006].

Enfin, les NPo pourraient également être utilisées pour des traitements par hyperthermie [Chatterjee, 2011]. Il s'agit alors de détruire les cellules cancéreuses par l'action de la chaleur en exposant les tissus cancéreux à des températures supérieures à 41°C pendant une période de temps définie en irradiant les NPo par un faisceau lumineux, typiquement un laser. L'absorption de la lumière par les NPo produit alors un échauffement local [Link, 2000] causant ainsi des dommages irréversibles (coagulation des protéines, déstabilisation des lipides des membranes). Les cellules tumorales sont alors plus sensibles aux traitements complémentaires comme la chimiothérapie [Hainfeld, 2014b]. Pour ce type d'application, les NPo sphériques

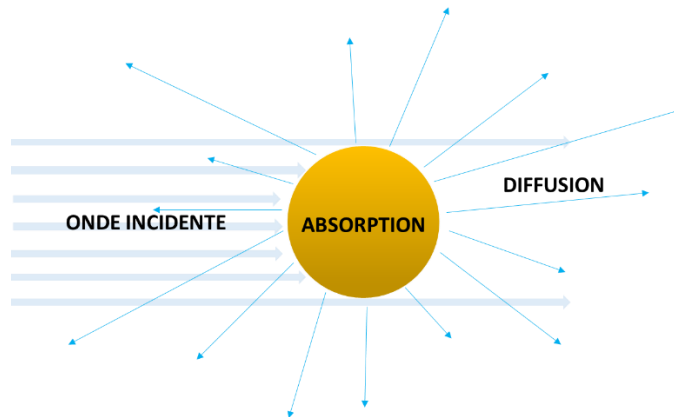
ne sont pas vouées à être développées car leur bande plasmon n'absorbe pas dans la fenêtre de transparence des tissus.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte d'amélioration de la radiothérapie par effet radiosensibilisateur des NPo. Dans cette partie, nous avons mis en relief les différents paramètres impactant l'effet radiosensibilisateur des NPo. Nous avons également fait état de quelques utilisations potentielles des NPo dans la thérapie du cancer. Toutes ces applications sont basées sur des propriétés particulières des NPo que nous nous attacherons à développer dans la partie suivante, propriétés optiques, chimie de surface, interaction avec un rayonnement ionisant.

## B. Nanoparticules d'or

### 1. Propriétés optiques

L'interaction de la lumière avec une solution colloïdale est à la base de phénomènes de diffusion et d'absorption (**Figure II 4**).



**Figure II 4:** Schématisation de l'absorption et de la diffusion d'une onde incidente par une NPo.

De ces phénomènes, de nombreux paramètres caractéristiques des NPo tels que leur taille, leur concentration ou encore leur état d'agrégation peuvent être extraits.

#### a. Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière est une propriété caractéristique des objets de taille inférieure au micromètre. Le phénomène de diffusion observé lorsque la longueur d'onde de la lumière est beaucoup plus grande que la taille de l'objet considéré est principalement dû à la diffusion Rayleigh. Il s'agit d'une diffusion dite élastique, c'est-à-dire que l'onde électromagnétique garde la même énergie au cours de la diffusion. Cette diffusion caractérise le mouvement brownien des objets, elle permet de les détecter et de les mesurer par diffusion dynamique de la lumière (DLS). En effet, les particules en suspension sont soumises à la mobilité brownienne et les interférences lumineuses qui en résultent contiennent des informations sur leur vitesse de mouvement. Cette vitesse est intrinsèquement liée à la taille des particules, les petites particules se déplaçant plus vite que les grosses. Cette technique d'analyse spectroscopique non destructive permet de mesurer le rayon hydrodynamique de nanoparticules en suspension dans un liquide, le rayon hydrodynamique mesuré étant le



rayon d'une sphère théorique incluant la nanoparticule, ainsi que ses sphères de fonctionnalisation et de solvatation. La mesure de l'intensité de la lumière diffusée par les particules au cours du temps fournit une valeur du rayon hydrodynamique d'après l'équation de Stokes-Einstein (**équation II 1**) :

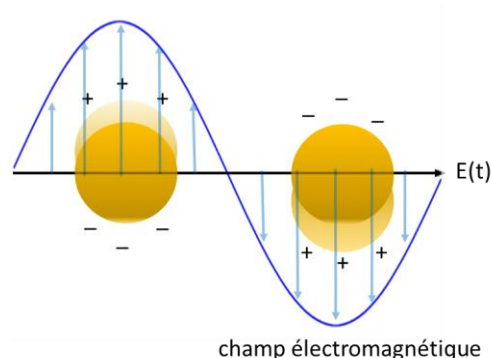
$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{équation II 1}$$

où  $k_B$  désigne la constante de Boltzmann en  $\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $T$  la température en K,  $\eta$  la viscosité du fluide en  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $D$  le coefficient de diffusion en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Outre les phénomènes de diffusion de la lumière, les phénomènes d'absorption permettent également de caractériser les NPo.

### b. Phénomène de résonance plasmonique

L'année 1968 marqua un tournant concernant les phénomènes de résonance plasmonique. En effet c'est au cours de cette année qu'Andreas Otto [Otto, 1968] et l'équipe de Raether [Kretschmann, 1968] mirent en évidence la possibilité d'exciter les ondes de surface (plasmons) en utilisant le phénomène de réflexion totale atténuée. Plus précisément, il s'agit de l'excitation du plasmon de surface à une interface métal/diélectrique par un champ optique évanescent créé lors de la réflexion interne totale d'une onde lumineuse. En effet, lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec une nanoparticule métallique, les électrons libres de la bande de conduction se mettent à osciller collectivement et en phase. Cela provoque une séparation des charges électriques et crée un moment dipolaire à la surface de la nanoparticule (**Figure II 5**). Ceci induit une forte augmentation du champ électrique au sein de la nanoparticule qui se traduit par l'apparition d'une bande dans le domaine du visible dite bande plasmon [Dahmen, 2007; Kawabata, 1966; Kelly, 2003]. En d'autres termes, quand les fréquences du champ électromagnétique incident et des oscillations entrent en résonance, c'est la résonance de plasmon de surface.



**Figure II 5** : Schématisation de la résonance de plasmon de surface.

Les nanoparticules d'or (comme d'autres nanoparticules métalliques telles que les nanoparticules d'argent ou de cuivre) ont la particularité d'absorber la lumière visible. Par exemple, une solution de NPo de 32 nm de diamètre apparaît rouge vin à l'œil. La théorie associée à ce phénomène avait d'ores et déjà été apportée par Mie en 1908 [Mie, 1908]. Elle est basée sur des calculs d'électromagnétisme et apporte une solution mathématique au problème de diffusion de la lumière par une sphère. Par la suite, elle a entre autres permis d'expliquer les dépendances de la forme et de la position de la bande plasmon avec la taille de la particule, la nature du métal, la concentration en particules, leur fonctionnalisation et la composition du milieu environnant. Ainsi, à chaque morphologie de nanoparticule correspond une fréquence de résonance propre et donc un mode d'oscillation des électrons de surface. De fait, plus la géométrie est complexe, plus il y a de fréquences de résonance qui composent la bande plasmon. Pour une nanoparticule sphérique (notre cas), il n'existe qu'un seul mode propre de résonance et donc qu'une seule fréquence de résonance associée. Pour une nanoparticule ellipsoïdale (typiquement un nanobâtonnet) il existe deux axes de symétrie et donc deux modes de résonance électronique, la bande plasmon est alors composée de deux bandes.

La longueur d'onde de résonance plasmonique dépend essentiellement des dimensions des NPo. Pour des nanoparticules sphériques, plus le diamètre de la nanoparticule est grand, plus la bande plasmon est déplacée vers les hautes longueurs d'onde [Brun, 2009a; He, 2005; Link, 1999a; Nath, 2004]. En effet, lorsque le diamètre de la particule augmente, la distance entre les charges (opposées) créées par le déplacement du nuage électronique augmente. Ainsi la force électrostatique de rappel diminue et la fréquence de résonance diminue. Donc la longueur d'onde d'absorption augmente. Cet effet de taille se limite à des diamètres de nanoparticules supérieurs à 2 – 3 nm. En effet, en deçà de cette valeur, la surface de la nanoparticule est trop petite pour qu'un effet de résonance plasmon soit observé [Ahmadi, 1997]. La largeur de la bande plasmon dépend quant à elle de l'homogénéité de taille, de forme et de l'état d'agrégation des NPo, elle reflète leur distribution en taille. Plus il existe de tailles différentes au sein d'un échantillon, plus il y aura de résonances différentes et donc autant de longueurs d'onde différentes engendrées. Plus l'échantillon est homogène, plus le plasmon correspondant est fin et par conséquent plus la solution est monodisperse. Ainsi la longueur d'onde d'absorption du plasmon nous permet d'évaluer la taille des nanoparticules et sa largeur d'apprécier la qualité de la distribution (homogénéité et dispersion en taille).

Le phénomène de résonance plasmonique dépend fortement des constantes diélectriques du métal et du milieu environnant. Par conséquent, la résonance de l'oscillateur est sensible à toute perturbation locale de l'environnement des nanoparticules, notamment à leur fonctionnalisation. En effet, le recouvrement modifie l'indice de réfraction des « nanoparticules » (NPo + recouvrement) et provoque un déplacement de la bande plasmon non prévisible et notamment dans le cas de NPo fonctionnalisées avec des ligands thiolés. En effet, les thiols interagissent fortement avec l'or [Hakkinen, 2012]. Ces ligands sont donc responsables d'un

champ de ligand très fort qui interagit avec le nuage électronique à la surface des nanoparticules. Ici la théorie de Mie n'est donc plus valable si le décalage induit par la fonctionnalisation n'est pas considéré dans le calcul.

Par ailleurs, comme précédemment évoqué, la bande plasmon est un indicateur de l'état d'agglomération des nanoparticules. En effet, l'apparition d'un épaulement dans la gamme des hautes longueurs d'onde témoigne de l'agrégation des NPo. Afin d'éviter ce phénomène, une stabilisation des nanoparticules est nécessaire en solution.

## 2. Stabilité des solutions colloïdales : théorie DLVO

Dans ce paragraphe, nous ne nous attacherons pas aux détails de la théorie DLVO (Dejarguin-Landau-Verwey-Oberbeek) mais seulement à une description qualitative qui nous permettra de mettre en évidence le comportement des NPo dans des solutions de différentes forces ioniques. La théorie DLVO permet de calculer l'énergie totale d'interaction entre particules et s'appuie sur deux hypothèses majeures. La première consiste à ne considérer que les forces d'attraction de Van der Waals<sup>1</sup> et les forces répulsives électrostatiques dans le calcul. La deuxième suppose que les forces électrostatiques de Van der Waals sont additives. La théorie DLVO permet d'expliquer la stabilité des solutions colloïdales par une répulsion électrostatique supérieure aux forces attractives de Van der Waals [Israelachvili, 1992]. Les NPo non stabilisées en solution ont tendance à s'agglomérer, à s'agréger à cause de l'interaction dipôle – dipôle qui est prédominante à cette échelle. En pratique, les NPo doivent être stabilisées soit par répulsion électrostatique (charge), soit par répulsion stérique (fonctionnalisation). Cette dernière consiste à tenir les particules éloignées les unes des autres en greffant ou en adsorbant des ligands à la surface des NPo. Cette stabilisation n'est efficace que si l'épaisseur du recouvrement est supérieure à la portée de l'interaction dipôle-dipôle de Van Der Waals. Les NPo non fonctionnalisées synthétisées dans cette étude sont chargées négativement et ce sont des répulsions électrostatiques qui assurent donc leur stabilité en solution pendant plusieurs mois. D'autre part, la présence d'ions en solution apporte de nouvelles interactions électriques. Ainsi, l'augmentation de la force ionique du milieu déstabilise les NPo et provoque leur floculation pour des concentrations élevées en sel<sup>2</sup>. Par conséquent, au sein d'un milieu à grande force ionique comme, par exemple le milieu de culture cellulaire (110 mM NaCl), il est absolument nécessaire de stabiliser les NPo en les fonctionnalisant. Il est donc primordial pour fonctionnaliser les NPo de s'intéresser à leur chimie de surface.

---

<sup>1</sup> Les forces de Van der Waals sont des interactions électrostatiques attractives à courte distance entre atomes et/ou molécules. Elles ont lieu entre deux dipôles (induits ou permanents).

<sup>2</sup> Cf. chapitre III.D.3 Influence de la concentration en sel. Nous avons déterminé que des NPo non fonctionnalisées sont stables en solution jusqu'à une concentration maximale de 1,7 mM en NaCl (aucune agrégation).

### 3. Chimie de surface

La force des interactions or-ligand suit l'ordre suivant :

interactions électrostatiques  $\lll$  interactions or-amine  $<$  interactions or-soufre

Les NPo sont connues pour interagir fortement avec les groupements aminés et soufrés [Hakkinen, 2012; Joshi, 2004; Kumar, 2003]. Les phosphines (hydrures de phosphore), moins utilisées, interagissent également avec la surface des NPo de manière relativement forte. L'or et le soufre étant deux éléments possédant des électronégativités très proches sur l'échelle de Pauling (respectivement 2,6 et 2,5), la liaison intervenant avec l'or ne peut pas être de type ionique, c'est plutôt une liaison de type covalent dont l'énergie a été estimée dans la littérature entre 125 et 170  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [Dubois, 1992; Ramachandran, 2003]. La plupart des fonctionnalisations rencontrées dans la littérature donc des soufres comme point d'ancrage à la surface des NPo. De manière comparable, l'interaction forte or-amine serait également de type covalent [Joshi, 2004] avec une énergie de liaison estimée entre 20 et 40  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [Aina, 2010; Frei, 2011; Kamenetska, 2009]. Il a également été mis en évidence une interaction de type électrostatique entre le groupement  $\text{NH}_3^+$  et les NPo négativement chargées [Kumar, 2003]. Ces deux types d'interactions or-amine adviendraient simultanément. Aussi dans le cas d'un ligand à la fois soufré et aminé, il y aura compétition entre la liaison or-soufre et la liaison or-amine. C'est ce qui a été mis en évidence dans le cas de polyéthylènes glycol thiolés et aminés [Xia, 2012]. Les deux interactions ont lieu à température ambiante (22°C), le ligand s'attachant à la surface des NPo tantôt via le soufre, tantôt via l'amine. Par contre, l'ancrage des thiols à la surface des NPo est favorisé à une température de 4°C, probablement à cause de la cinétique des équilibres d'attache à la surface des NPo (*i.e.* l'ancrage par le soufre serait plus rapide). Cette dépendance de la sélectivité en fonction de la température entre les groupements thiolés et aminés et une surface d'or a également été corroborée par les travaux d'Aina *et al.* [Aina, 2010].

D'autres types d'interactions peuvent avoir lieu à la surface des NPo. En effet, les NPo sont chargées négativement probablement par les ions de surface  $\text{AuCl}_4^-$ , ou encore le citrate ou l'acétone dicarboxylate résiduels de la synthèse de Turkevitch comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Aussi, des interactions électrostatiques peuvent avoir lieu à la surface des NPo avec des espèces chargées positivement ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ , etc...). De cette manière, la nanoparticule se recouvre d'une ou plusieurs couches de molécules. Cela contribue à sa stabilisation en solution.

Dans le cas des molécules d'intérêt biologique (ADN, acides aminés, protéines), ce sont des résidus thiolés et/ou aminés qui peuvent leur conférer une interaction particulière avec les NPo. Cependant les types d'interactions engagées dépendent de la molécule/protéine. Par exemple, dans le cas de la HSA (albumine de

sérum humain), plusieurs interactions sont proposées au sein de la littérature. Quand certains s'accordent sur une interaction HSA-NPo de type covalent via les résidus thiolés (cystéines et ponts disulfures) de la protéine [Chen, 2008; Sen, 2011], d'autres proposent une interaction électrostatique via les résidus positifs (lysine) [Cañaveras, 2012; Goy-López, 2012; Nayak, 2008; Shang, 2007; Wang, 2014]. Il existe également d'autres propositions impliquant des liaisons hydrogènes entre la HSA et les NPo [Goy-López, 2012] ou encore une interaction régie par des forces de Van der Waals [Khan, 2013]. Ainsi, si une interaction ligand-NPo est avérée, il peut être parfois difficile de statuer quant aux types d'interactions engagées.

Au fil de cette partie, nous avons évoqué les principales propriétés des NPo et notamment leur chimie de surface. A présent nous allons voir comment synthétiser ces nanoparticules.

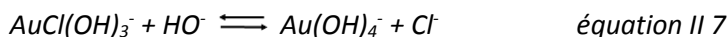
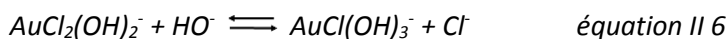
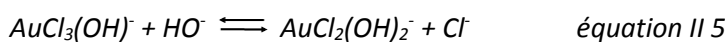
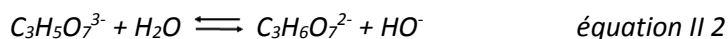
#### 4. Synthèse (la méthode Turkevitch)

A ce jour, il existe de très nombreuses voies de synthèse des nanoparticules d'or, que ce soit par des méthodes physiques, chimiques, radiolytiques ou encore biologiques. Au cours de ce travail, nous avons choisi d'utiliser une méthode chimique. Il existe deux méthodes chimiques notables dans la littérature : la méthode de Turkevitch [Enustun, 1963; Turkevitch, 1985; Turkevitch, 1951] et celle de Brust-Schiffrin [Brust, 1994]. Cette dernière, décrite par Brust en 1994, permet de préparer des nanoparticules d'or de 1 à 10 nm de diamètre dans des solvants organiques tel que le toluène. Dans cette synthèse, l'acide chloraurique  $\text{HAuCl}_4$  réagit avec un réducteur puissant : le tétraborohydrure de sodium. Cette synthèse biphasique est réalisée en présence de bromure de tétraoctylammonium intervenant en tant que catalyseur de transfert de phase et d'agent stabilisant. Par ailleurs, cette synthèse est réalisée en présence de molécules thiolées afin de stabiliser les NPo après synthèse. Dans cette étude nous avons exclusivement utilisé la méthode de Turkevitch, et c'est donc la seule méthode que nous nous attacherons à présenter en détail.

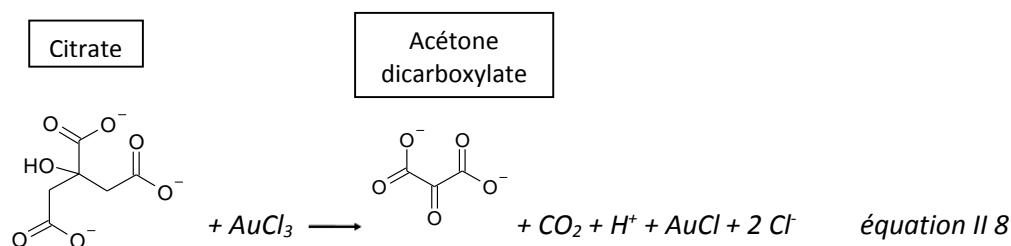
Introduite par Turkevitch en 1951 [Turkevitch, 1951], cette synthèse reste encore aujourd'hui la plus citée dans la littérature. Elle est basée sur une réduction en solution aqueuse de sels d'or ( $\text{K}^+ \text{AuCl}_4^-$ ) par le citrate de tri-sodium. La synthèse s'opère à une température d'environ  $60^\circ\text{C}$  de manière à activer la réaction. Après une quinzaine de minutes, la suspension colloïdale prend une couleur rouge vin et la taille des NPo est alors d'environ 20 nm. Cette synthèse fut par la suite améliorée avec les travaux de Frens dans les années 70 [Frens, 1973] de sorte à étendre la gamme de taille des NPo synthétisées. Il est désormais possible de contrôler la taille des particules obtenues, entre 10 à 150 nm, par variation du rapport oxydant/réducteur en solution [Kimling, 2006; Zabetakis, 2012] et de l'ajout éventuel de surfactants [Yonezawa, 1999].

Le mécanisme de la méthode Turkevich-Frens a été publié par le groupe de Kumar en 2006 [Kumar, 2006]. Depuis, plusieurs groupes de recherche ont examiné dans les détails le mécanisme de formation des NPo utilisant cette voie de synthèse [Polte, 2010; Pong, 2007]. Ce mécanisme est constitué de deux étapes de réduction, la première implique deux électrons et permet de réduire l'or d'un degré d'oxydation +III à +I via une réaction d'oxydoréduction avec le citrate. Ce n'est que lorsque tout le  $Au^{III}$  est réduit en  $Au^I$  (disparition de la couleur jaune caractéristique de la solution) qu'une deuxième étape de réduction intervient,  $Au^I$  se dismute alors en  $Au^0$  et  $Au^{III}$ . La limite de solubilité est alors atteinte et le processus de nucléation commence : des noyaux solides se forment puis croissent. La solution devient alors de plus en plus foncée jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge vin. Ce mécanisme est constitué de plusieurs réactions parallèles et consécutives détaillées ci-après [Kumar, 2006; Xia, 2010].

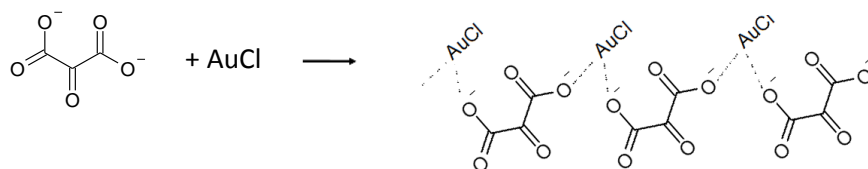
La première étape consiste en l'hydrolyse du citrate et d' $AuCl_4^-$ , elle dépend du pH de la solution :



Puis advient une réaction d'oxydoréduction entre  $AuCl_3$  et le citrate formant  $AuCl$  et l'acétone dicarboxylate :



Parallèlement l'acétone dicarboxylate de sodium se complexe avec AuCl, étape de complexation qui favorise l'obtention de nanoparticules sphériques et monodisperses [Privman, 1999].



équation II 9

Enfin AuCl (Au<sup>I</sup>) se dismute en Au<sup>0</sup> et Au<sup>III</sup>:



Ainsi, dans la synthèse de Turkevich, le citrate et/ou l'acétone dicarboxylate résultant de l'oxydation du citrate jouent le rôle de stabilisateur des NPo. Une fois les nanoparticules synthétisées, les citrate et/ou ions acétone dicarboxylate en solution s'adsorbent à leur surface formant ainsi une couche d'anions. Leurs charges négatives créent alors une répulsion électrostatique entre les particules, évitant ainsi leur agrégation. Il est à noter que l'addition de citrate sert également de tampon en fonction des quantités et des concentrations [Xia, 2010].

Dans les dix dernières années, de nombreux groupes se sont intéressés, lors de cette synthèse, aux facteurs qui influencent les caractéristiques des NPo obtenues (taille, distribution, stabilisation). Par exemple, plusieurs études se sont penchées sur l'influence du pH de la solution conduisant à la formation de NPo monodisperses ayant des tailles comprises entre 20 et 40 nm [Li, 2011; Patungwasa, 2008; Rahman, 2011]. Ces études ont montré qu'un pH compris entre 5 et 7 était optimal pour l'obtention de nanoparticules sphériques et monodisperses. Shulz *et al.* ont même montré que l'utilisation d'un tampon citrate conduit à une nette amélioration de la méthode réduisant la dispersion en taille des NPo synthétisées et augmentant la reproductibilité des synthèses [Schulz, 2014]. Le pH semble donc être un paramètre essentiel pour la synthèse de NPo. La température et la vitesse d'agitation sont également des facteurs importants dans le contrôle de la taille et de l'homogénéité de formes au sein de la synthèse. En effet, il semblerait que l'augmentation de la température et de la vitesse d'agitation permette l'obtention d'une synthèse plus homogène en taille et limite la formation de NPo non sphériques (triangles, polygones) [Hayat, 1989; Kumar, 2011]. De plus, l'augmentation de la température et de la vitesse d'agitation facilite le passage de la barrière d'activation de la réaction et conduit à des NPo de plus petites tailles [Kumar, 2011; Rohiman, 2011]. Enfin, l'utilisation de solutions fraîchement préparées est très importante pour l'obtention d'une distribution de taille la plus fine

possible [Hayat, 1989]. D'autres améliorations de la méthode Turkevitch impliquent l'utilisation d'une irradiation par une lumière fluorescente [Kim, 2011] ou d'ultrasons [Aguilera, 2011; Su, 2003].

Les NPo synthétisées selon la méthode de Turkevitch ont toujours une taille supérieure à 10 nm en raison de la faible capacité de réduction du citrate trisodique dihydraté. Des résultats intéressants de l'équipe de Puntos [Ojea-Jimenez, 2010] sont apparus en 2010 et montrent que l'utilisation de l'eau lourde  $D_2O$  comme solvant à la place de  $H_2O$  lors de la synthèse des NPo permet de réduire leur taille à 5 nm. Il a été conclu que  $D_2O$  augmente le pouvoir réducteur du citrate. Dans cette même optique de réduction de la taille des NPo obtenues par la méthode de Turkevitch, des études récentes montrent que lorsque l'on ajoute  $KAuCl_4$  à la solution de citrate plutôt que l'inverse, des NPo des tailles inférieures à 10 nm sont obtenues [Philip, 2008; Sivaraman, 2011]. En somme, la taille des NPo produites par cette synthèse peut être comprise entre 5 nm et 150 nm.

En conclusion, la synthèse de Turkevitch a fait l'objet de nombreux travaux et a été étudiée durant les 65 dernières années par l'utilisation de plusieurs techniques expérimentales. Toutes les études précédemment citées mettent en évidence le rôle clé de trois paramètres dans la méthode : le pH de réaction du mélange citrate/sel d'or, la concentration des réactifs et la force ionique du milieu. Ces paramètres affectent les taux de nucléation et d'agrégation et influencent donc la taille et la distribution finale des NPo en solution.

Au cours de cette étude, il sera important de maîtriser les facteurs qui influencent la synthèse de sorte à obtenir des synthèses reproductibles, homogènes en forme et monodisperses. Nous veillerons donc à travailler avec des solutions fraîchement préparées ainsi qu'au contrôle de la température et de la vitesse d'agitation pour chaque synthèse.



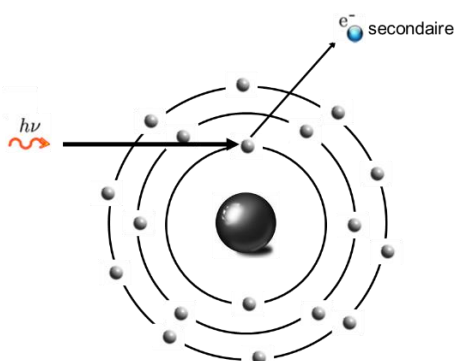
## C. Interaction rayonnement-matière

L'étude de l'interaction rayonnement-matière soulève deux questions : Comment la matière est-elle transformée par le passage du rayonnement (dépôt d'énergie)? Comment le rayonnement est-il impacté par la matière? Dans cette partie, nous aborderons l'interaction photon-matière et nous introduirons également différentes notions de la chimie sous rayonnement.

### 1. Interaction photon-matière

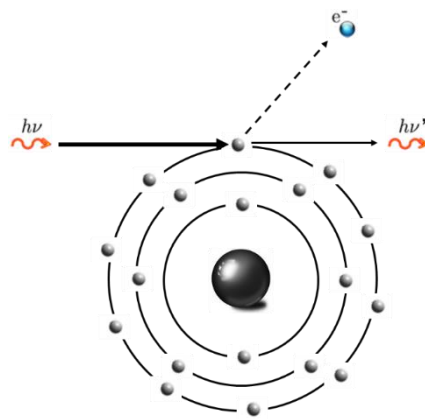
Il existe différents types d'interactions photon-matière condensée : l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la matérialisation en paires. Le coefficient d'atténuation global  $\mu$  est défini comme la somme de coefficients d'atténuations respectifs des trois types d'interactions, respectivement  $\mu = \tau + \sigma + \pi$ .

L'effet photoélectrique se produit dans un domaine d'énergie allant de quelques dizaines d'eV à 1 MeV. Cet effet est basé sur l'interaction d'un photon incident d'une énergie  $E = h\nu$  avec un électron du cortège électronique d'un atome (**Figure II 6**). Si cet électron est initialement au repos, il doit absorber au moins l'énergie qui le lie au noyau pour s'en détacher. Il est alors appelé électron secondaire. Ce dernier est éjecté grâce à l'énergie excédentaire apportée par le rayonnement incident. Le départ de l'électron émis crée ainsi une lacune électronique au sein du cortège qui se comble par déplacements en cascade d'électrons de couches plus externes. Ce phénomène est accompagné de l'émission de photons X dont l'énergie est négligeable (spectre de raies caractéristique du matériau). A noter que la position de l'électron arraché dans le cortège électronique dépend de l'énergie du rayonnement incident. Ainsi des photons de faible énergie ne pourront arracher que les électrons les moins liés et donc les plus externes à l'atome. Le coefficient d'absorption photoélectrique  $\tau$  est globalement proportionnel à  $Z^5$ .



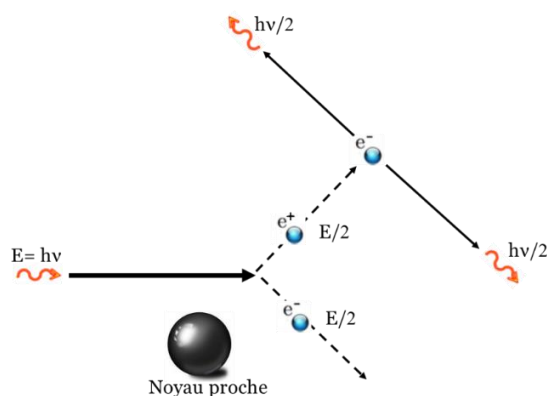
**Figure II 6:** Schématisation de l'effet photoélectrique.

L'effet Compton se manifeste pour des énergies comprises entre 0,1 MeV et 10 MeV. Ici, le photon incident entre en collision avec un électron situé sur la couche externe d'un atome (**Figure II 7**). L'électron est alors éjecté avec une énergie cinétique  $E_c$  plus ou moins élevée dépendant de l'énergie du rayonnement incident. Toute l'énergie du photon n'étant pas cédée au milieu, celui-ci est alors dévié. L'éjection de l'électron est donc accompagnée de l'émission de ce photon dit secondaire puisque d'une énergie moindre par rapport au photon incident. L'équation de conservation de l'énergie suivante est alors applicable:  $h\nu = h\nu' + E_c$  (*équation II 11*). Le coefficient d'absorption Compton est proportionnel à  $Z$ .



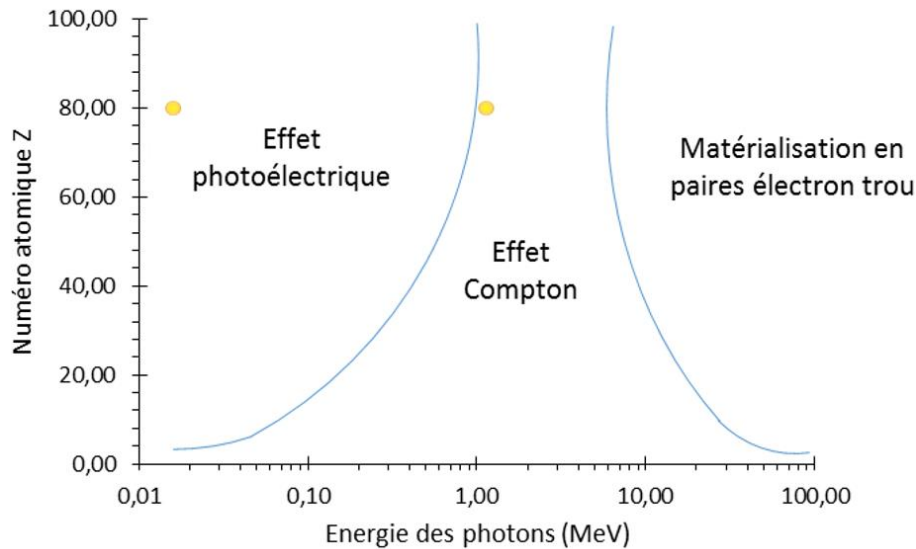
**Figure II 7** : Schématisation de l'effet Compton.

Enfin, la matérialisation en paires électron-trou ne se manifeste que pour les hautes énergies et en pratique au-delà de 3 MeV. Cet effet n'interviendra donc pas dans le cadre de notre étude. Quelques mots cependant à propos du phénomène. Il s'agit de la transformation du photon en paire électron – trou lorsque le faisceau incident de haute énergie passe à proximité d'un noyau (**Figure II 8**). La seule condition à ce phénomène réside dans le fait que l'énergie du photon incident doit être supérieure ou égale à l'énergie correspondante à la masse des deux particules (électron et trou) i.e.  $E = m_e \cdot c^2 = 1,02 \text{ MeV}$  (*équation II 12*).



**Figure II 8** : Schématisation de la matérialisation en paire électron-trou.

La **Figure II 9** représente les différents domaines de prépondérance de ces trois effets en fonction du numéro atomique  $Z$  du matériau et de l'énergie du rayonnement incident. Dans le cadre de cette étude, pour des NPo, l'effet photoélectrique sera dominant pour les expériences réalisées avec des rayons X de 17,5 keV et l'effet Compton sera dominant pour celles réalisées avec un rayonnement  $\gamma$ .



**Figure II 9** : Domaines de prépondérance des différentes interactions photon-matière en fonction du numéro atomique du matériau et de l'énergie du photon. [Tabata, 1991] Les ronds jaunes représentent les zones d'intérêt dans cette étude.

## 2. Coefficients massiques d'absorption

Lorsqu'un faisceau de photons (ou de particules) traverse la matière, il est atténué. Dans le cas d'un matériau homogène, cette atténuation du faisceau dépend essentiellement de la nature et de l'épaisseur du matériau traversé (**équation II 13**). On définit alors  $\mu$ , le coefficient d'absorption linéaire tel que :

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad \text{équation II 13}$$

Où  $I$  est l'intensité du rayonnement ionisant transmise,  $I_0$  l'intensité du rayonnement ionisant incident et  $x$  l'épaisseur du matériau en cm ou en m.  $\mu$  s'exprime donc en  $\text{cm}^{-1}$  ou en  $\text{m}^{-1}$ .

En divisant le coefficient d'absorption linéaire par la densité du matériau absorbant, on obtient le coefficient d'absorption massique  $\mu/\rho$ . Il s'exprime en  $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$  et est indépendant de la densité et de l'état physique du matériau. L'usage du coefficient d'absorption massique permet de s'affranchir de la valeur de la densité du matériau qui n'est pas forcément homogène ou connue de façon précise.

Nous définissons également le coefficient d'absorption d'énergie massique  $\mu_{en}/\rho$  qui représente la fraction d'énergie absorbée par le matériau, donné par :

$$E = E_0 e^{-\frac{\mu_{en} x}{\rho}} \quad \text{équation II 14}$$

Où E est l'énergie du rayonnement absorbée par le matériau et  $E_0$  l'énergie incidente du rayonnement. Cette information très importante en chimie sous rayonnement permet de connaître la fraction d'énergie transférée localement au matériau.

### 3. Notions associées à la chimie sous rayonnement

Plusieurs paramètres sont à considérer pour rendre compte des effets chimiques d'un rayonnement. La dose, le débit de dose, le type de rayonnement, l'énergie du rayonnement et la quantité d'énergie déposée (transfert d'énergie linéique) dans le milieu ont une importance cruciale sur ces effets.

La dose est définie comme l'énergie absorbée par unité de masse dans le milieu. Elle s'exprime en joule ou eV par kg. Un gray (Gy) équivaut en unités du système international à un joule par kg. Le débit de dose est la dose déposée par unité de temps, il s'exprime dans les unités du système international en  $\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}$  mais le  $\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$  et le  $\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  sont également des unités usuelles. La notion de rendement radiolytique est essentielle car ce dernier permet de quantifier les espèces générées par le rayonnement ionisant. En effet, le rendement radiolytique est défini comme la quantité d'espèces formées ou disparues pour un joule d'énergie déposée. Pour une espèce donnée X, il est noté  $G(X)$  et s'exprime en mole par joule ( $\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}$ ) ou en molécules par 100 eV. Usuellement, il s'agit du rendement mesuré 100 ns après le passage du rayonnement ionisant dans l'eau [Buxton, 1988]. Les rendements des espèces radicalaires qui nous intéresseront dans cette étude sont rassemblés **Table II 1**.

	Atmosphère inerte			Atmosphère aérée			
	HO•	e <sup>-</sup> <sub>hyd</sub>	H•	HO•	e <sup>-</sup> <sub>hyd</sub>	O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	H•
<b>Rayons X 17,5 keV</b>	200	200		200	0		0
<b>Rayons <math>\gamma</math> 1,2 MeV</b>	280	280	60	280	0	340	0

**Table II 1** : Rendements radiolytiques (en  $\text{nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ ) des espèces radicalaires produites par radiolyse de l'eau sous atmosphères inerte et aérée. Cas d'un rayonnement gamma [Ferradini, 1999], cas d'un rayonnement X [Fulford, 2001].

Les rendements radiolytiques des espèces produites lors de la radiolyse de l'eau dépendent entre autres du transfert d'énergie linéique (TEL) [Allen, 1961; Tabata, 1991]. Le TEL, autrement nommé pouvoir d'arrêt, est défini comme la quantité d'énergie déposée au sein d'un milieu par unité de longueur :

$$TEL = -dE/dx \qquad \text{équation II 15}$$

Où  $dx$  représente une unité de longueur de la distance parcourue. Il est usuellement exprimé en  $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ . Le transfert d'énergie au sein d'un milieu dépend du type de radiation (photon ou autre) et fortement de l'énergie de la particule incidente. Plus l'énergie de la particule est faible (ralentie par l'énergie qu'elle cède), plus la fraction d'énergie déposée dans le milieu est grande. Aussi, le dépôt d'énergie d'une particule incidente est un processus fortement non-homogène. Par ailleurs, l'énergie déposée au sein du milieu sur la trajectoire du faisceau incident peut être beaucoup plus grande que l'énergie d'ionisation de l'eau. Alors l'énergie transmise à l'eau produit des cascades d'ionisation dans lesquelles les molécules d'eau sont ionisées successivement. Ces ionisations consécutives s'éloignent de plus en plus de la trajectoire initiale de la particule ionisante et l'énergie déposée devient de plus en plus faible au même titre que le TEL devient de plus en plus grand. Ce phénomène donne lieu à la formation de grappes d'ionisation. Ainsi, les concentrations locale et globale des espèces produites par radiolyse de l'eau dépendent fortement de la distribution spatiale du dépôt d'énergie en solution. En effet, plus le TEL est grand, plus la recombinaison des radicaux en produits moléculaires est grande. Ainsi pour des irradiations par des photons X ou  $\gamma$ , le TEL est faible comparativement à d'autres particules plus lourdes (protons, ions), les grappes d'ionisation sont isolées spatialement les unes des autres, ce qui engendre une recombinaison entre les espèces radicalaires faible. Dans cette étude, nos expériences ont été réalisées avec des rayons X de 17,5 keV ou des rayons  $\gamma$  issus de la désintégration du Cobalt 60. Le TEL de ces particules est connu pour des photons et est égal à  $0,23 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  [Ferradini, 1999]. Pour des rayons X de 17,5 keV, le TEL est de quelques  $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  [ICRU, 1970].

Au cours de ce paragraphe, nous avons introduit les notions essentielles utiles à la compréhension de ce manuscrit et décrit l'interaction photon-matière. Par ailleurs, dans de nombreux cas, la matière en question est l'eau. Nous nous attacherons donc dans la partie suivante à décrire la radiolyse de l'eau.

## D. Radiolyse de l'eau

### 1. Introduction

Le corps humain est composé d'environ 65% d'eau. Aussi, dans l'optique d'applications biologiques, il est essentiel de bien comprendre la radiolyse de l'eau. De plus, les produits de la radiolyse de l'eau sont bien connus pour interagir avec les éléments du vivant [Halliwell, 2004; Riley, 1994], il sera important d'en faire une description poussée. Par exemple, le radical hydroxyle HO• intervient en tant que principal acteur de la dégradation de l'ADN [Von Sontag, 2006].

Historiquement, les études des effets des rayonnements sur l'eau ont démarré avec l'étude de Giesel en 1902 [Giesel, 1902] qui a été le premier à observer la libération de dihydrogène et de dioxygène à partir d'une solution aqueuse de bromure de radium. En 1914 pour la première fois, Debiere propose une décomposition de l'eau sous rayonnement ionisant en radicaux H• et HO• ainsi que leur recombinaison en H<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Debiere, 1914]. Mais cette hypothèse ne sera confirmée que plus tard en raison des méthodes de détection de l'époque qui ne permettaient que des mesures des espèces moléculaires stables en solution. C'est ensuite au cours de la seconde guerre mondiale que des études poussées portant sur le mécanisme de la radiolyse de l'eau ont été menées et poursuivies jusqu'à ce jour [Buxton, 2003; Ferradini, 1999; Keene, 1960; Ma, 2013; Pikaev, 1986].

### 2. Mécanisme de la radiolyse de l'eau

L'étape physique est la première étape de la radiolyse de l'eau. Suite à l'interaction des molécules d'eau avec un rayonnement ionisant, celles-ci subissent une excitation électronique ou une ionisation accompagnée de l'émission d'un électron. Cet électron éjecté s'il possède une énergie supérieure à 9 eV, peut être considéré comme une source secondaire d'ionisation [Kaplan, 1990]. Sinon, il intervient seulement en tant que source secondaire d'excitation.

Cette étape prend fin en 10<sup>-16</sup>s après le passage du rayonnement ionisant, les produits de la radiolyse sont alors l'électron e<sup>-</sup> et les formes ionisée et excitée de l'eau respectivement H<sub>2</sub>O<sup>•+</sup> et H<sub>2</sub>O\*.



Suite à l'étape physique d'absorption du rayonnement par l'eau, une multitude de réactions en chaîne se produit : c'est l'étape physico-chimique, elle dure jusqu'à  $10^{-12}$  s après le passage du rayonnement ionisant. Les molécules d'eau à l'état excité vont se dissocier et contribuent à la formation de radicaux libres. Cependant la plus grande contribution en radicaux libres provient des réactions de l'eau avec les molécules d'eau ionisées (**équation II 19**).

L'électron quant à lui, s'il ne réagit pas directement avec une molécule d'eau (**équation II 20**), peut céder son énergie cinétique via des processus d'excitation ou d'ionisation. Lorsque son énergie devient égale à  $k_B T = E_{th}$  (avec  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température en Kelvin), l'électron se thermalise (**équation II 21**), il est noté  $e^-_{th}$ . L'électron thermalisé va alors, grâce à sa charge, orienter les molécules d'eau autour de lui. Une cavité d'environ 5 Å de diamètre se crée alors et l'électron est dit hydraté ou solvaté. Cet électron thermodynamiquement stable sera noté  $e^-_{hyd}$  ou  $e^-_{solv}$ . L'électron peut également se recombinaison avec une molécule d'eau ionisée donnant ainsi lieu à une molécule d'eau excitée (**équation II 18**).



Puis, entre  $10^{-12}$  s et  $2.10^{-9}$  s après le passage du rayonnement ionisant, suit l'étape dite de chimie non-homogène [Buxton, 2003]. Au cours de cette étape, des réactions chimiques ont lieu au sein des grappes et les espèces primaires ( $e^-_{hyd}$ ,  $H^*$ ,  $HO^*$ ,  $H_3O^+$ ) diffusent dans le milieu réactionnel et donc hors des grappes jusqu'à une distribution homogène dans l'espace (chimie homogène). Ce n'est qu'au cours de cette étape de chimie homogène que l'on peut définir des concentrations homogènes des espèces. Deux types de réaction adviennent au cours de cette étape : les réactions de recombinaison et les réactions avec l'eau.

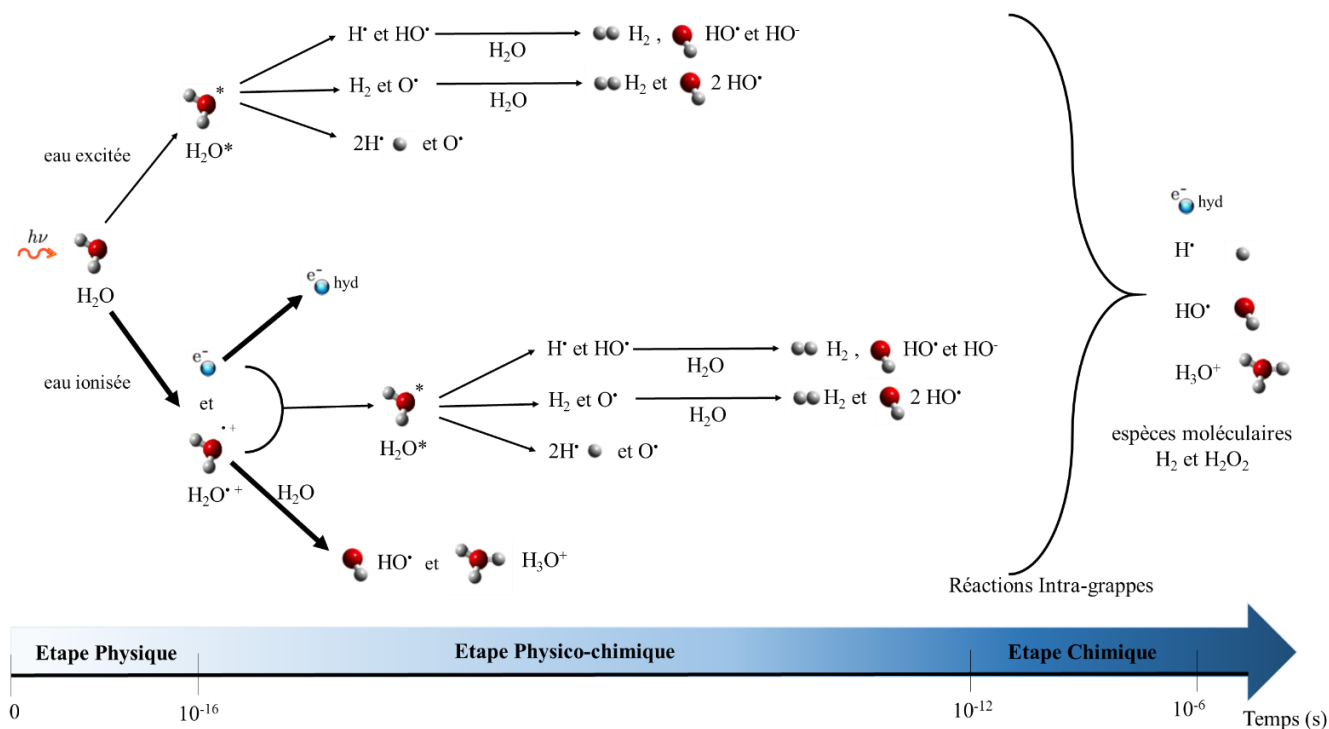


Figure II 10 : Schéma général de la radiolyse de l'eau désaérée. Les flèches les plus épaisses indiquent les voies réactionnelles majeures.

Dans le cas où un soluté est présent en solution, comme par exemple le dioxygène, le mécanisme est modifié au niveau de l'étape de chimie non homogène. Le soluté agit alors comme un capteur de radicaux et le bilan de la radiolyse est modifié. Dans les paragraphes suivants, nous allons d'abord présenter les deux espèces d'intérêt de ce travail à savoir l'électron hydraté et le radical hydroxyle, puis nous explorerons les réactions engendrées en présence de certains capteurs.

### 3. Deux espèces de la radiolyse de l'eau

#### a. Electron hydraté

C'est en 1962 que E.J. Hart et J.W. Boag d'une part, et J.P. Keene d'autre part, ont observé pour la première fois l'électron hydraté. E.J. Hart et J.W. Boag ont enregistré le spectre d'absorption de l'électron hydraté après irradiation grâce à la radiolyse pulsée au sein de solutions aqueuses de carbonate de sodium mais également dans l'eau pure sous atmosphère inerte [Hart, 1962]. Simultanément J.P. Keene, de son côté,



a décrit l'électron hydraté comme le premier homologue à courte durée de vie de l'électron métastable<sup>3</sup> déjà bien connu à l'époque dans l'ammoniaque [Keene, 1963]. Avec un potentiel de réduction de  $E^{\circ}_{\text{H}_2\text{O}/\text{e}_{\text{hyd}}-} = -2,87 \text{ V}_{\text{ENH}}$  [Schwarz, 1981; Wardman, 1989], l'électron hydraté constitue l'espèce la plus réductrice de tous les produits issus de la décomposition de l'eau. Il est donc très réactif et peut réagir avec toute espèce chimique (dont les potentiels de réduction sont supérieurs). Cette réaction est alors une réduction monoélectronique. Une autre caractéristique notable de cet électron hydraté est son caractère basique avec un pKa de 9,6.

### b. Radical hydroxyle

Le spectre UV du radical hydroxyle HO<sup>•</sup> dans l'eau a d'abord été identifié par J.K. Thomas en 1966 [Thomas, 1966] comme une large bande dans la région de 200 à 300 nm. Par la suite, son maximum a été établi à environ 235 nm dans les conditions normales de température et de pression [Boyle, 1969; Nielsen, 1976]. De plus, une mesure a mis en évidence un épaulement du spectre entre 300 et 400 nm [Czapski, 1993]. Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé à 235 nm,  $\epsilon_{235\text{nm}} = 600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [Hermann, 2003]. Cette absorption est donc très faible et rend la détection directe du radical hydroxyle très difficile. Avec un potentiel d'oxydation de  $E^{\circ}_{\text{HO}^{\bullet}/\text{H}_2\text{O}} = 2,34 \text{ V}_{\text{ENH}}$  [Wardman, 1989], le radical hydroxyle constitue l'espèce la plus oxydante de tous les produits issus de la décomposition de l'eau. Combiné à des constantes de vitesse de réaction de HO<sup>•</sup> très grandes, il réagit avec la plupart des substrats organiques. Pour près de 2000 composés en phase liquide [RCNDDC], ces constantes ont été déterminées et sont de l'ordre de  $10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ces réactions sont donc limitées par la diffusion des espèces en solution, le radical hydroxyle réagit de manière instantanée avec le soluté (énergie d'activation quasi-nulle). Cela lui confère une durée de vie très courte en solution de l'ordre de  $10^{-6}\text{s}$  [Attri, 2015; Lesser, 2006]. Ainsi, il diffuse très peu en solution et son libre parcours moyen est estimé à quelques nanomètres dans l'eau [Lesser, 2006].

Les propriétés du radical hydroxyle (sa durée de vie particulièrement courte et son absorbance est très faible) rendent sa détection directe particulièrement difficile. Aussi, dans ce travail, nous avons choisi une méthode de détection indirecte basée sur la réaction d'hydroxylation de la coumarine par le radical HO<sup>•</sup>.

---

<sup>3</sup> Une espèce est dite dans un état métastable lorsque qu'elle est dans un état stable cinétiquement mais pas thermodynamiquement. Considérant un système physicochimique représenté par une surface d'énergie potentielle, l'état métastable correspond alors à un minimum local en énergie. Une barrière d'activation sépare cet état du minimum absolu correspondant à l'état d'équilibre thermodynamique.

#### 4. Capture des radicaux

##### a. Notion de pouvoir de capture

Lorsqu'un soluté est présent en solution, il peut alors y avoir capture du radical par ce soluté. On peut ainsi écrire la réaction suivante :

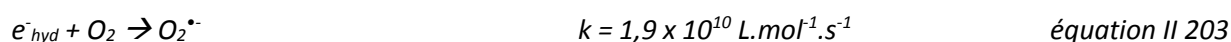


Avec  $R^{\bullet}$  l'espèce radicalaire concernée, S le soluté et  $RS^{\bullet}$  le radical produit de la réaction.

Le produit  $RS^{\bullet}$  peut être observable ou donner lieu à des produits stables. Sa quantification permet alors un dosage indirect de l'espèce radicalaire  $R^{\bullet}$  et donc la détermination d'un rendement radiolytique. C'est ce que nous utiliserons pour déterminer le rendement en radicaux hydroxyle (espèce radicalaire) à l'aide de la coumarine (capteur).

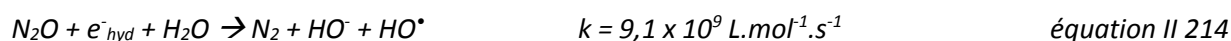
##### b. Radiolyse de l'eau en présence de solutés

La présence de dioxygène en solution perturbe le mécanisme de la radiolyse de l'eau. En effet le dioxygène intervient comme capteur des espèces radicalaires réductrices et notamment de l'électron hydraté [Spinks, 1990] selon la réaction :



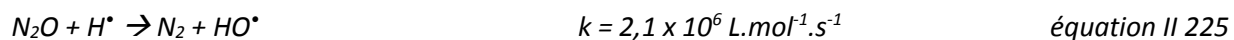
Par exemple, au sein d'une solution aérée ( $[O_2]_{dissous} = 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Cf. III.D.2 **Table III 5**), l'électron hydraté sera capté en 144 ns.

Au même titre que le dioxygène, le protoxyde d'azote capte les espèces réductrices et particulièrement l'électron hydraté pour former une molécule de diazote, un anion hydroxyde et un radical hydroxyle [Nakken, 1965] selon :



Cette réaction permet ainsi de convertir l'électron hydraté en radical hydroxyle. Au sein d'une solution saturée en protoxyde d'azote, la concentration en  $N_2O$  dissous est de  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Ainsi l'électron hydraté sera capté en 4,4 ns.

Par ailleurs, le protoxyde d'azote interagit également avec le radical  $H^\bullet$  selon :



Cette réaction est beaucoup plus lente et est souvent négligée.

Au fil de cette partie, nous avons décrit le mécanisme de la radiolyse de l'eau en présence ou en absence de différents capteurs de radicaux libres. Parmi ces espèces réactives, il en est deux qui sont notables et d'intérêt crucial dans notre étude : l'électron hydraté d'une part et le radical hydroxyle d'autre part. Nous nous sommes attachés à la description de leurs propriétés. Dans cette étude, nous souhaitons quantifier ces deux espèces radicalaires en présence de NPo et nous avons utilisé la coumarine comme capteur pour la détection et la quantification du radical hydroxyle.

## E. Détection indirecte du radical hydroxyle par la coumarine

La coumarine (**Figure II 11**), ou benzopyran-2-one, est une molécule très odorante souvent utilisée dans l'industrie de la parfumerie. Cette molécule peut être extraite de la fève tonka ou de la lavande [Boisde, 2000]. La coumarine, ainsi que ses dérivés, possèdent de nombreuses propriétés qui expliquent leur utilisation en médecine : par exemple anticoagulantes et anticonvulsivantes [Park, 1996], antifongiques, antibactériennes et antioxydantes [Bailly, 2004; Khan, 2004]. De plus, et c'est là le point majeur qui servira à notre étude, la coumarine et ses dérivés sont souvent utilisés comme sondes grâce à leurs propriétés de fluorescence.

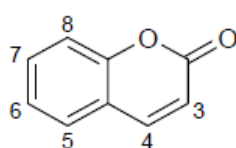


Figure II 11 : Molécule de coumarine.

Dans ce travail, nous avons utilisé la coumarine comme capteur du radical hydroxyle. La réaction se produisant est une addition et six hydroxycoumarines (3-8) peuvent être formées :

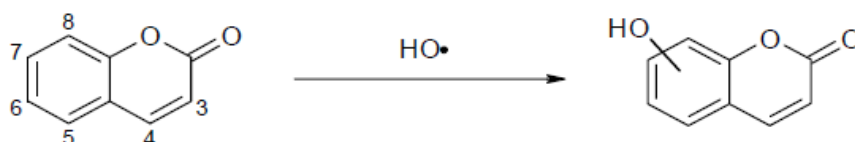
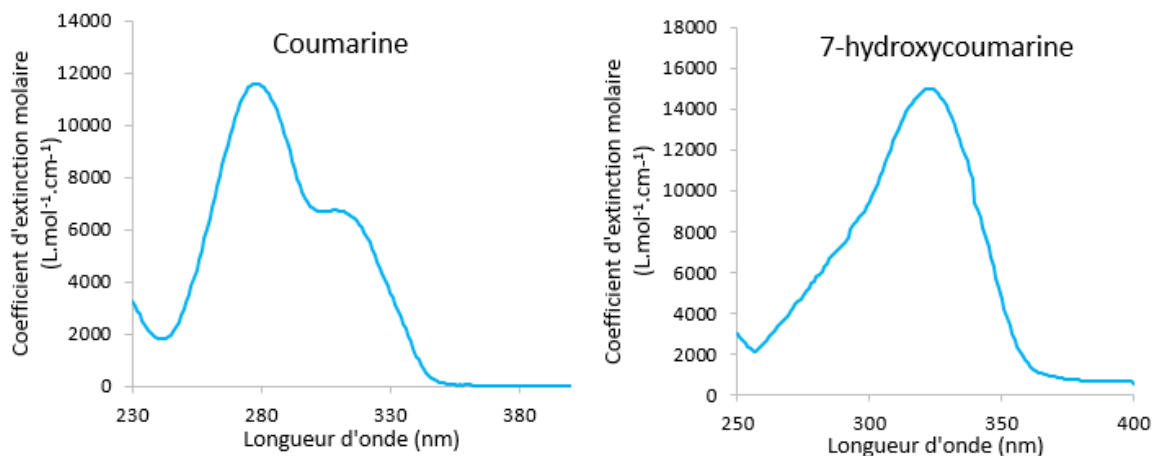


Figure II 12 : Réaction d'addition du radical hydroxyle sur la coumarine.

Les coumarines sont des hétérocycles aromatiques qui présentent une forte conjugaison. Parmi toutes les hydroxycoumarines formées, la 7-hydroxycoumarine exhibe des propriétés d'absorption et de fluorescence plus intéressantes que les autres. En effet, son spectre d'absorption présente le plus fort effet bathochrome par rapport à celui de la coumarine avec des maxima respectifs à 324 et 277 nm (**Figure II 13, Table II 2**). Par ailleurs, bien que la coumarine ne soit que très peu fluorescente, il se trouve qu'une substitution par un atome donneur en position 7 (par exemple l'oxygène) augmente le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_f$  d'un facteur supérieur à 70% ( $\Phi_f = 0,66$  pour la 7-hydroxycoumarine) alors que la même substitution dans les autres positions ne mène qu'à des composés très peu fluorescents [Arora, 1982; Bababunmi, 1975; Creaven, 1965; Petrola, 1986; Zinsli, 1974]. La fluorescence de la 7-hydroxycoumarine permet donc une détection sensible de l'addition du radical hydroxyle sur la coumarine.

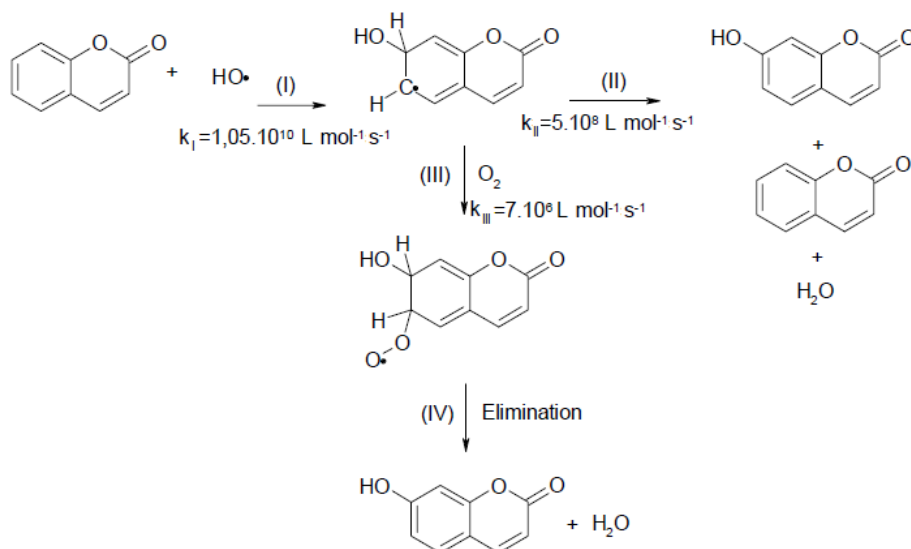


**Figure II 13** : Spectres d'absorption de la coumarine ( $\epsilon_{277nm} = 11600 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et de la 7-hydroxycoumarine ( $\epsilon_{324nm} = 15000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) dans l'eau.

	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
<b>Coumarine</b>	277	385
<b>7-hydroxycoumarine</b>	324	456

**Table II 2** : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la coumarine et de la 7-hydroxycoumarine.

Le mécanisme d'hydroxylation de la coumarine a été proposé par Louit *et al.* en 2005 [Louit, 2005] et est représenté **Figure II 14**.



**Figure II 14** : Mécanisme d'hydroxylation de la coumarine par le radical hydroxyle [Louit, 2005].

La première étape (I) du mécanisme a été proposée comme étant une réaction d'addition radicalaire de HO<sup>•</sup> sur une des doubles liaisons de la coumarine, voie classique de la réactivité du radical hydroxyle. Cette première étape (I) débouche alors sur deux voies mécanistiques, une voie dite de « dismutation » (II) et une autre voie faisant intervenir le dioxygène par une réaction d'addition / élimination (III)/(IV). Ainsi les quantités de 7-hydroxycoumarine dans l'eau sont différentes suivant que l'atmosphère soit oxygénée ou non.

Par ailleurs, il est possible de définir le pourcentage de capture du radical hydroxyle par la coumarine. Il s'agit du rapport entre la quantité de toutes les hydroxycoumarines formées et la quantité initiale de coumarine en solution :

$$\% \text{ capture} = \frac{\sum n_{\text{hydroxycoumarines}}}{n_{\text{coumarine}}} \times 100 \quad \text{équation II 26}$$

Avec n la quantité de matière en mol.

De la même manière, le pourcentage de formation de 7-hydroxycoumarine est défini comme le rapport entre la quantité de 7-hydroxycoumarine formée et la quantité initiale de coumarine en solution :

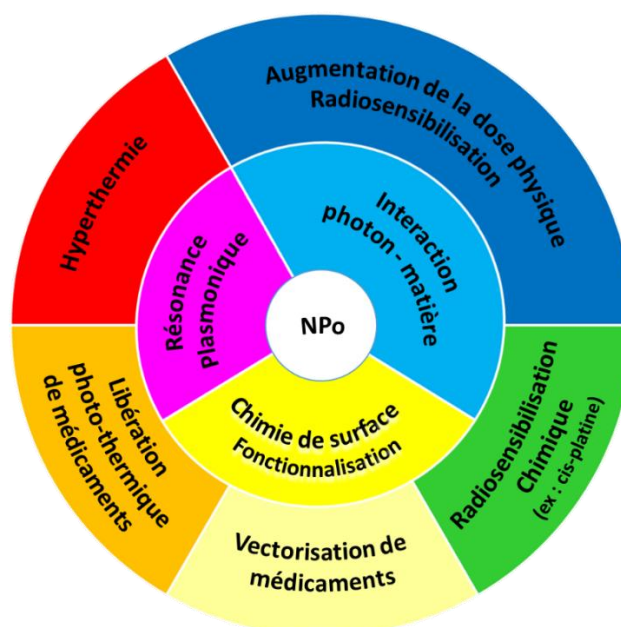
$$\% \text{ formation}_{7\text{-hydroxycoumarine}} = \frac{\sum n_{7\text{-hydroxycoumarine}}}{n_{\text{coumarine}}} \times 100 \quad \text{équation II 27}$$

Par exemple, pour un rayonnement gamma <sup>137</sup>Cs et un débit de dose de 1,8 Gy.min<sup>-1</sup>, Louit *et al.* ont rapporté un pourcentage de capture du radical hydroxyle par la coumarine de 20% et un pourcentage de formation de 7-hydroxycoumarine de 6,5%.

## F. Conclusions / Enjeux / Objectifs de l'étude

Au cours de ce chapitre, nous avons établi une revue bibliographique des notions essentielles à notre étude. Nous avons commencé par décrire le contexte actuel de la radiothérapie et nous nous sommes ensuite tournés vers l'enjeu majeur que constituent les NPo pour l'optimisation de ce traitement. Nous avons alors examiné tour à tour les différents paramètres à prendre en compte impactant l'effet radiosensibilisateur depuis les travaux pionniers d'Hainfeld [Hainfeld, 2004] en passant par une vision d'ensemble des résultats produits depuis. Nous nous sommes alors attachés à présenter les principales propriétés des NPo, de leurs propriétés optiques particulières à leur riche chimie de surface. Ce travail portant sur l'effet radiosensibilisateur des NPo, il était essentiel d'aborder les notions d'interaction rayonnement-matière qui entreront en jeu, puis de décrire la radiolyse de l'eau et son mécanisme. Enfin, dans l'optique d'une optimisation de la radiothérapie, nous nous sommes concentrés sur l'objectif principal de cette étude qui est la quantification des électrons hydratés et des radicaux hydroxyle produits en présence de NPo, et nous avons décrit plus en détail ces deux espèces, de leurs propriétés à l'outil de leurs quantifications : la coumarine.

Les nombreuses propriétés spécifiques des NPo telles que leurs propriétés optiques, leur chimie de surface et les produits de leur interaction avec un rayonnement justifient leur fort potentiel pour le traitement des pathologies cancéreuses (**Figure II 15**) ainsi que leur omniprésence dans la recherche biomédicale actuelle.



**Figure II 15** : Propriétés des NPo et leur utilisation potentielle dans le traitement du cancer. Une ou plusieurs de ces techniques pourraient être utilisées.

Cependant, nombreux sont les paramètres qui influent sur l'effet radiosensibilisateur (**chapitre II.A.2**) et la multiplicité des conditions au sein de la littérature rend la synthèse des résultats et la compréhension du phénomène difficile en vue d'une optimisation de la radiothérapie. En effet, le contraste est frappant entre le corps de données existant dans la recherche fondamentale et la rareté des données provenant de tests cliniques. Il est donc très important aujourd'hui de mieux comprendre les mécanismes qui régissent le phénomène de radiosensibilisation. Une étude systématique et quantitative afin de comprendre l'impact des différents paramètres influents est nécessaire.

Ce travail de thèse avait pour but de quantifier les espèces radicalaires produites en présence de NPo afin d'identifier les conditions et paramètres optimum pour la radiosensibilisation. La première partie du prochain chapitre porte sur l'élaboration et la caractérisation de différentes NPo. Un point remarquable de ce travail est que nous avons multiplié des méthodes de caractérisation complémentaires de sorte à obtenir une description fine des nano-objets utilisés. Une caractérisation complète de ces objets a été effectuée en termes de taille et morphologie, de chimie de surface, de comportement en suspension et de stabilité dans le temps et sera présentée. Nous nous intéresserons ensuite à la quantification des espèces réactives potentiellement à l'origine de l'effet radiosensibilisateur (radicaux hydroxyle et électrons) en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant. La suite de ce travail s'est donc focalisée sur la mise en place d'un protocole de dosage de ces espèces en présence de NPo. L'adaptation du dosage du radical hydroxyle par la coumarine proposé par Louit *et al.* [Louit, 2005] sera particulièrement développée. Par la suite, nous présenterons le dosage des radicaux hydroxyle puis des électrons en présence de NPo. Ces quantifications nous ont permis d'explorer différents paramètres influant sur l'effet radiosensibilisateur tels que l'énergie des photons ou la concentration et la fonctionnalisation des NPo. Enfin, le potentiel radiosensibilisateur des objets synthétisés et caractérisés sera discuté. La dégradation de molécules isolées telles que des plasmides d'ADN ayant été quantifiée par gel d'électrophorèse, elle pourra être corrélée à la production de radicaux hydroxyle précédemment mise en évidence.





---

# Résultats et Discussion

---

*«Le but de la discussion ne doit pas être la victoire, mais l'amélioration.»*

*Joseph Joubert*

A. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES D'OR NON FONCTIONNALISÉES .....	59
B. CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES .....	65
C. OPTIMISATION DU DOSAGE DES RADICAUX HYDROXYLE EN PRÉSENCE DE NANOPARTICULES D'OR .....	75
D. QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX HYDROXYLE EN PRÉSENCE DE NANOPARTICULES D'OR .....	94
E. QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION D'ÉLECTRONS EN PRÉSENCE DE NANOPARTICULES D'OR .....	109
F. DISCUSSION, ASPECT MÉCANISTIQUE .....	122
G. ADN .....	132



## III. Résultats

---

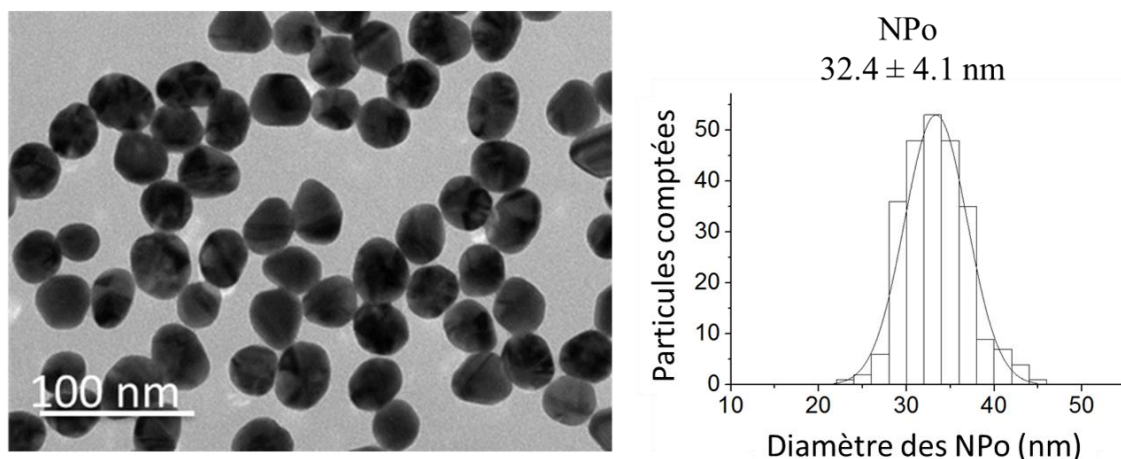
### A. Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or non fonctionnalisées

#### 1. Elaboration de nanoparticules d'or non fonctionnalisées

Parmi les nombreuses synthèses possibles pour l'élaboration de NPo, notre choix s'est porté sur la méthode de Turkevitch. En effet, cette méthode offre la possibilité d'une synthèse de NPo sphériques, présentant une distribution de taille étroite avec une concentration relativement forte. De plus c'est une synthèse reproductible, rapide et facile à mettre en œuvre. Au cours de ce travail, de nombreuses synthèses ont été réalisées et plus d'une vingtaine de lots de NPo différents ont été utilisés pour les expériences. Nous avons porté un intérêt tout particulier à la caractérisation des NPo. Comme, la maîtrise des paramètres de la synthèse n'est pas triviale (**partie II.B.4.**), chaque synthèse a fait l'objet d'une caractérisation poussée en terme de taille, de charge, de concentration et de recouvrement afin d'assurer la fiabilité et la reproductibilité des résultats. Ainsi, de nombreuses techniques d'analyse complémentaires ont été utilisées pour assurer une description fine de ces nano-objets (**Figure III 12**) et ont été croisées de façon à donner une vue plus complète des propriétés physico-chimiques des nano-objets. L'ensemble des résultats présentés ci-après constitue une moyenne de tous les lots de NPo synthétisés dans ce travail.

#### 2. Caractérisation du cœur d'or

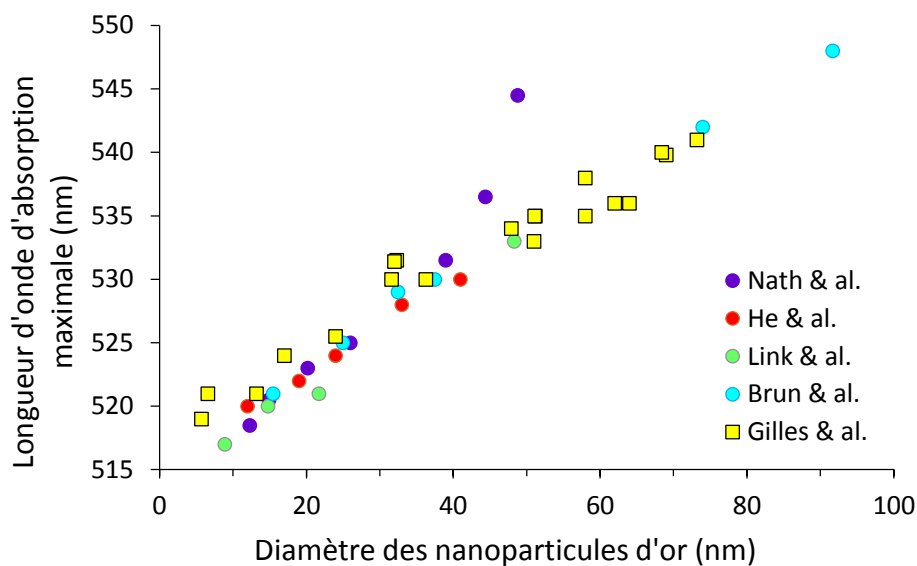
Notre première préoccupation était de caractériser très précisément les synthèses de NPo. La taille du cœur d'or de la nanoparticule est une information cruciale. En effet, elle donne également accès à la concentration des NPo. Le diamètre des NPo a donc soigneusement été déterminé par microscopie électronique à transmission (MET). Un cliché de NPo est présenté **Figure III 1** et révèle des nanoparticules essentiellement sphériques et monodisperses.



**Figure III 1 :** Cliché de microscopie électronique et distribution de NPo non fonctionnalisées. Les clichés ont été enregistrés avec un grossissement  $\times 40\,000$  à 120 kV.

L'analyse des objets en MET a été effectuée manuellement. En effet les nanoparticules n'étant pas parfaitement sphériques, une mesure manuelle est plus précise qu'une mesure automatique. Aussi, la mesure manuelle d'un minimum de 300 objets par lot de NPo a permis de déterminer un diamètre moyen de  $32,4 \pm 4,1$  nm (**Table III 3** en fin de partie). Bien sûr, parmi les nombreuses synthèses réalisées certaines possédaient des tailles différentes, elles ont par conséquent été écartées pour la réalisation de ce travail. Il est à noter qu'une caractérisation précise de la taille donne accès à une détermination précise du coefficient d'extinction molaire associé et ainsi à une mesure précise de la concentration des solutions via la spectroscopie d'absorption UV-visible.

La longueur d'onde de résonance plasmonique dépend de différents paramètres comme la nature du métal, la taille et la forme de la particule, les propriétés diélectriques du substrat et du milieu environnant et les interactions inter-particules. Il est alors possible en faisant varier ces paramètres de balayer toutes les longueurs d'onde du domaine du visible, voire même de déplacer la résonance plasmonique dans le proche infrarouge. Comme nous l'avons vu dans la **partie II.B.1.b**, la spectroscopie UV-visible nous donne accès à une estimation de la taille des NPo, à leur concentration et enfin à une vérification de la qualité de la synthèse (état d'agrégation, monodispersité). En premier lieu, la position de la bande plasmon dépend de la taille des NPo. En effet, la théorie de Mie prévoit une augmentation de la longueur d'onde d'absorption correspondant à la bande plasmon avec la taille des nanoparticules. Ce phénomène a été reporté par plusieurs équipes dans la littérature. Aussi nous avons tracé, **Figure III 2**, la position du maximum d'absorption en fonction du diamètre des NPo pour différents travaux.



**Figure III 2 :** Relation entre le diamètre des NPo et la longueur d'onde de résonance plasmonique. Différents travaux de la littérature et nos mesures sont superposés sur le graphe [Brun, 2009a; Gilles, in preparation; He, 2005; Link, 1999b; Nath, 2004].

Les résultats montrent que nos points expérimentaux sont en bon accord avec d'autres travaux de la littérature [Brun, 2009a; He, 2005; Link, 1999a; Nath, 2004]. Nous constatons également une relation linéaire entre le maximum de la bande plasmon des nanoparticules d'or et leur diamètre entre 0 et 100 nm.

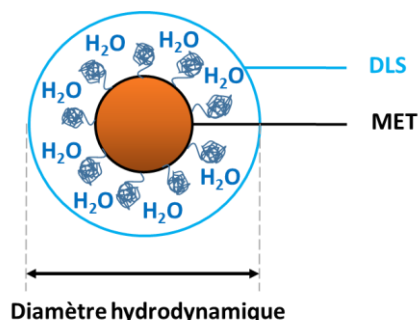
La spectroscopie UV-visible est une technique moins précise que la MET en ce qui concerne la détermination de la taille des nanoparticules. Cependant, c'est une technique moins coûteuse et plus facile d'accès, elle reste donc une technique de choix pour estimer la taille après une nouvelle synthèse, ou effectuer un suivi temporel (taille, état d'agrégation). L'utilisation de la spectroscopie à des fins quantitatives sera développée dans la **partie II.A.5**.

### 3. Caractérisation du recouvrement

#### a. Diffusion dynamique de la lumière

La mise en place de cette technique nécessite un protocole rigoureux afin d'obtenir des mesures fiables et reproductibles. Cette préoccupation a fait l'objet d'un travail précédent [Gilles, 2012] dans lequel de nombreux paramètres ont été testés et optimisés (concentration de l'échantillon, position de la lentille de détection, etc...). Ainsi, nous avons réalisé ces mesures sur des échantillons de NPo à 0,8 nM dans des cuves de 100  $\mu$ L. La position de la lentille de détection a été fixée à 4,65 mm de sorte que la mesure soit effectuée au centre de la cuve afin de limiter les effets de bords. Enfin, l'atténuation du faisceau laser a été configurée

en mode automatique. Trois séries d'une vingtaine de mesures ont été effectuées par échantillon et chaque échantillon a été analysé un minimum de 2 fois.



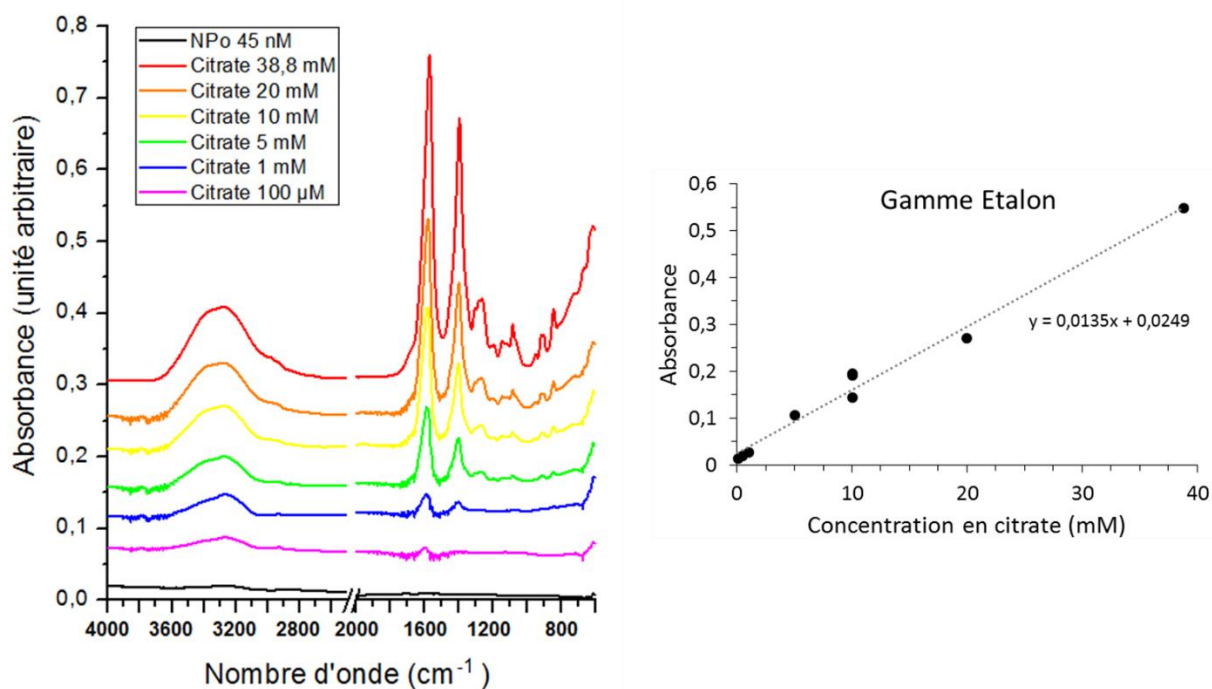
**Figure III 3 :** Schématisation du diamètre hydrodynamique et des mesures faites en MET et en DLS.

La DLS est une technique complémentaire de la MET et de la spectroscopie d'absorption UV-visible qui donne accès au diamètre hydrodynamique. Le diamètre hydrodynamique comprend à la fois le cœur d'or mais également la couche de solvatation de la nanoparticule ainsi que son recouvrement. Par conséquent, le diamètre mesuré en DLS est plus grand que celui mesuré en MET (**Figure III 3, Table III 3**). Pour des NPo non fonctionnalisées, l'analyse DLS donne une mesure de  $43,0 \pm 2,8$  nm. Comparativement, la mesure en MET donnait une valeur de  $32,4 \pm 4,1$  nm, soit une différence d'une dizaine de nm (moyennes sur 28 lots de NPo). Cette différence observée entre les deux types d'analyses constitue une mesure de la couche de solvatation des NPo. Bien que les NPo soient rigoureusement lavées après synthèse, cette couche de solvatation peut également contenir des molécules de citrate et/ou d'acétone dicarboxylate résiduelles de la synthèse. Il serait donc intéressant de quantifier cette éventuelle quantité de citrate résiduelle.

### b. FTIR

De façon à obtenir des informations quantitatives concernant la quantité de citrate résiduelle en surface des NPo après lavages, ou, plus généralement le nombre de ligands greffés après fonctionnalisation, la spectroscopie infrarouge FTIR a été utilisée [Daniel, 2014; Zhou, 2010]. Cette technique quantitative exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences de vibrations spécifiques. Nous nous sommes intéressés aux modes d'étirements  $\nu_{C=O}$  des ions carboxylates, puisque c'est une des vibrations les plus intenses en infrarouge, dont le maximum est détecté aux alentours de  $1570 \text{ cm}^{-1}$ . Le nombre de molécules de citrate présent en surface des NPo a été établi en comparant les intensités des spectres infrarouge des NPo et ceux d'une gamme étalon réalisée avec des solutions de citrate de concentrations croissantes enregistrée dans les mêmes conditions (**Figure III 4**). La gamme de concentrations de la courbe d'étalonnage utilisée variait entre  $100 \mu\text{M}$  et  $38,8 \text{ mM}$  de citrate. Une concentration minimale de  $100 \mu\text{M}$  détectable et quantifiable en FTIR a

été identifiée. Par ailleurs, le spectre enregistré pour une concentration de 45 nM en NPo n'a donné lieu à aucun signal caractéristique des molécules de citrate. Cela représente moins de 2000 molécules de citrates qui pourraient rester en surface des NPo après lavage. Cette valeur est petite compte tenu de la surface des NPo qui est de  $3217 \text{ nm}^2$  pour un diamètre de 32 nm. Par ailleurs, cette valeur est cohérente avec celle obtenue par Rostek *et al.* par analyse élémentaire [Rostek, 2011]. En effet pour des NPo non lavées, l'analyse élémentaire a révélé 3,1 molécules de citrate par  $\text{nm}^2$  soit environ 10000 molécules de citrate pour des NPo de 32 nm de diamètre. Ceci nous assure de l'efficacité des lavages effectués.



**Figure III 4** : A gauche: Spectres FTIR des NPo non-fonctionnalisées et de la gamme de calibration. Les valeurs d'absorbance obtenues ont été soumises à un déplacement arbitraire sur l'axe des ordonnées. A droite: courbe de calibration correspondante (à droite) entre 100  $\mu\text{M}$  et 38,8 mM pour le pic à  $1570 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4. Caractérisation de la charge des nanoparticules d'or

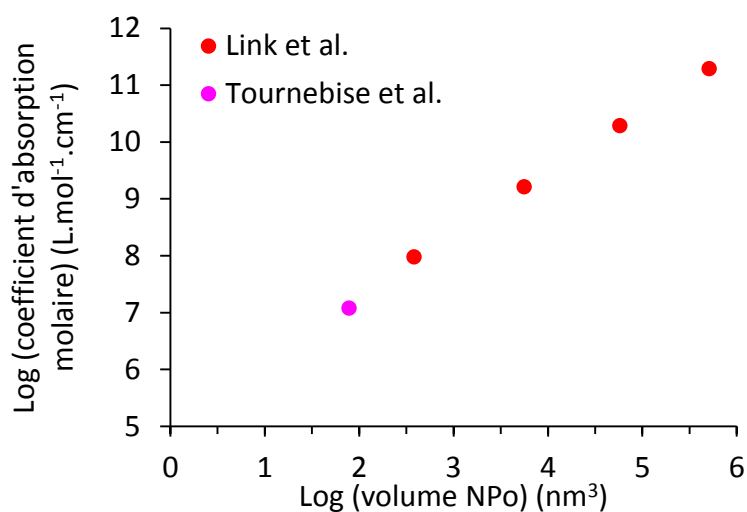
La mesure du potentiel zêta a été effectuée pour chaque type de NPo dans l'eau (**Table III 3**). Pour des NPo non fonctionnalisées, une valeur de  $-53 \pm 5 \text{ mV}$  est obtenue en accord avec les valeurs publiées dans la littérature [Doane, 2012]. Cette charge négative obtenue peut être due aux anions carboxylate résiduels en surface des NPo [Sandroff, 1985; Thompson, 1992; Weitz, 1985], ou bien à la dissociation du dioxygène en surface des NPo donnant lieu à  $\text{Au-O}^-$  [Pfeiffer, 2014]. Notons ici que le pH de toutes les solutions de NPo a été mesuré et est égal à 4,5, la présence d'ions carboxylate est donc tout à fait plausible.



## 5. Détermination de la concentration en nanoparticules d'or

Afin de travailler de manière quantitative, il est essentiel de connaître précisément la concentration de nos solutions de nanoparticules. Usuellement au laboratoire, la concentration en nanoparticules est déterminée par absorption UV-visible et application de la loi de Beer Lambert.

La **Figure III 5** représente les valeurs du logarithme des coefficients d'absorption molaire répertoriés dans la littérature en fonction du logarithme du volume des nanoparticules d'or.



**Figure III 5** : Dépendance du logarithme du coefficient d'absorption molaire des NPo en fonction du logarithme de leurs volumes. Cette figure regroupe différents travaux de la littérature [Link, 1999a; Tournebise, 2010].

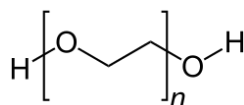
Ce graphe nous permet d'extraire la relation entre la taille des nanoparticules et leur coefficient d'absorption molaire. Aussi pour des nanoparticules de 32 nm de diamètre, le coefficient d'extinction molaire correspondant est de  $3,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Dans cette première partie, nous nous sommes attachés à la caractérisation des NPo non fonctionnalisées. Nous allons à présent développer la caractérisation des NPo fonctionnalisées.

## B. Caractérisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées

### 1. Fonctionnalisation de nanoparticules d'or

Les applications thérapeutiques des NPo ne peuvent être envisagées que si les nano-objets sont fonctionnalisés. En effet, il est souvent nécessaire d'assurer leur stabilité en milieu biologique, pour les rendre furtives, les adresser à la tumeur ou encore afin de les utiliser comme vecteurs de médicaments. La réalisation d'une étude quantitative et fiable nécessite la préparation de plusieurs types de NPo dont la concentration et la fonctionnalisation sont bien définies. Dans cette étude nous souhaitons, entre autres, quantifier l'impact de la fonctionnalisation sur l'effet radiosensibilisateur en dosant les espèces radicalaires produites en présence de NPo. Pour ce faire, nous avons synthétisé six types de nano-objets: les NPo non-fonctionnalisées précédemment décrites et établies comme référence, deux NPo fonctionnalisées avec du PEG (**Figure III 6**) de poids moléculaires 1000 et 4000 g.mol<sup>-1</sup> (NPo@PEG<sub>1000</sub> et NPo@PEG<sub>4000</sub>), deux NPo fonctionnalisées avec un PEG thiolé de masse moléculaire 3500 g.mol<sup>-1</sup> et deux terminaisons différentes (NPo@PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> et NPo@PEG<sub>3500</sub>-COOH), un type de NPo revêtu d'albumine sérique humaine (NPo@HSA).



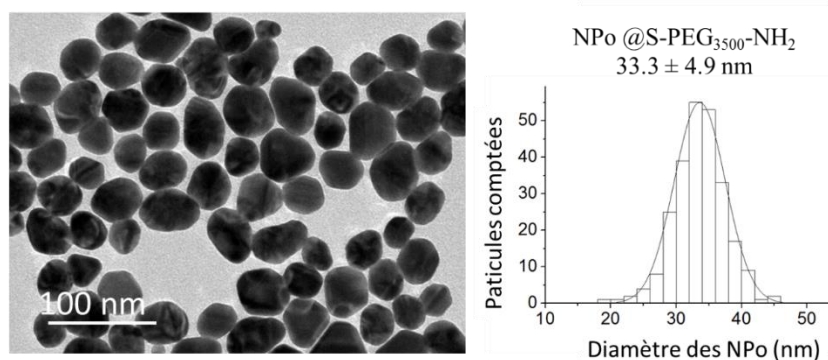
**Figure III 6** : Formule chimique du polyéthylène glycol (PEG). *n* représente le nombre de monomères.

En vue d'améliorer le temps de vie des NPo au sein du système de circulation sanguine, le PEG est de loin la fonctionnalisation la plus utilisée [Jokerst, 2011]. De plus, compte tenu de la force d'interaction entre le soufre et l'or, les PEG thiolés sont souvent choisis comme ligands. Néanmoins, les thiols sont connus pour être de bons capteurs de radicaux hydroxyle. Aussi, nous avons comparé dans notre étude, les NPo fonctionnalisées avec des PEG non thiolés et des PEG thiolés. Nous avons également varié la charge globale des nanoparticules : les PEG<sub>1000</sub> et PEG<sub>4000</sub>, neutres ne devraient pas apporter de charge supplémentaire aux nanoparticules. Dans le cas des HS-PEG<sub>3500</sub>-COOH, une charge négative due à la présence d'anions carboxylate ou une forme neutre pourraient être observées en fonction du pH des solutions. Les HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> devraient quant à eux apporter une charge positive aux NPo. En résumé, nous avons choisi un panel de ligands de type PEG avec trois masses moléculaires, deux types de greffage et des charges différentes. Nous avons également choisi un ligand de type protéique : la HSA. Il s'agit de la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin, puisqu'elle représente plus de 50% des protéines qui le composent. Lorsqu'une nanoparticule est introduite dans un fluide biologique, elle se recouvre alors d'une couronne de protéines contenant notamment de la HSA

[Dobrovolskaia, 2009]. La HSA a ainsi été choisie comme une fonctionnalisation d'intérêt dans cette étude, en effet, elle nous permet de mimer le milieu de culture cellulaire.

## 2. Caractérisation du recouvrement

Comme précédemment décrit, le diamètre des NPo a soigneusement été déterminé par MET et un cliché de NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> est présenté **Figure III 7**. L'analyse d'un minimum de 300 objets par lot de NPo a conduit à des diamètres moyens compris entre  $31,2 \pm 3,6$  nm pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH et  $33,3 \pm 4,9$  nm pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub>, les NPo non fonctionnalisées ayant un diamètre de  $32,4 \pm 4,1$  nm (**Table III 3**). Dans la suite de ce travail, nous considérerons donc que tous les types de NPo synthétisés possèdent la même taille de cœur d'or avec des distributions comparables.

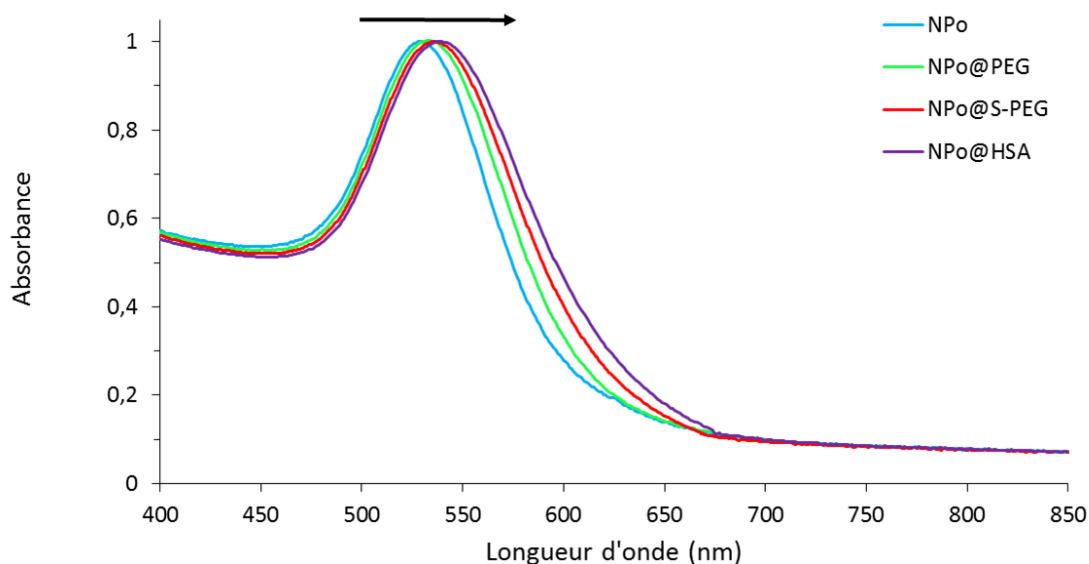


**Figure III 7 :** Cliché de microscopie électronique et distribution de NPo fonctionnalisées avec du HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub>. Les clichés ont été enregistrés avec un grossissement x 40 000 à 120 kV.

### a. Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visible des NPo présentent une bande plasmon bien définie avec un maximum à 531 nm dans le cas des NPo non-fonctionnalisées. La position de la résonance plasmonique est en accord avec un diamètre d'environ 32 nm. Sans surprise, lorsque l'on fonctionnalise, on observe un effet bathochrome [Ghosh, 2004; Mulvaney, 1996], soit un décalage de la bande plasmon vers les hautes longueurs d'onde (**Figure III 8, Table III 3**). En effet, la résonance plasmonique dépend de l'environnement des NPo, elle est affectée par les interactions avec la surface d'or. Par exemple, pour les NPo@HSA, un déplacement vers le bleu de 6 nm est observé en accord avec la littérature [Goy-López, 2012]. Pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>, le déplacement bathochrome est particulièrement notable avec une longueur d'onde

plasmon de 535 nm, probablement en raison de la forte interaction entre la fonction thiol et la surface d’or [Daniel, 2003; Hakkinen, 2012]. Ces déplacements caractéristiques nous donnent une indication confirmant la fonctionnalisation des NPo. Cependant, nous souhaitons avoir accès à l’épaisseur du recouvrement et à la quantité de ligands greffés: nous avons donc réalisé des analyses en DLS et FTIR.



**Figure III 8:** Spectres d’absorption UV-visible normalisés des nanoparticules fonctionnalisées. Les spectres des NPo@PEG1000 et des NPo@PEG4000 (NPo@PEG) d’une part et des NPo@S-PEG3500-NH<sub>2</sub> et NPo@S-PEG3500-COOH (NPo@S-PEG) d’autre part sont identiques.

### b. Diffusion dynamique de la lumière

Les résultats présentés dans la **Table III 1** donnent les valeurs des diamètres hydrodynamiques obtenus par mesure DLS pour tous les types de NPo fonctionnalisées. Le diamètre hydrodynamique comprenant à la fois le diamètre de la nanoparticule mais également sa fonctionnalisation et sa couche de solvatation, les différences observées entre les diamètres hydrodynamiques des NPo non-fonctionnalisées et fonctionnalisées fournissent une mesure de l’épaisseur des recouvrements. Cette dernière varie entre environ 2 nm pour les NPo@PEG<sub>1000</sub> et 12 nm pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> (**Table III 1**).

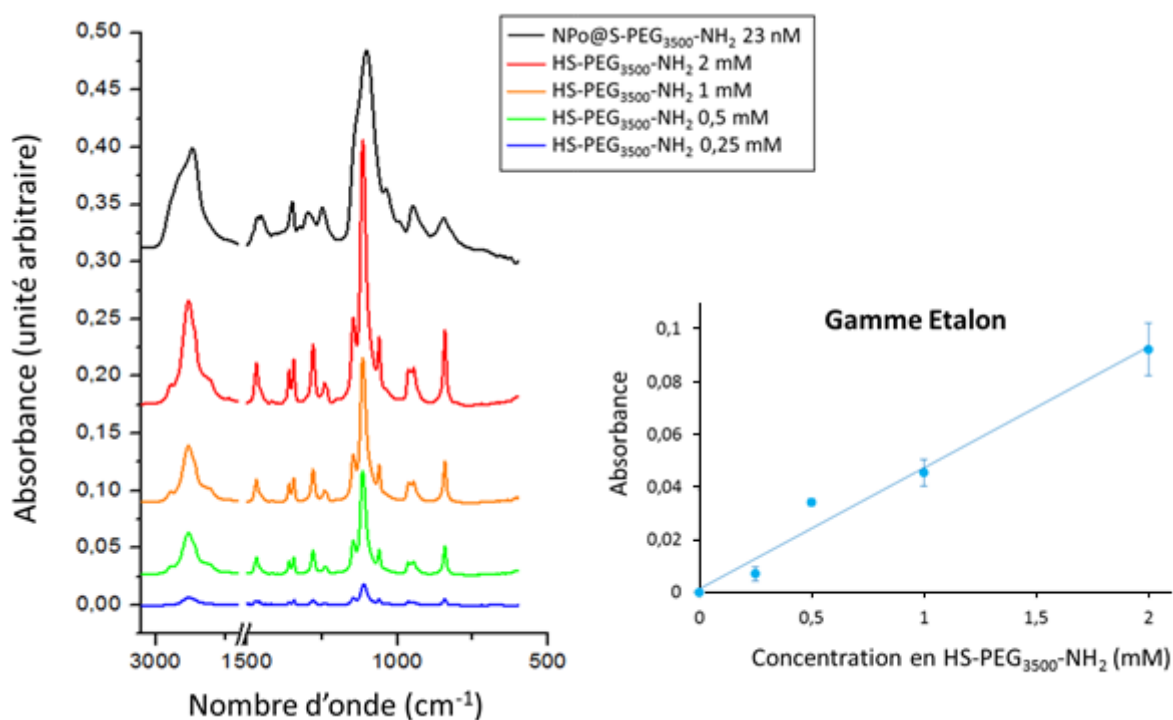
	NPo	NPo@PEG <sub>1000</sub>	NPo@PEG <sub>4000</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	NPo@HSA
Diamètre hydrodynamique (nm)	43,0 ± 2,8	47,6 ± 3,9	46,8 ± 2,7	66,6 ± 0,5	61,6 ± 1,7	58,9 ± 2,5
Épaisseur du recouvrement (nm)	0	2,3 ± 2,9	1,9 ± 2,9	11,8 ± 0,5	9,3 ± 0,3	8 ± 0,7

**Table III 1 :** Diamètres hydrodynamiques et épaisseurs des recouvrements des NPo fonctionnalisées.

Ces données donnent confirment la fonctionnalisation effective des NPo et seront corrélées à celles obtenues par les autres techniques de caractérisation dans le **chapitre III.B.4.** afin de donner une vision précise d'ensemble des caractéristiques des nanoparticules synthétisées.

### c. FTIR

Pour des NPo fonctionnalisées, il était essentiel de s'intéresser à la quantité de ligands constituant le recouvrement de chaque type de NPo. Comme précédemment pour l'estimation de la quantité de citrate résiduelle en surface des NPo, la spectroscopie infrarouge FTIR a été utilisée pour déterminer le nombre de ligands présents à la surface des NPo. Pour cette étude, quel que soit le ligand, nous nous sommes focalisés sur la région caractéristique des modes d'étirements des C-H alkyles  $\nu_{\text{CH}_3}$  et  $\nu_{\text{CH}_2}$  entre  $2750$  et  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . Nous avons utilisé des gammes d'étalonnage de concentrations comprises entre  $0,125$  et  $2 \text{ mM}$  pour tous les PEG et entre  $15$  et  $50 \mu\text{M}$  pour la HSA. Dans la **Figure III 9** sont représentés à titre d'exemple les résultats obtenus pour les  $\text{NPo@S-PEG}_{3500}\text{-NH}_2$ . A noter que pour les nanoparticules PEGylées, une quantification complémentaire a été effectuée avec les modes d'étirements des groupes éther  $\nu_{\text{C-O}}$  entre  $1000$  et  $1200 \text{ cm}^{-1}$  (avec un maximum à  $1113 \text{ cm}^{-1}$ ). Les deux analyses sont cohérentes.



**Figure III 9 :** Quantification par spectroscopie infrarouge du nombre de ligands  $\text{HS-PEG}_{3500}\text{-NH}_2$ . Gauche: Spectres FTIR des  $\text{NPo@S-PEG}_{3500}\text{-NH}_2$  et spectres de la gamme de calibration. Droite: Courbe de calibration correspondante (à droite) entre  $0,25$  et  $2 \text{ mM}$ . Les valeurs d'absorbance obtenues ont été soumises à un déplacement arbitraire sur l'axe des ordonnées.

	NPo@PEG <sub>1000</sub>	NPo@PEG <sub>4000</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	NPo@HSA
Nombre de ligands par NPo	8940 ± 1560	6240 ± 110	57300 ± 7770	20100 ± 820	1400 ± 440

**Table III 2 :** Nombre de ligands par NPo déterminé par spectroscopie FTIR. Les valeurs données sont les moyennes et écarts types de 3 expériences indépendantes.

Ces analyses nous permettent d'estimer assez précisément le nombre de ligands par NPo qui sont répertoriés dans la **Table III 2**. Les résultats montrent que le nombre de molécules de PEG<sub>1000</sub> et PEG<sub>4000</sub> à la surface des NPo sont comparables. Nous constatons par contre la grande différence des nombres de molécules greffées à la surface des NPo@PEG et des NPo@S-PEG. En effet, on compte trois fois plus de HS-PEG<sub>3500</sub>-COOH et près de dix fois plus de HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> que de PEG<sub>4000</sub>. Concernant les NPo@HSA, environ 1400 protéines par nanoparticule sont dénombrées. Compte tenu de ces chiffres et de l'épaisseur du recouvrement, nous sommes en mesure de calculer le nombre de molécules ou d'atomes par unité de surface des NPo ou de volume de la couronne de fonctionnalisation, et donc d'extraire une densité atomique et moléculaire (**Table III 3**).

#### d. Zétamétrie

La mesure du potentiel zêta a été effectuée pour chaque type de NPo fonctionnalisée et les valeurs moyennes obtenues pour toutes les synthèses sont reportées **Table III 3**. Moyennant les barres d'erreurs, les valeurs de potentiels zêta obtenues sont très similaires, que les NPo soient fonctionnalisées ou non (en moyenne -50 mV), hormis pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub>. En effet, la valeur du potentiel zêta pour ce type de NPo est positive et égale à  $17 \pm 10$  mV en raison des charges positives apportées par le groupement fonctionnel NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en solution aqueuse à pH 4,5. Cette mesure positive nous permet encore de confirmer la fonctionnalisation des NPo et confirme l'ancrage du HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> à la surface des NPo réalisé majoritairement via les soufres. Autrement dit, la position extérieure des groupements amines est favorisée comme attendu en réalisant notre synthèse à 4°C [Xia, 2012].

### 3. Détermination de la concentration en nanoparticules d'or

De manière à réaliser une étude quantitative, la détermination précise de la concentration en NPo est nécessaire. Si la connaissance du coefficient d'absorption molaire par la littérature et la loi de Beer Lambert nous permettent de déterminer quotidiennement la concentration d'échantillons de NPo non

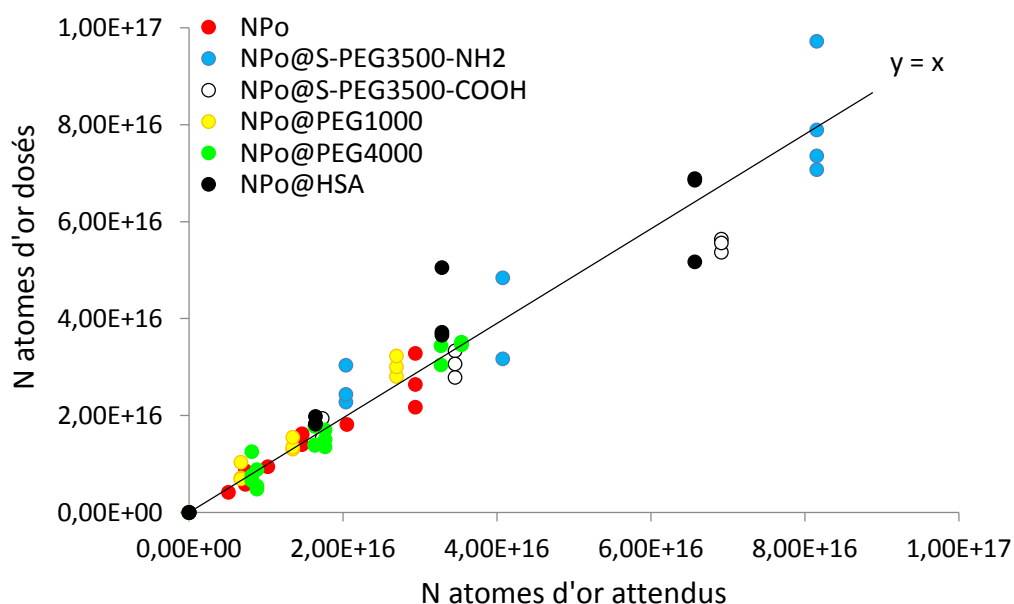
fonctionnalisées, ce coefficient demeure inconnu pour tous les autres types de nanoparticules synthétisées. Il nous était donc nécessaire de vérifier si la fonctionnalisation des nanoparticules d'or modifie cette valeur. Pour cela, nous avons quantifié la teneur en or de chaque type de nanoparticules. D'après les travaux de Tournebize *et al.* [Tournebize, 2010], nous avons dosé le nombre d'atomes d'or présents dans chaque type de nanoparticules et nous l'avons comparé au nombre d'atomes d'or attendus par le calcul en utilisant le coefficient d'absorption molaire des NPo non fonctionnalisées.

Nous avons calculé le nombre moyen d'atomes d'or attendu ( $N_{att}$ ) d'après l'équation :

$$N_{att} = [NPo] \times Na \times 59 \times \frac{4}{3} \pi r^3 \times V_{NPo} \quad \text{équation III 1}$$

Avec  $[NPo]$  la concentration en NPo en  $\text{mol.L}^{-1}$ ,  $Na$  le nombre d'Avogadro ( $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), 59 le nombre d'atomes d'or par  $\text{nm}^3$  [Kittel, 1996],  $r$  le rayon moyen des NPo déterminé par MET en nm et  $V_{NPo}$  le volume de nanoparticules concentrées utilisé pour le dosage en L.

Enfin, le nombre d'atomes d'or dosés ( $N$ ) est calculé par comparaison avec une courbe d'étalonnage obtenue par dosage de solutions étalon de  $\text{KAuCl}_4$ . Si  $N_{att}$  et  $N$  sont les mêmes, le coefficient d'absorption molaire est le même pour tous les types de NPo. Nous avons donc réalisé cette expérience pour tous les types de NPo fonctionnalisées.



**Figure III 10** : Détermination du nombre d'atomes d'or dosés en fonction du nombre d'atomes attendus pour chaque type de NPo fonctionnalisées.

Les valeurs des nombres d'atomes d'or dosés et attendus sont similaires. En effet, la **Figure III 10** montre que les points se répartissent uniformément autour d'une droite de pente 1. Compte tenu de la dispersion des points et de la précision relative du dosage, nous considérerons à l'avenir que la fonctionnalisation des NPo n'a pas d'impact sur leur coefficient d'extinction molaire. La valeur prise en compte dans cette étude est donc  $\epsilon_{\lambda} = 3,9 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour des nanoparticules de 32 nm de diamètre. Ce coefficient a été ajusté pour chaque synthèse en fonction de la taille précise des NPo déterminée en MET.

#### 4. Discussion

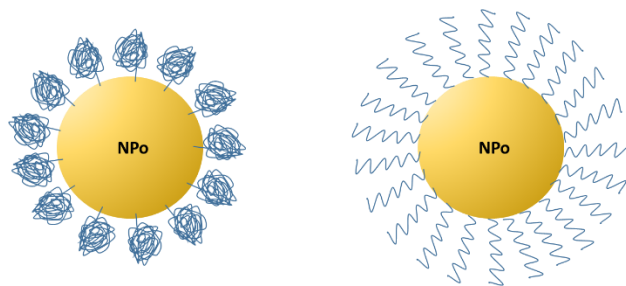
Au cours de ce travail, nous avons synthétisé des NPo de 32 nm de diamètre pour ce qui est du cœur d'or. Nous avons ensuite fonctionnalisé ces NPo avec différents recouvrements polymériques ou protéiques. Dans cette étude, 28 lots de NPo ont été réalisés pour les NPo non fonctionnalisées, une dizaine de lots par type de NPo fonctionnalisées. Nous nous sommes assurés, tout au long de ce travail, de la reproductibilité et de la qualité de nos synthèses. En effet, les valeurs indiquées correspondent aux moyennes et écarts types de tous ces lots.

Les molécules de PEG<sub>1000</sub> et de PEG<sub>4000</sub> possèdent respectivement 22 et 88 monomères dans leur chaîne polymérique. Cependant l'épaisseur de leurs recouvrements est identique, d'environ 2 nm d'après les mesures de DLS. A partir des expériences de spectroscopie infrarouge, nous avons déterminé le nombre de molécules de PEG par nanoparticule (**Table III 3**), respectivement 8940 et 6240 molécules pour les PEG<sub>1000</sub> et PEG<sub>4000</sub>. On peut donc conclure que la fonctionnalisation par le PEG<sub>4000</sub> est près de quatre fois plus dense que celle du PEG<sub>1000</sub> avec des densités atomiques respectives de 365 et 107 atomes.nm<sup>-3</sup>. En ce qui concerne les NPo@S-PEG, l'épaisseur du recouvrement est plus grande que celle obtenue dans les cas des NPo@PEG. Ces valeurs d'épaisseur déterminées en DLS sont respectivement de 11,8 et 9,3 nm pour les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> et NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH en accord avec la littérature [Rahme, 2013; Walkey, 2011]. Ces mesures suggèrent ainsi un greffage de type *brush* (**Figure III 11**) car la longueur de la chaîne polymérique (PEG<sub>3500</sub>) est de l'ordre de grandeur de l'épaisseur du recouvrement. Compte tenu de l'épaisseur du recouvrement de 2 nm, les PEG<sub>4000</sub> adoptent probablement un greffage de type *mushroom* (**Figure III 11**) à la surface des NPo. C'est également le cas pour les PEG<sub>1000</sub> dont l'épaisseur du recouvrement est en accord avec un rayon de Flory<sup>4</sup> de 2,2 nm [Jokerst, 2011].

---

<sup>4</sup> Le rayon de Flory est le rayon minimal d'une sphère dans laquelle le polymère libre en solution peut être contenu.





**Figure III 11** : Schéma des greffages de ligands de types mushroom (à gauche) et brush (à droite).

La densité de greffage des NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> est deux fois plus grande que celle des NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH. Ainsi le groupement terminal a une influence sur la densité de greffage à la surface des nanoparticules comme déjà reporté par d'autres équipes [Maus, 2009]. Au départ, nous souhaitons comparer l'impact de la charge du recouvrement en étudiant les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> qui sont chargées positivement et les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH chargées négativement. Cependant, la fonction terminale du PEG influe sur la densité du recouvrement et ne nous permettront donc pas de quantifier l'impact de la charge des NPo dans la suite de cette étude.

Concernant le diamètre hydrodynamique obtenu pour les NPo@HSA, la valeur obtenue de  $58,9 \pm 2,5$  nm correspond à une épaisseur de revêtement de 8 nm (Table III 3). Ce résultat est en accord avec les travaux de Khan *et al.* qui ont reporté une augmentation du diamètre de 18 nm pour des NPo citrate de 40 nm fonctionnalisées avec de la HSA [Khan, 2013]. Nos mesures en spectroscopie infrarouge nous permettent d'estimer le nombre de HSA par NPo à  $1400 \pm 440$ . Ce résultat est en accord avec l'étude de Goy-López *et al.* qui ont déterminé par titration calorimétrique isotherme (ITC) un nombre de  $1279 \pm 478$  HSA par NPo pour des nanoparticules de 40 nm de diamètre [Goy-López, 2012]. D'après le calcul du volume du recouvrement et du nombre de protéines, nous pouvons calculer un volume occupé par chaque protéine de  $47 \text{ nm}^3$  à la surface des NPo. Sur la base de la structure de la HSA publiée par He *et al.* [He, 1992], cette valeur est deux fois plus petite que le volume de la HSA libre en solution, ce qui suggère que la structure des protéines pourraient être modifiée à la surface des NPo comme reporté pour d'autres protéines [Deng, 2011]. Cela est corroboré par nos spectres infrarouge qui présentent une nouvelle bande amide I à  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , témoignant d'un changement de la structure secondaire de la HSA lors de son interaction avec les NPo, en accord avec les observations de Goy-López *et al.* [Goy-López, 2012].

Ci-après, la **Figure III 12** illustre les différentes techniques complémentaires utilisées et la **Table III 3** rassemble toutes les données obtenues lors de la caractérisation des NPo.

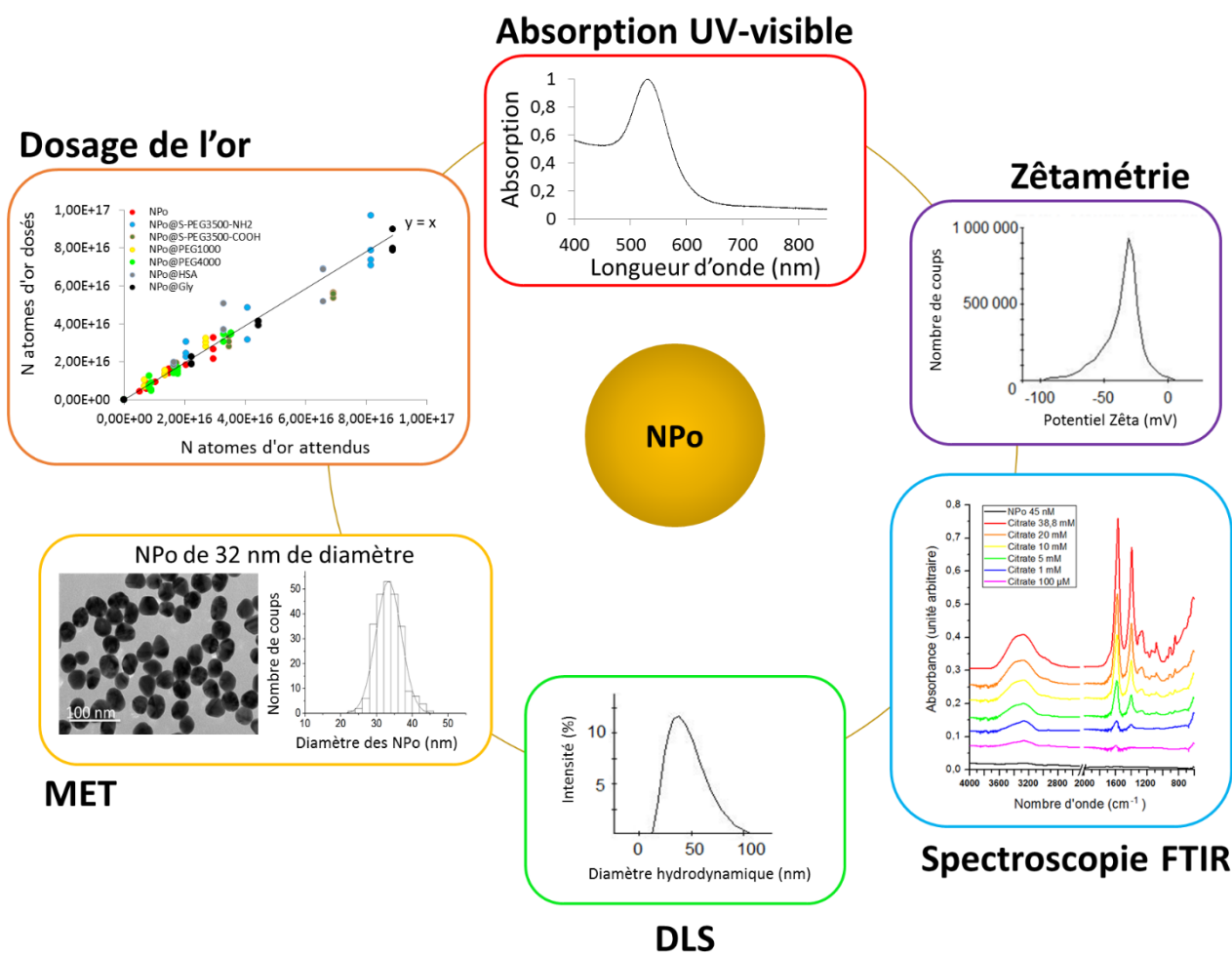


Figure III 12 : Récapitulatif des différentes techniques utilisées pour la caractérisation des NPO : taille (MET, DLS), charge (potentiel zéta), recouvrement (DLS, spectroscopie FTIR) et concentration (dosage de l'or, spectroscopie d'absorption UV-visible).

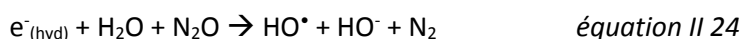
Une caractérisation aussi précise de tous les types de NPO était nécessaire à cette étude concernant l'impact de fonctionnalisation sur la production de radicaux hydroxyle, d'électrons et également sur l'effet radiosensibilisateur. Soulignons ici qu'il est rare de trouver une caractérisation aussi poussée dans la littérature alors que cette dernière est préconisée [Hinterwirth, 2013].

	NPo	NPo@PEG <sub>1000</sub>	NPo@PEG <sub>4000</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	NPo@HSA
Diamètre MET (nm)	32,4 ± 4,1	32,5 ± 5,2	31,8 ± 5,1	33,3 ± 4,9	31,2 ± 3,6	33,1 ± 5,8
Diamètre hydrodynamique (nm)	43,0 ± 2,8	47,6 ± 3,9	46,8 ± 2,7	66,6 ± 0,5	61,6 ± 1,7	58,9 ± 2,5
Epaisseur du recouvrement (nm)	0	2,3 ± 2,9	1,9 ± 2,9	11,8 ± 0,5	9,3 ± 0,3	8 ± 0,7
Longueur d'onde du plasmon (nm)	531,4	533,8	533,8	535	535	537
Potentiel Zêta (mV)	-53 ± 5	-48 ± 1	-51 ± 11	17 ± 10	-48 ± 2	-33 ± 12
Nombre de ligands par NPo		8 940 ± 1560	6 240 ± 110	57 300 ± 7 770	20 100 ± 820	1 400 ± 440
Volume du recouvrement (nm <sup>3</sup> )		14 840	12 040	80 756	113 042	65 359
Densité moléculaire (molécules/nm <sup>3</sup> )		0,8 ± 0,11	0,52 ± 0,08	0,51 ± 0,06	0,25 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Densité de recouvrement moléculaire (molécules/nm <sup>2</sup> )		2,8 ± 0,5	1,9 ± 0,3	17,8 ± 2,3	6,2 ± 0,3	0,4 ± 0,1
Nombre d'atomes (atomes)		1 581 672 ± 276 297	4 395 675 ± 710 640	35 338 058 ± 4 793 473	12 420 564 ± 506 760	12 709 098 ± 3 993 246
Densité de recouvrement atomique (atomes/nm <sup>3</sup> )		106 ± 19	365 ± 59	313 ± 43	154 ± 6	195 ± 61

**Table III 3 :** Caractéristiques des nanoparticules d'or étudiées dans ce travail. Cette table donne les diamètres moyens des coeurs d'or obtenus en MET pour chaque type de NPo et les diamètres hydrodynamiques obtenus en DLS. Pour chaque type de NPo, l'épaisseur du recouvrement a été obtenue par soustraction entre le diamètre hydrodynamique des NPo fonctionnalisées et non fonctionnalisées. Les longueurs d'onde d'absorption, le potentiel zêta et les données de quantification du nombre de ligands par spectroscopie FTIR sont également donnés. Les résultats présentés sont les moyennes et écarts types de plusieurs lots de NPo.

## C. Optimisation du dosage des radicaux hydroxyle en présence de nanoparticules d'or

Dans cette étude, nous souhaitons quantifier précisément les radicaux hydroxyle et des électrons produits en présence de NPo. Pour ce faire, nous quantifierons le radical hydroxyle par une méthode de dosage indirect par la coumarine que nous optimiserons en présence de NPo dans cette partie du manuscrit. En plus des radicaux hydroxyle, nous allons également quantifier l'électron avec la même méthode. Pour ce faire, nous avons utilisé la conversion de l'électron en radical hydroxyle selon sa réaction avec le protoxyde d'azote :



En quantifiant le radical hydroxyle sous différentes atmosphères ( $\text{N}_2$  et  $\text{N}_2\text{O}$  ; air et un mélange 79%  $\text{N}_2\text{O}$ /21%  $\text{O}_2$ ), nous avons accès à la quantité d'électrons et de radicaux hydroxyle sous atmosphère inerte et oxygénée. Au sein de cette partie C, nous insisterons sur l'ensemble des contrôles nécessaires à la validation de ce dosage. Ensuite, les parties D et E traiteront respectivement des quantifications des radicaux hydroxyle et des électrons. Nous étudierons alors l'impact du rayonnement (X ou gamma), l'influence de la quantité d'oxygène en solution, ainsi que l'impact de la variation de la force ionique par ajout de faibles quantités de sel. Nous étudierons également l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur ces productions radicalaires. Enfin, au sein de la partie F, nous discuterons de tous les résultats précédemment obtenus et proposerons un mécanisme de production de ces espèces radicalaires en présence de NPo.

Le premier objectif de ce travail était d'ordre méthodologique. En effet, il fallait d'abord d'établir un protocole de «référence» pour la quantification du radical hydroxyle en présence de NPo. Parmi les nombreux moyens de quantification des radicaux hydroxyle [Von Sontag, 2006], la coumarine a été choisie comme sonde pour un dosage indirect [Foley, 2004; Louit, 2005] car elle est compatible avec les NPo. En effet, la coumarine n'induit aucune agrégation des NPo puisqu'aucune modification de leur spectre d'absorption n'a été observée. De plus, cette méthode offre une détection par fluorescence qui est une technique très sensible permettant des détections en radicaux hydroxyle jusqu'à 30 nM [Louit, 2009]. La réaction d'oxydation de la coumarine par le radical hydroxyle se produit avec une constante de réaction  $k = 1,05 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Elle est donc très rapide et limitée que par la diffusion des espèces en solution. La capture du radical hydroxyle dans une solution de coumarine à 0,5 mM adviendra donc en  $\tau = 190 \text{ ns}$ , soit au cours de l'étape de chimie homogène de la radiolyse de l'eau pour laquelle nous aurons accès à la quantité de radicaux hydroxyle.

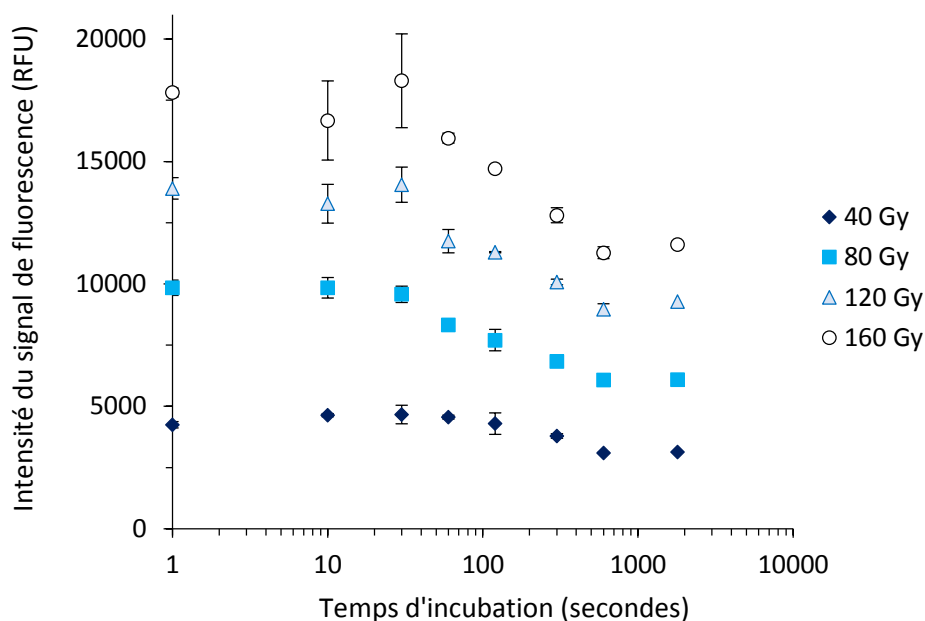
## 1. Décroissance du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en présence de nanoparticules

Un phénomène d'extinction du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine par les NPo avait déjà été observé pour la coumarine 152<sup>5</sup> [Fukushima, 2003] et la coumarine 153<sup>6</sup> [Ghosh, 2012]. Afin de réaliser une étude quantitative, il est nécessaire de vérifier si une telle décroissance peut avoir lieu dans les conditions de nos expériences. C'est pourquoi des échantillons de coumarine irradiée jusqu'à 160 Gy ont été incubés après irradiation avec 1 nM de NPo pendant différents temps. Une fois le temps d'incubation écoulé, le contact entre les nanoparticules et la 7-hydroxycoumarine a été stoppé par ajout d'une solution de sel à 10% (m/v) afin d'induire l'agrégation des NPo, puis les échantillons ont été centrifugés de manière à retirer les agrégats d'or de la solution. En effet, l'ajout de sel en solution stoppe le contact entre les NPo et la 7-hydroxycoumarine et donc le phénomène d'extinction de la fluorescence s'il a lieu. La **Figure III 13** décrit le signal de fluorescence détecté à environ 450 nm après irradiation avec des doses de 40, 80, 120 et 160 Gy, après différents temps d'incubation. Pour des temps d'incubation courts (moins de 40 s), 1 nM de NPo n'induit pas de modification de l'intensité de fluorescence. Cependant, au-delà de 40 secondes d'incubation, une diminution significative de l'intensité de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine est observée conduisant à un maximum de 30% de diminution dans la gamme de temps testée. Il y a donc bien extinction du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en présence de NPo. Pour obtenir des mesures quantitatives, il est donc nécessaire dans toutes les expériences ultérieures, que le temps de contact entre les NPo et la 7-hydroxycoumarine soit inférieur à 40 s, l'agrégation des NPo a donc été induite moins de 10 secondes après irradiation par ajout d'une solution de NaCl.

---

<sup>5</sup> Coumarine 152: 7-(diméthylamino)-4-(trifluorométhyl)coumarine

<sup>6</sup> Coumarine 153: 2,3,6,7-(tetrahydro)-9-(trifluorométhyl)-1*H*,5*H*-(quinolizino(9,1-*gh*))coumarine

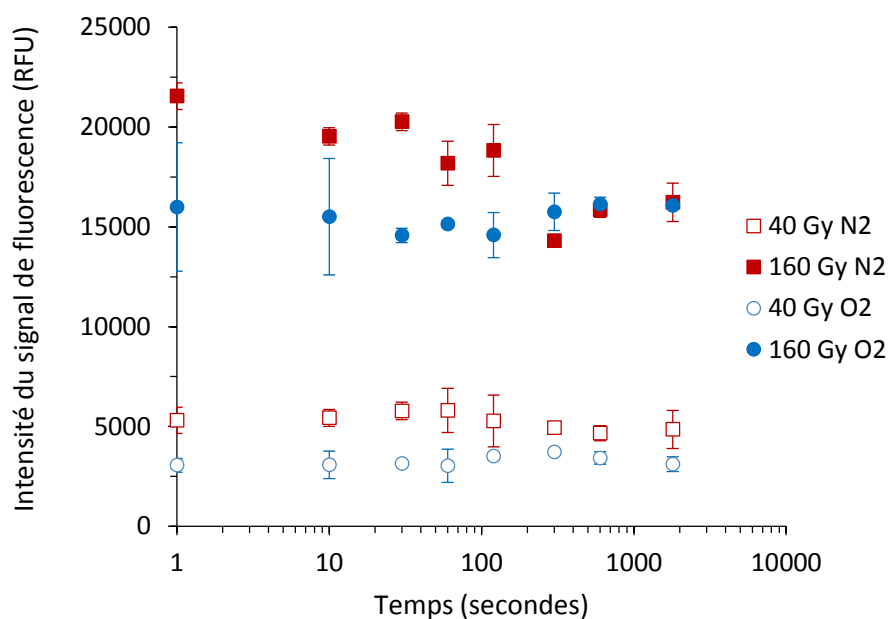


**Figure III 13 :** Influence du temps de contact entre NPo et 7-hydroxycoumarine sur le signal de fluorescence. Les incubations ont été réalisées jusqu'à 30 min après la mise en contact avec 1 nM de NPo. Les valeurs reportées sont les moyennes et barres d'erreur de trois expériences indépendantes.

En présence de NPo fonctionnalisées, et ce quelle que soit la fonctionnalisation, aucune décroissance du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine n'a été observée dans la gamme de temps et de doses sondées. Ces résultats suggèrent un rôle important de la surface des NPo dans ce phénomène de décroissance de la fluorescence. Possiblement, à la manière dont les NPo éteignent la fluorescence d'autres molécules [Dulkeith, 2002; Dulkeith, 2005], des transferts d'énergie (radiatif et non-radiatif) pourraient se produire entre la nanoparticule et la 7-hydroxycoumarine menant à la décroissance du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine. Notons ici que, même en l'absence de phénomène d'extinction, nous avons réalisé les expériences dans les mêmes conditions que pour des NPo non fonctionnalisées.

Nous avons également mesuré cette extinction en fonction de l'atmosphère (sous atmosphère inerte saturée en diazote et sous atmosphère saturée en dioxygène). Les échantillons de coumarine ont été mis à barboter sous l'atmosphère désirée pendant 1h. Les échantillons de coumarine ont ensuite été irradiés puis mis en contact avec les NPo et précipités par NaCl toujours sous atmosphère contrôlée. Les résultats obtenus sont présentés **Figure III 14** pour des doses de 40 et 160 Gy. Sous atmosphère inerte (saturée en diazote), le phénomène d'extinction de la fluorescence est visible à partir de temps d'incubation supérieurs à 40 secondes comme sous atmosphère aérée. Au-delà de 40 secondes d'incubation, là encore une diminution significative de l'intensité du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine est mise en évidence conduisant à un maximum de 30% de diminution.

Par contre, aucune modification de l'intensité du signal de fluorescence n'a été mise en évidence sous atmosphère saturée en dioxygène. Ce résultat est très surprenant car, en général, l'oxygène moléculaire est lui-même un « quencher » très efficace [Lakowicz, 1973a, 1973b]. Peut-être cela suggère-t-il une interaction particulière entre NPo et dioxygène analogue à un recouvrement? Ici encore, l'usage de temps d'incubation courts (moins de 40 s), assure la stabilité du signal de fluorescence quelle que soit la dose appliquée.

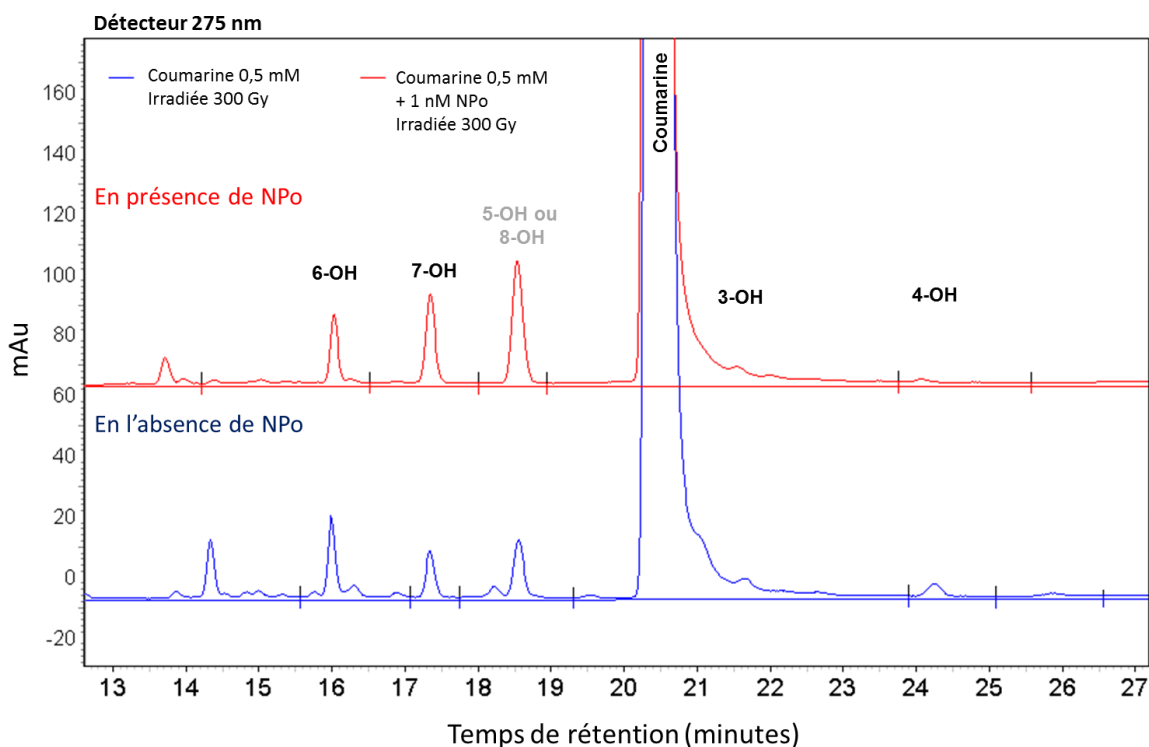


**Figure III 14 :** Influence du temps de contact entre NPo et la 7-hydroxycoumarine sur le signal de fluorescence sous différentes atmosphères. Les incubations ont été réalisées jusqu'à 30 min après la mise en contact avec 1 nM de NPo. Les valeurs reportées sont les moyennes et barres d'erreurs de trois expériences indépendantes.

## 2. Rendements en hydroxycoumarines : régiosélectivité

### a. Position du problème

Le radical HO<sup>•</sup> attaque la coumarine pour former 6 hydroxycoumarines (3-8), la 7-hydroxycoumarine étant le principal produit fluorescent de l'oxydation de la coumarine (**Figure II 12**). Afin de valider notre quantification en présence de nanoparticules, notre première préoccupation était de vérifier si la quantification des radicaux hydroxyle pouvait être réalisée de façon similaire en présence et en absence de NPo. Pour cela, une première étude par chromatographie en phase liquide couplée à une détection en absorbance a été réalisée. Nous avons comparé les profils chromatographiques des solutions irradiées de coumarine à 0,5 mM, en présence et en l'absence de nanoparticules d'or (**Figure III 15**). L'identification des produits d'oxydation de la coumarine au sein de nos profils HPLC a été réalisée par co-injection des standards de coumarines oxydées.



**Figure III 15 :** Profils chromatographiques (HPLC) de 0,5 mM de coumarine irradiée (300 Gy) en présence et en l'absence de 1 nM de NPo dans des conditions aérées.

Il apparaît que les allures des profils HPLC obtenus sont similaires puisque les mêmes coumarines oxydées sont présentes dans les deux conditions avec cependant des intensités différentes (**Figure III 15**). En effet, des augmentations significatives de l'intensité des 7 et 5/8 hydroxycoumarines sont observées en présence de nanoparticules. Par exemple, pour une dose d'irradiation de 300 Gy, la 7-hydroxycoumarine représente respectivement 26% et 19% de toutes les hydroxycoumarines formées avec et sans NPo (**Table III 4**). Ces observations témoignent du fait que les NPo perturbent la régiosélectivité d'attaque du radical hydroxyle sur la coumarine. Néanmoins, nous avons observé que cette régiosélectivité est indépendante de la concentration en NPo et de la dose d'irradiation dans les gammes étudiées. Il est important de comprendre qu'une comparaison directe entre l'intensité des signaux de la 7-hydroxycoumarine obtenus dans l'eau et à une concentration en NPo, ne peut pas être utilisée pour déterminer le rendement de formation du radical hydroxyle. Cependant, la mesure de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en nanoparticules nous permettra d'extraire la production de radicaux hydroxyle en présence de NPo.

De manière à quantifier les électrons en solution, nous avons quantifié les radicaux hydroxyle en présence de NPo sous différentes atmosphères ( $N_2$ ,  $N_2O$ , air,  $N_2O/O_2$  79:21,  $O_2$ ). Aussi la **Figure III 16** représente l'impact de l'atmosphère environnante sur la régiosélectivité d'hydroxylation de la coumarine en présence et en



l'absence de 1 nM de NPo. Outre les différences déjà abordées précédemment en présence et en l'absence de NPo, les deux conditions révèlent deux types de profils : les profils en présence de dioxygène (air, N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) et les profils dans des conditions désoxygénées (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O). Tous les résultats détaillés ci-après sont valables en présence ou non de NPo. Tout d'abord, les résultats montrent que les profils obtenus sous atmosphères aérée (air) ou saturée en dioxygène (O<sub>2</sub>) sont identiques. Sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O), les profils sont très différents de ceux réalisés dans des conditions oxygénées (air, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>). En effet, les rendements en 7-hydroxycoumarine représentent respectivement environ 25% et 35% de toutes les hydroxycoumarines formées en présence et en absence de NPo (**Table III 4**).

% d'hydroxycoumarine formée	6-OH	7-OH	5/8-OH	3-OH	4-OH
<b>Air</b>					
sans NPo	26	19	26	19	11
avec NPo	20	26	39	11	4
<b>N<sub>2</sub></b>					
sans NPo	17	27	16	19	21
avec NPo	16	35	31	15	3
<b>N<sub>2</sub>O</b>					
sans NPo	28	25	17	17	13
avec NPo	19	35	23	21	3

**Table III 4** : Pourcentages d'hydroxycoumarines formées sous différentes atmosphères avec et sans NPo.

Les quantifications montrent également que les rendements en hydroxycoumarines sont doublés sous atmosphère N<sub>2</sub>O comparativement à une atmosphère inerte (N<sub>2</sub>). Ces observations sont cohérentes avec le fait que sous N<sub>2</sub>O les électrons sont convertis en HO<sup>•</sup> augmentant ainsi la quantité en radicaux hydroxyle par rapport à celle obtenue sous atmosphère inerte. Notons que les deux chromatogrammes (N<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>O) ont des allures très similaires, en témoignent les proportions similaires d'hydroxycoumarines formées dans les deux cas (**Table III 4**). De la même manière, les profils réalisés sous air et N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> sont également très semblables, les rendements étant à nouveau doublés sous atmosphère N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> comparativement à une atmosphère aérée.

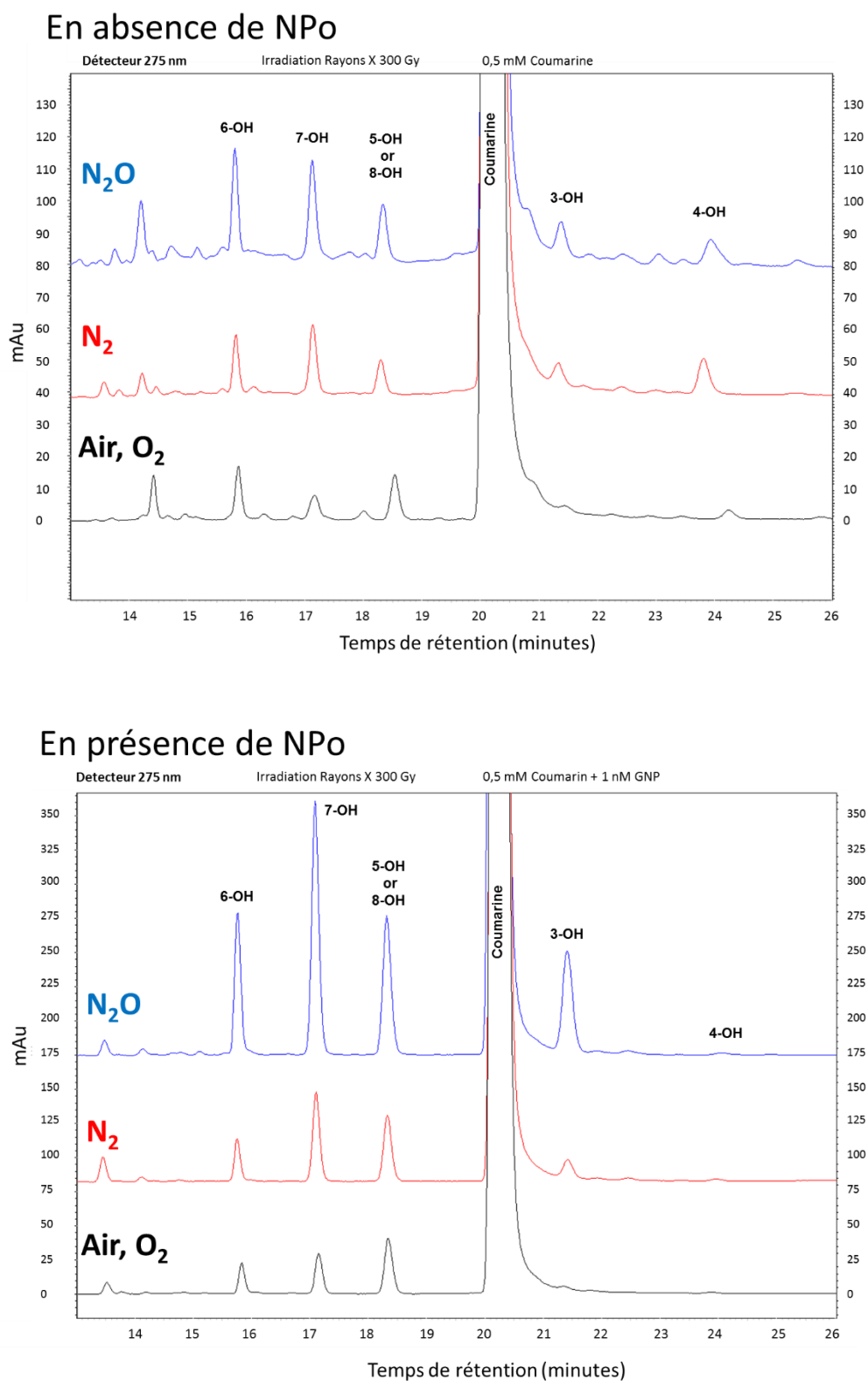
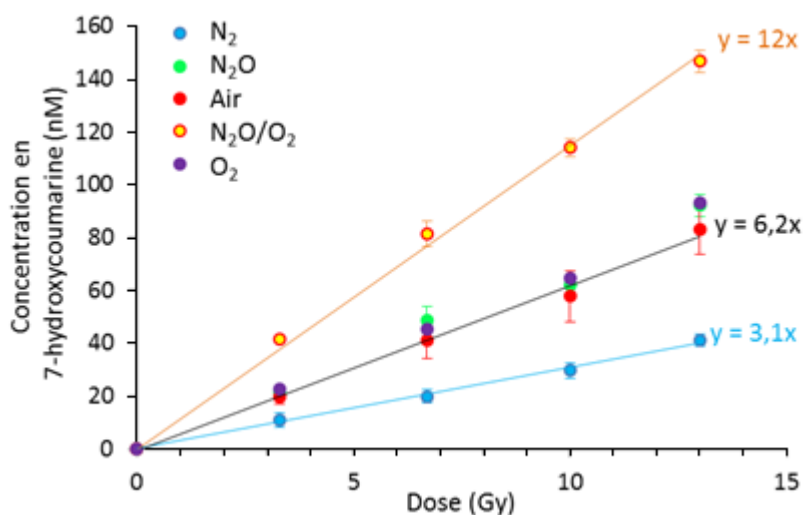


Figure III 16: Profils chromatographiques (HPLC) de 0,5 mM de coumarine irradiée (300 Gy) en présence de 1 nM de NPo sous différentes atmosphères.

Cette étude HPLC a été complétée par une quantification de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine pour chaque atmosphère et à différentes doses en absence de NPo (**Figure III 17**). En effet, la chromatographie ne permettant pas une détection sensible des hydroxycoumarines entre 0 et 15 Gy, il nous fallait confirmer les tendances observées dans la gamme de dose d'intérêt pour cette étude. Ces résultats montrent que la production de 7-hydroxycoumarine est linéaire en fonction de la dose quelle que soit l'atmosphère considérée. La comparaison des productions de 7-hydroxycoumarine mesurées est en accord avec les chromatogrammes précédents. En effet, sous air et sous dioxygène les productions de 7-hydroxycoumarine sont identiques. Lorsque l'on passe sous atmosphère de diazote, la production de 7-hydroxycoumarine est divisée par deux. Ceci est en accord avec le mécanisme d'hydroxylation de la coumarine proposé par Louit *et al.* dont une voie fait directement intervenir le dioxygène [Louit, 2005] (**Figure II 14**). En supprimant le dioxygène, la voie de formation correspondante est également supprimée, ce qui pourrait expliquer les différentes proportions de 7-hydroxycoumarine. Ceci montre que dans cette étude, la proportion de chaque voie mécanistique (I) et (II) est d'environ 50%. Lorsque l'atmosphère est saturée en protoxyde d'azote, le rendement en 7-hydroxycoumarine est doublé par rapport au rendement obtenu sous atmosphère inerte de par la conversion des électrons en radicaux hydroxyle. De même, sous atmosphère saturée avec 21% O<sub>2</sub> et 79% N<sub>2</sub>O, la quantité de 7-hydroxycoumarine est doublée comparativement à la production sous air en accord avec la littérature [Louit, 2005].

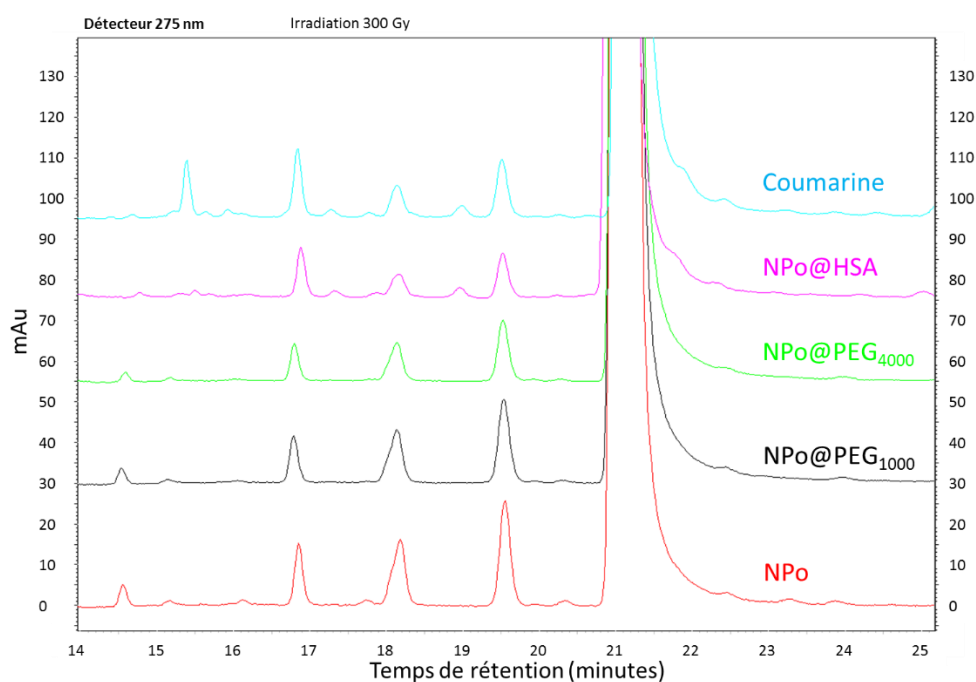


**Figure III 17** : Evolution de la concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la dose sous différentes atmosphères. La pente de chaque droite représente le rendement en 7-hydroxycoumarine sous l'atmosphère considérée. Les valeurs reportées sont les moyennes et écarts types d'un minimum de 4 expériences indépendantes.

Ainsi, ces deux études (HPCL et quantification de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine) montrent que quelle que soit l'atmosphère considérée, une différence entre la production de 7-hydroxycoumarine avec

et sans NPo est observée. Ce résultat démontre la nécessité d'une étude en fonction de la concentration en NPo puisqu'une comparaison directe avec et sans NPo n'est pas possible. Par ailleurs, le rendement de 7-hydroxycoumarine étant dépendant de l'atmosphère, il sera nécessaire lors de sa conversion en rendement de radicaux hydroxyle de tenir compte de cette différence. Enfin, nous avons également vérifié que le rayonnement utilisé (rayons gamma ou rayons X) n'avait pas d'influence sur les proportions d'hydroxycoumarines formées. Toujours par chromatographie HPLC nous n'avons noté aucune influence du rayonnement sur la régiosélectivité d'attaque du radical hydroxyle sur la coumarine.

Dans la suite de cette étude, la quantification des radicaux hydroxyle sera réalisée sur différents types de NPo fonctionnalisées. Aussi, suivant la même démarche que précédemment, il était nécessaire de mettre en évidence l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur la réaction d'hydroxylation de la coumarine. La **Figure III 18** représente les profils chromatographiques de la coumarine irradiée en présence de différents types de NPo fonctionnalisées.



**Figure III 18:** Profils chromatographiques de 0,5 mM de coumarine irradiée (300 Gy) en présence et en l'absence de 1 nM de NPo fonctionnalisées dans des conditions aérées.

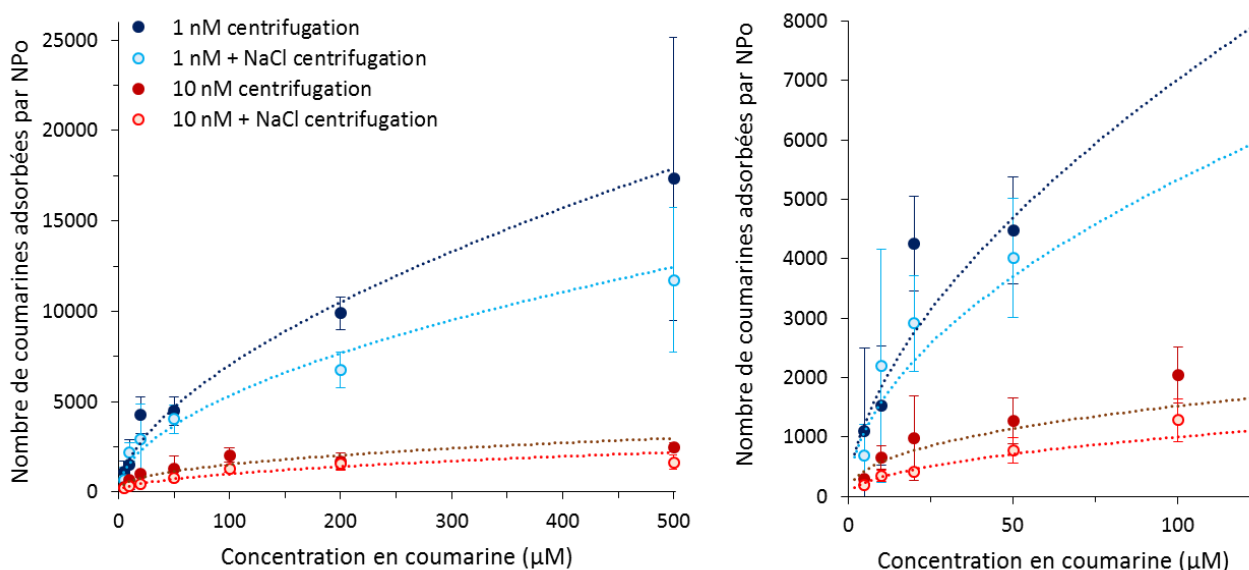
Ces résultats montrent que les NPo, NPo@PEG<sub>1000</sub> et NPo@PEG<sub>4000</sub> présentent des profils chromatographiques similaires. En effet, les proportions d'hydroxycoumarines formées sont les mêmes en présence de ces trois types de NPo (**Table III 4**). Cependant, les NPo@HSA présentent un profil différent, plus proche de celui de la coumarine seule. Par ailleurs, nous avons déterminé précédemment que les NPo@HSA

possèdent un des recouvrements les plus épais (8 nm) ainsi que l'un des nombres d'atomes de recouvrement les plus grands. Ainsi, une fonctionnalisation épaisse (NPo@HSA) conduit à un profil quasi similaire à celui de la coumarine irradiée en l'absence de nanoparticules suggérant le rôle important de la surface des NPo sur la régiosélectivité.

#### b. Interaction coumarine – NPo

Les profils HPLC en présence et en l'absence de NPo (**Figure III 15**) suggèrent une interaction entre les NPo et la coumarine puisque la régiosélectivité d'hydroxylation est perturbée en présence de NPo. Il est donc nécessaire de vérifier si la coumarine s'adsorbe à la surface des NPo et si oui, en quelle quantité. La mesure en DLS du diamètre hydrodynamique des NPo en présence de quantités croissantes en coumarine ne révèle aucune modification de ce diamètre pour des concentrations de coumarine jusqu'à 0,5 mM. Si une couche de coumarine est présente à la surface des nanoparticules, son épaisseur est alors inférieure à la limite de détection de la technique, à savoir 1 à 2 nm. Une coumarine mesure approximativement 4,9 Å par 6,8 Å, soit une surface rectangulaire d'environ 0,335 nm<sup>2</sup>. Par ailleurs, une NPo sphérique de 32 nm de diamètre possède une surface disponible de 3217 nm<sup>2</sup>. Ainsi, par un simple calcul de dimensions, on pourrait adsorber à plat environ 9600 coumarines par NPo. Ce nombre représenterait alors 2 % des coumarines dans une solution à 0,5 mM. Cela suggère que même si la coumarine interagit, sa majeure quantité reste en solution.

Afin de mettre en évidence et de quantifier précisément la quantité de coumarine en interaction avec les NPo, nous avons incubé de la coumarine avec deux concentrations en NPo (1 et 10 nM). Les NPo ont ensuite été retirées de la solution par deux méthodes, la première par simple centrifugation, la seconde par ajout d'une solution de sel (NaCl) qui induit une précipitation des NPo puis par centrifugation. Lors de l'ajout de sel à la solution de NPo, la solution devient transparente et des cristaux noirs en suspension apparaissent. Les nanoparticules précipitent rapidement témoignant de la disparition de l'état colloïdal. L'analyse du surnageant en HPLC nous a ainsi permis, par comparaison avec une gamme étalon, de déterminer le nombre de coumarines n'interagissant pas avec les NPo et, par soustraction, le nombre de coumarines restant adsorbées à la surface des NPo.



**Figure III 19** : Quantification par HPLC du nombre de coumarines adsorbées à la surface d'une NPo en fonction de la concentration en coumarine dans des solutions à 1 et 10 nM en NPo. Les données représentées correspondent aux moyennes et aux écarts types de 5 expériences indépendantes. A droite un zoom des courbes pour les concentrations en coumarine les plus basses.

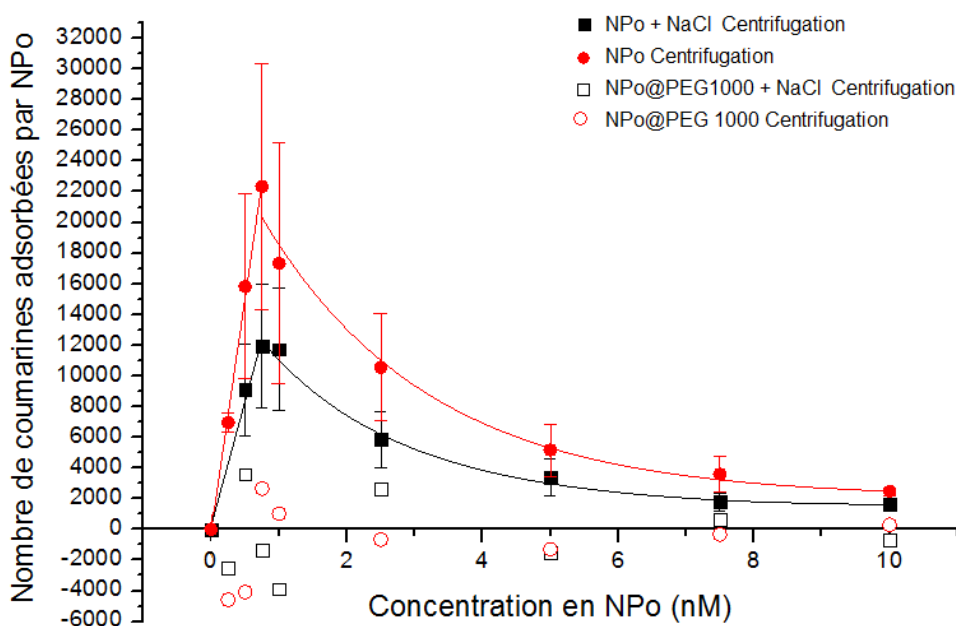
Les courbes représentées **Figure III 19** montrent que plus la concentration en coumarine augmente, plus le nombre de coumarines par NPo augmente également jusqu'à atteindre un plateau probablement dû à une saturation des NPo en coumarine. Les points ainsi obtenus s'ajustent avec des isothermes de Langmuir-Freundlich<sup>7</sup> qui sont caractéristiques de l'adsorption de molécules (la coumarine) sur une surface (ici celle des NPo). De plus, ces résultats montrent que l'addition de sel permet de récupérer plus de coumarine qu'une simple centrifugation. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en nanoparticules réduit le nombre de coumarines adsorbées par NPo. Afin de déterminer le nombre de coumarines adsorbées par NPo dans nos conditions d'irradiation, nous avons répété l'expérience en fixant la concentration en coumarine à 0,5 mM et en variant la concentration en nanoparticules.

La **Figure III 20** représente les résultats obtenus lors de la détermination en HPLC du nombre de coumarines adsorbées par NPo en fonction de la concentration en NPo. Ils montrent d'abord que quelle que soit la concentration en NPo, une fraction de coumarine « manque » et reste donc probablement à la surface des nanoparticules. Lorsque la concentration en NPo augmente entre 0 et 0,75 nM, le nombre de coumarines

<sup>7</sup> Plusieurs hypothèses sont nécessaires pour l'application de ce modèle :

- Surface uniforme
- Adsorption localisée (une molécule adsorbée par site)
- Pas d'interaction entre molécules adsorbées
- Equilibre entre molécules adsorbées et molécules libres en solution
- La température d'adsorption est indépendante du taux de recouvrement de la surface

par NPo croît quasi-linéairement jusqu'à atteindre un maximum. Puis entre 0,75 et 10 nM de NPo, le nombre de coumarines par NPo décroît avec une allure exponentielle. Ici encore, il est clair que l'addition de sel a un effet important, car elle augmente la libération de coumarine dans le surnageant. Les résultats montrent que le nombre maximal de coumarines adsorbées par NPo est atteint pour 1 nM de NPo, avec une valeur de  $22340 \pm 8000$  coumarines par NPo, lorsque les NPo sont seulement centrifugées (NPo Centrifugation), et de  $11934 \pm 4000$  lorsque les NPo sont précipitées avec du sel avant centrifugation (NPo + NaCl Centrifugation). Il est à noter en premier lieu que l'ordre de grandeur des valeurs obtenues concorde avec la valeur précédemment calculée avec les dimensions de la coumarine. La coumarine s'adsorberait donc à la surface des NPo et il semblerait que l'on récupère plus de coumarine en ajoutant du sel avant centrifugation. Dans ce dernier cas, cela représente au maximum 2,4% des 0,5 mM de la coumarine en solution. La proportion de coumarine adsorbée est donc très faible. En supposant que la coumarine oxydée et la coumarine ont le même comportement, il sera donc nécessaire par la suite d'induire l'agrégation des NPo avant centrifugation pour récupérer un maximum d'hydroxycoumarines en solution.



**Figure III 20 :** Nombre de coumarines adsorbées à la surface d'une NPo en fonction de la concentration en NPo dans une solution à 0,5 mM en coumarine. Les données représentées correspondent aux moyennes et aux écarts types de 6 expériences indépendantes. Les lignes représentées sont seulement des guides pour les yeux.

En conclusion, nos observations rendent compte d'une interaction entre la coumarine et les NPo. Cependant, dans les conditions de quantification que nous expliciterons plus tard, soit une concentration en NPo inférieure à 0,3 nM (cf **partie III.C.3.**), cette interaction est considérée négligeable puisqu'elle représentera au maximum 0,3% de la coumarine totale en solution. Cependant, compte tenu de nos résultats,

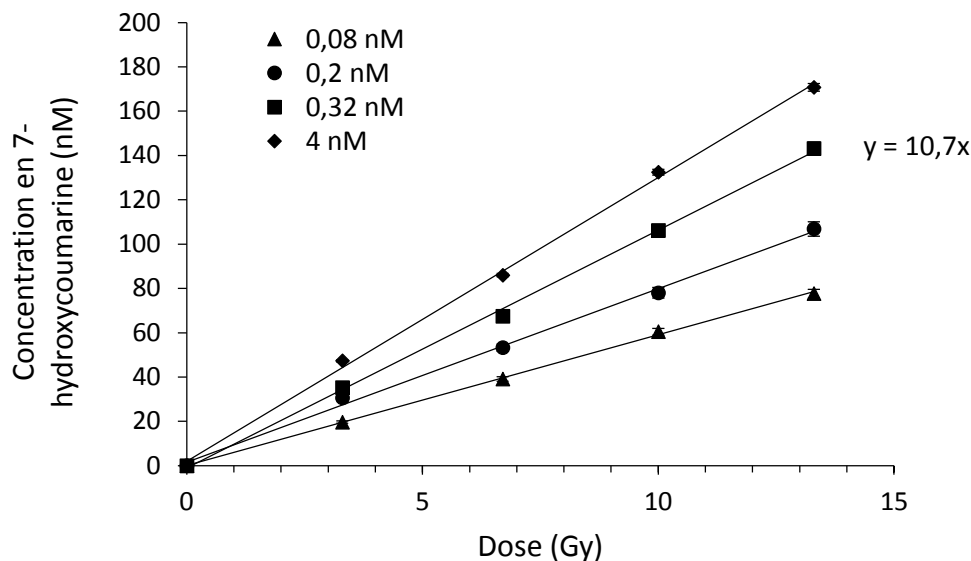
la répartition de la coumarine en solution n'est pas totalement homogène. Les radicaux hydroxyle quantifiés pourront donc provenir à la fois de la solution et, en faible proportion, de la partie adsorbée à la surface des NPo. Ainsi, la production de radicaux hydroxyle quantifiée par cette méthode rend compte d'un phénomène global en solution.

Nous avons également réalisé le dosage du nombre de coumarines adsorbées à la surface de NPo@PEG<sub>1000</sub>. Ces NPo possèdent le recouvrement de plus faible densité et de plus faible épaisseur comparativement aux autres NPo synthétisées. Les résultats n'ont montré aucune interaction entre la coumarine et les NPo@PEG<sub>1000</sub> (**Figure III 20**). Ainsi, lorsque l'on fonctionnalise les NPo, la totalité des HO• en solution est quantifiée par la coumarine. Ces résultats corroborent le fait que lorsque la nanoparticule est fortement recouverte (cas des NPo@HSA), le profil chromatographique de la coumarine irradiée obtenu en présence de NPo est similaire à celui obtenu en l'absence de NPo (**Figure III 18**).

### 3. Conversion du rendement de 7-hydroxycoumarine en rendement de radical hydroxyle

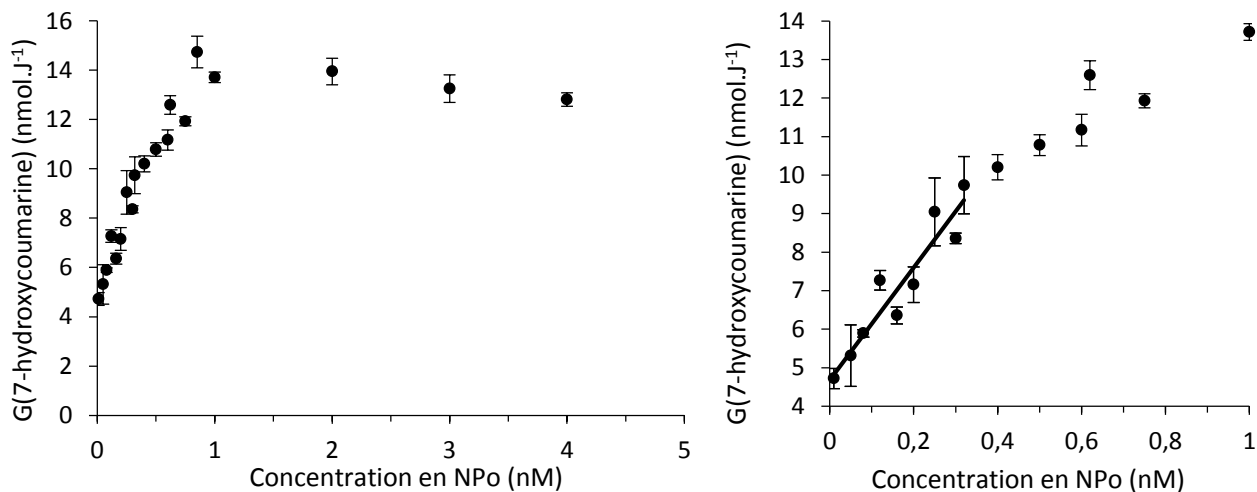
Comme précédemment évoqué, nous ne pouvons pas convertir directement le rendement de 7-hydroxycoumarine en rendement de radicaux hydroxyle comme usuellement réalisé pour la coumarine en solution. Aussi, une étude en fonction de la concentration en NPo est nécessaire afin de pouvoir obtenir le rendement des radicaux hydroxyle. Les expériences réalisées nous donnent accès au signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine détecté à 450 nm. Ce dernier est converti en concentration en 7-hydroxycoumarine grâce à une gamme étalon réalisée à chaque expérience en présence de coumarine. En effet, la coumarine éteint partiellement le signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine. Afin de réaliser des mesures quantitatives, cette gamme étalon doit donc être réalisée dans les mêmes conditions que nos expériences, soit avec la même concentration de coumarine qu'introduite en présence de NPo. La **Figure III 21** montre la concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la dose dans l'eau pour quatre concentrations en NPo (0,08 ; 0,2 ; 0,32 et 4 nM). Ce signal augmente linéairement avec la dose. La pente de la droite ainsi obtenue représente le rendement de formation de la 7-hydroxycoumarine ( $G_{7OH}$ ). Par exemple, pour 0,32 nM de nanoparticules,  $G_{7OH} = 10,7 \text{ nmol.J}^{-1}$ . Dans les gammes de doses et de concentrations utilisées pour cette étude, l'augmentation de la production de 7-hydroxycoumarine est linéaire avec la dose d'irradiation, cela indique que la concentration en coumarine utilisée ne représente pas un facteur limitant. Nous vérifierons d'ailleurs l'influence de la concentration en coumarine dans le paragraphe suivant.





**Figure III 21 :** Concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la dose pour 4 concentrations en NPo (0,08 nM ; 0,2 nM ; 0,32 nM et 4 nM) après irradiation sous air à 17,5 keV et à  $0,33 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pour chaque concentration en NPo, l'expérience a été réalisée 3 fois et pour 5 doses différentes. La totalité des 15 points obtenus a été portée sur le graphe et ajustée par une droite. La pente de la droite ainsi obtenue représente le rendement de formation de la 7-hydroxycoumarine ( $G_{7\text{OH}}$ ), l'incertitude associée à cette pente est donc l'écart type des données.

Les pentes extraites de la **Figure III 21** sont représentées **Figure III 22** en fonction de la concentration en NPo.



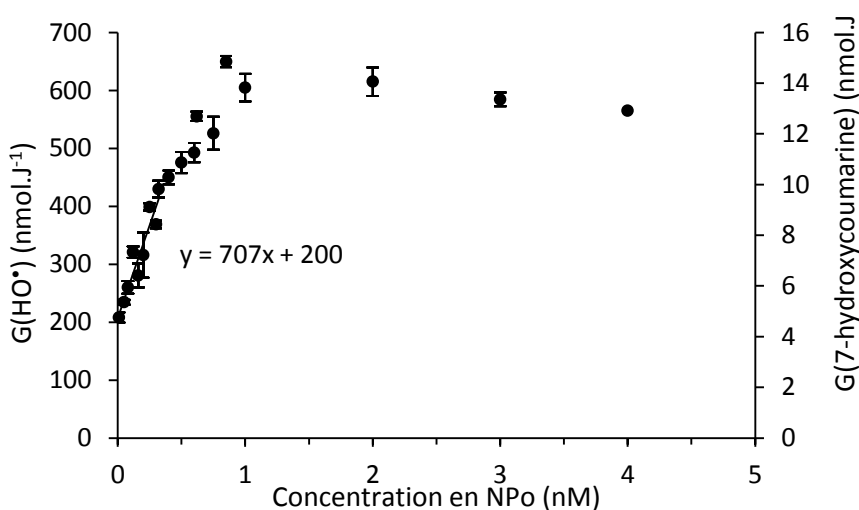
**Figure III 22 :** Rendements en 7-hydroxycoumarin en fonction de la concentration en NPo. A gauche : le graphe complet entre 0 et 4 nM pour des NPo non fonctionnalisées. A droite : un zoom sur la première partie du graphe et l'ajustement de la courbe par une droite.

Le rendement en 7-hydroxycoumarin est tracé en fonction de la concentration en NPo. La courbe obtenue a une allure de courbe de saturation. En effet, nos résultats mettent en évidence une augmentation de la production de 7-hydroxycoumarin linéaire avec la concentration molaire en nanoparticules jusqu'à 0,32 nM.

Pour des concentrations plus élevées en NPo, nous observons une pente plus faible entre 0,32 et 1 nM jusqu'à l'apparition d'un « plateau » au-delà de 1 nM. La première partie de la courbe (jusqu'à 0,32 nM) est ajustée par une droite avec le logiciel Origin<sup>®</sup> et une pondération dite « Direct Weighting » qui prend en compte l'incertitude sur chaque pente précédemment obtenue. La pente de cet ajustement représente alors la variation du rendement de production en 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en NPo  $dG_{7OH}/d[NPo]$  et l'incertitude associée correspond à la variation entre les pentes extrêmes pouvant être obtenues à partir des points  $G_{7OH}$  pondérés de leurs incertitudes respectives. Pour des rayons X de 17,5 keV sous air:

$$G_{7OH} = (4,6 \pm 0,1) + (16,2 \pm 0,8) \times [NPo] \text{ nmol.J}^{-1}$$

Afin de convertir le rendement de 7-hydroxycoumarine ( $G_{7OH}$ ) en rendement de radicaux hydroxyle ( $G_{HO\cdot}$ ), nous avons utilisé le rendement de formation de 7-hydroxycoumarine (**Figure III 22**) à une concentration de 0 nM en NPo (soit l'équivalent de l'eau seule). Il s'agit de l'ordonnée à l'origine de la droite citée plus haut :  $G_{7OH} = 4,58 \pm 0,12 \text{ nmol.J}^{-1}$ . Or, dans l'eau, pour des rayons X de 17,5 keV et après 1  $\mu\text{s}$ ,  $G_{HO\cdot} = 200 \pm 25 \text{ nmol.J}^{-1}$  [Fulford, 2001]. En supposant une efficacité de capture du radical hydroxyle par la coumarine, identique dans l'eau et dans une solution colloïdale de NPo, il est alors possible de convertir les valeurs de  $G_{7OH}$  (et leurs incertitudes) en  $G_{HO\cdot}$  en les multipliant par un facteur  $200 / 4,58 = 43,66$ . La **Figure III 23** ainsi obtenue donne le rendement de production des radicaux hydroxyle :  $G_{HO\cdot} = 200 + (707 \pm 85) \times [NPo] \text{ nmol.J}^{-1}$  avec [NPo] donnée en nM. Cette expression est valable dans la partie linéaire de la courbe, soit entre 0 et 0,32 nM de NPo. Il est alors possible, pour toute concentration en NPo dans cette gamme de concentrations, de déterminer la quantité de radicaux hydroxyle produits. Par ailleurs, la valeur de la pente (ici  $707 \pm 85$ ) représente l'efficacité de production en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo. Elle est notée  $dG_{HO\cdot}/d[NPo]$  et exprimée en  $\text{nmol.J}^{-1}$  par nM de NPo.

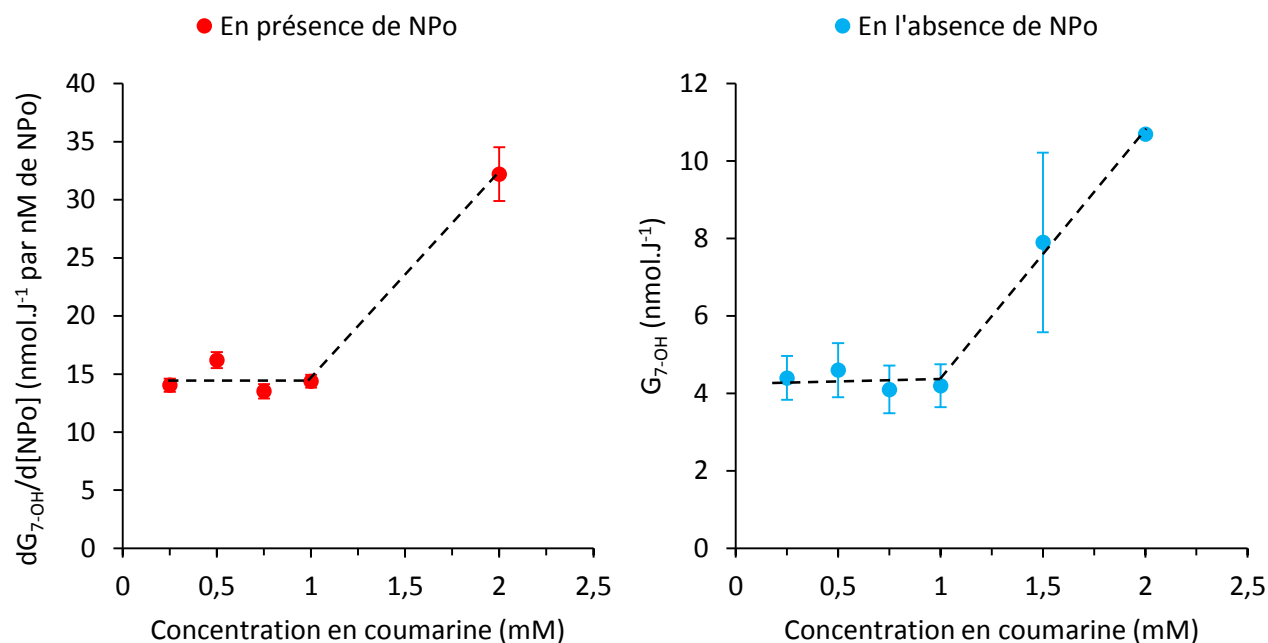


**Figure III 23:** Rendements des radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo.

Comme pour la courbe donnant le rendement de 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en NPo, celle du rendement de radicaux hydroxyle a également une allure de courbe de saturation. Pour des NPo non fonctionnalisées, le  $G_{HO\cdot}$  est déterminé pour des concentrations en NPo inférieures à 0,32 nM et le  $G_{HO\cdot\max}$  pour des concentrations supérieures à 1 nM. La partie plane observée à partir de 1 nM pourrait être due à une limitation par la coumarine. En d'autres termes, il n'y aurait plus suffisamment de coumarine pour capter tous les radicaux hydroxyle. Cette hypothèse a été considérée dans le paragraphe suivant.

#### 4. Influence de la concentration en coumarine sur le rendement en 7-hydroxycoumarine

Nous avons étudié l'influence de la concentration des solutions de coumarine irradiées sur le rendement en 7-hydroxycoumarine dans l'eau et sur la valeur de  $G_{HO\cdot\max}$  afin de s'assurer que la concentration en coumarine ne constituait pas un facteur limitant dans notre étude. Pour ce faire, pour chaque concentration en coumarine, nous avons irradié des solutions de NPo dans une gamme de 0 à 4 nM et nous avons déterminé, dans un premier temps, les rendements en 7-hydroxycoumarine en présence de NPo entre 0 et 0,32 nM. Les résultats obtenus sont illustrés **Figure III 24**.



**Figure III 24** : Comparaison des rendements en 7-hydroxycoumarine en présence et en l'absence de NPo en fonction de la concentration en coumarine. En l'absence de NPo, les valeurs reportées sont les moyennes et écarts-types d'un minimum de 3 expériences indépendantes. En présence de NPo, les valeurs reportées représentent les pentes obtenues pour les courbes  $G_{7OH}$  en fonction de la concentration en NPo entre 0 et 0,32 nM. Les barres d'erreurs associées représentent les pentes extrêmes obtenues.

Pour une concentration de coumarine seule de 0 à 1 mM,  $G_{7OH}$  est constant suivi par une augmentation avec la concentration en coumarine entre 1 et 2 mM. Or le rendement des radicaux hydroxyle est constant ( $G_{HO\cdot} = 200 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ ) quelle que soit la concentration initiale en coumarine. Cette variation reflète donc le fait que pour une concentration en coumarine supérieure à 1 mM, le rendement de formation de 7-hydroxycoumarine varie. Il est d'environ 2% entre 0 et 1 mM en coumarine puis augmente jusqu'à 4,9% pour 2 mM de coumarine. L'ordre de grandeur de ces valeurs est en accord avec la littérature, puisque des rendements de formation de 7-hydroxycoumarine par la coumarine de quelques pourcents ont été reportés [Ashawa, 1979; Louit, 2005]. Une hypothèse possible pour expliquer la tendance observée est basée sur la recombinaison du radical hydroxyle. Le taux de recombinaison dépend essentiellement de la localisation relative des  $HO\cdot$ . Plus les  $HO\cdot$  sont présents en forte concentration à un endroit, plus la probabilité qu'ils se recombinent est grande. On peut donc supposer qu'à partir d'une certaine valeur (en l'occurrence 1 mM), la concentration croissante en coumarine augmente la probabilité de réaction entre la coumarine et  $HO\cdot$ . Par ailleurs, lorsque la concentration en coumarine augmente, le temps de capture du radical hydroxyle par la coumarine est plus faible ( $\tau = 95 \text{ ns}$  à 1 mM en coumarine). La capture intervient alors plus tôt dans le processus radiolytique. De cette manière la quantité de radicaux hydroxyle dosée peut augmenter avec la quantité de capteur.

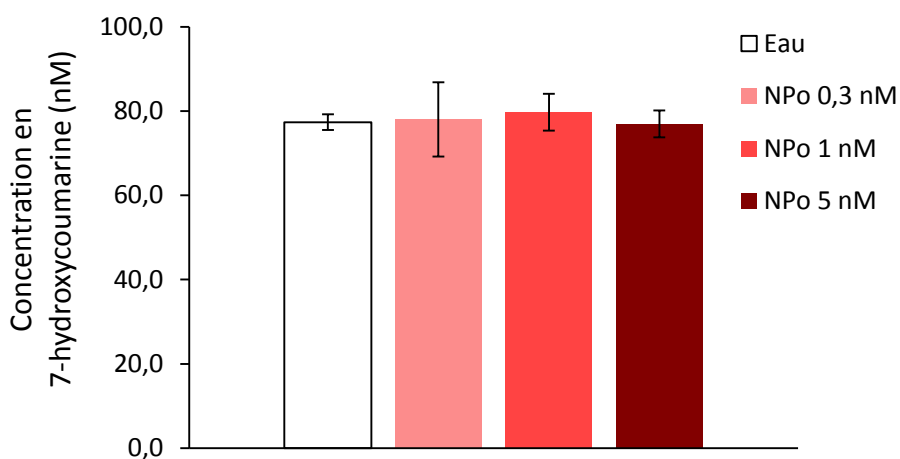
Comparons maintenant l'influence de la concentration en coumarine sur le rendement en 7-hydroxycoumarine en présence de NPo. D'après la **Figure III 24**, les tendances avec et sans NPo sont identiques en effet  $dG_{7OH}/d[\text{NPo}]$  est constant quelle que soit la concentration en coumarine entre 0 et 1 mM. Au-delà de 1 mM, le rendement de formation de 7-hydroxycoumarine augmente également dans les mêmes proportions qu'en absence de NPo.

Par ailleurs, les valeurs de  $G_{HO\cdot\text{max}}$  c'est-à-dire pour une concentration de NPo supérieure à 1 nM suivent cette même tendance. Ainsi, dans les conditions de nos expériences, la concentration en coumarine ne constitue pas un facteur limitant pour la quantification des radicaux hydroxyle et donc des valeurs de  $G_{HO\cdot}$  et de  $G_{HO\cdot\text{max}}$ . Il est donc possible de doser les radicaux hydroxyle produits avec 0,5 mM de coumarine en solution.

## 5. Effet Čerenkov

Afin d'assurer la fiabilité du dosage des radicaux hydroxyle sous rayonnement gamma, nous souhaitons vérifier que l'effet Čerenkov n'induit pas une oxydation de la coumarine dans nos conditions expérimentales. Cet effet étant plus fort avec des rayons gamma qu'avec des rayons X, il pourrait impacter la production de radicaux hydroxyle dans ce cas. L'effet Čerenkov est l'analogue du mur du son dans le cas d'ondes lumineuses.

Des électrons très rapides peuvent avoir une vitesse supérieure à la vitesse de la lumière dans le milieu considéré. Dans ce cas, il se produit une émission de photons polychromatiques qui se révèle être plus intense dans l'UV. Cependant en présence de NPo, nous voulions vérifier que cet effet n'induit pas l'hydroxylation de la coumarine par réaction photochimique. En radiolyse, l'impact de cet effet est généralement négligeable comparativement aux autres phénomènes. Pour cela, nous avons irradié des échantillons de coumarine à 0,5 mM dans des tubes capillaires en quartz transparents aux UV, eux même placés au centre d'une solution de NPo à différentes concentrations ou d'eau. La comparaison de la quantité de coumarine hydroxylée dans les deux cas doit alors nous permettre de dire si l'effet Čerenkov produit par les NPo est un biais à notre méthode de quantification. Ces expériences ont été réalisées sous rayonnement gamma et pour la plus forte dose car ce sont les conditions pour lesquelles l'effet Čerenkov attendu est le plus fort. Les résultats obtenus sont présentés **Figure III 25**.



**Figure III 25 :** Effet Čerenkov. Evolution de la concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en NPo. Les valeurs reportées sont les moyennes et écarts types de deux expériences indépendantes.

Aucune surproduction de 7-hydroxycoumarine n'est observée en présence de NPo et ce quelle que soit la concentration en NPo. La méthode de dosage des radicaux hydroxyle élaborée n'est donc pas sujette à une réaction photochimique sur la coumarine induite par effet Čerenkov.

## 6. Résumé

Nous avons mis en place un protocole permettant la quantification des radicaux hydroxyle en solution en présence de NPo. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un phénomène d'extinction du signal de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine par les NPo qui nous a contraints, pour obtenir des mesures

quantitatives, à réaliser des expériences pour lesquelles le temps d'irradiation est inférieur à 40 s et à induire l'agrégation des NPo par ajout d'une solution saline immédiatement après irradiation. Nous avons également étudié la régiosélectivité de la réaction d'hydroxylation de la coumarine qui s'est avérée être impactée par la présence de NPo. Ce résultat nous a contraints à réaliser un dosage des radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo. Puis, nous avons mis en évidence une interaction entre la coumarine et les NPo. Dans les conditions de nos expériences, soit la détermination du rendement en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo, les  $G(\text{HO}^\bullet)$  sont déterminés entre 0 et 0,3 nM. Au maximum  $5110 \pm 400$  coumarines au maximum sont adsorbées à la surface de chaque NPo (**Figure III 20**), ce qui représente 0,3% des 0,5 mM de la coumarine présente en solution. Nous sommes donc capables de quantifier 99,7% de la coumarine totale en présence de NPo non fonctionnalisées. De plus, aucune interaction entre la coumarine et les NPo n'a été recensée en présence de nanoparticules fonctionnalisées, nous assurant ainsi de la précision de nos mesures dans ce cas. Nous avons vérifié que la concentration en coumarine ne représentait pas un facteur limitant dans notre étude. Nous nous sommes ainsi assurés que 0,5 mM de coumarine sont suffisants pour quantifier tous les radicaux hydroxyle en solution. Cette concentration en coumarine correspond à un temps de capture de  $\text{HO}^\bullet$  de  $\tau = 190$  ns, soit une capture au cours de l'étape de chimie homogène de la radiolyse de l'eau. Enfin, en vue de l'utilisation d'un rayonnement gamma, nous avons également contrôlé que l'hydroxylation de la coumarine ne pouvait pas être induite par une réaction photochimique due à l'effet Čerenkov. Le dosage établi est donc fiable. Par ailleurs, il rend compte d'un phénomène global en solution puisque la quasi-totalité de la coumarine est quantifiable.

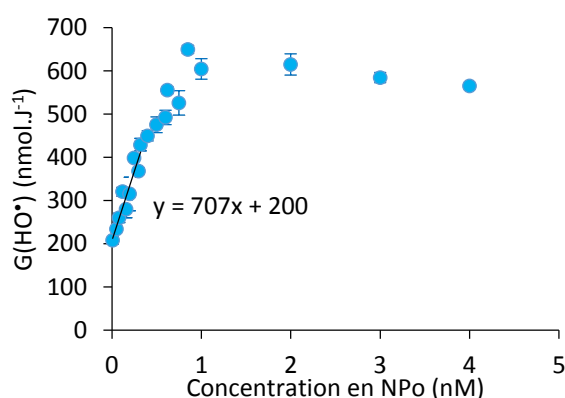
Ainsi, des solutions de NPo en présence de 0,5 mM de coumarine ont été irradiées dans une gamme de concentration de 0 à 15 nM en NPo. Pour chaque concentration en NPo, les valeurs de  $G_{7\text{OH}}$  ont été obtenues par ajustement des courbes donnant la concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la dose dans l'eau. Nous avons en effet considéré que la dose dans la solution colloïdale est égale à celle dans l'eau. Puis ces rendements  $G_{7\text{OH}}$  ont été convertis en  $G_{\text{HO}^\bullet}$  par extrapolation de la valeur à 0 nM en NPo qui correspond au rendement de formation de  $\text{HO}^\bullet$  dans l'eau donné dans la littérature.

Dans la partie suivante, nous allons donc présenter les résultats de quantification des radicaux hydroxyle et des électrons produits pour différents types de NPo et pour différentes conditions. Nous nous intéresserons à l'impact de la quantité de dioxygène en solution, à l'influence du rayonnement (X ou  $\gamma$ ), ainsi qu'à l'impact d'une faible quantité de sel en solution. Nous étudierons également l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur ces productions de radicaux.

## D. Quantification de la production de radicaux hydroxyle en présence de nanoparticules d'or

### 1. Production massive

La quantification de la production des radicaux hydroxyle en présence de NPo met en évidence une courbe en trois parties (**Figure III 26**). Cette courbe résulte de la quantification de l'oxydation de la coumarine en fonction de la dose dans l'eau pour différentes concentrations en NPo. En effet, compte tenu des faibles concentrations en or ajoutées en solution, nous avons considéré la dose dans l'eau tout le long de ce travail. Par ailleurs, nous rappelons que les  $dG_{HO\cdot}/d[NPo]$  donnés représentent l'efficacité de production des radicaux hydroxyle et sont valables entre 0 et 0,3 nM de NPo.



**Figure III 26** : Production en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo pour des rayons X de 17,5 keV.

En solution aérée, la production de radicaux hydroxyle par des NPo de 32 nm de diamètre non fonctionnalisées est de  $G_{HO\cdot} = (707 \pm 85) \times [NPo] + 200 \text{ nmol.J}^{-1}$  où la  $[NPo]$  est donnée en nM (**Figure III 26**). Cette valeur est très élevée. En effet, la quantité de radicaux hydroxyle produite par radiolyse dans l'eau seule ( $200 \text{ nmol.J}^{-1}$  pour des rayons X de 17,5 keV) est multipliée par un facteur supérieur à 2 en présence de NPo pour des concentrations inférieures à 0,3 nM. Ces résultats sont surprenants et suggèrent un processus très efficace.

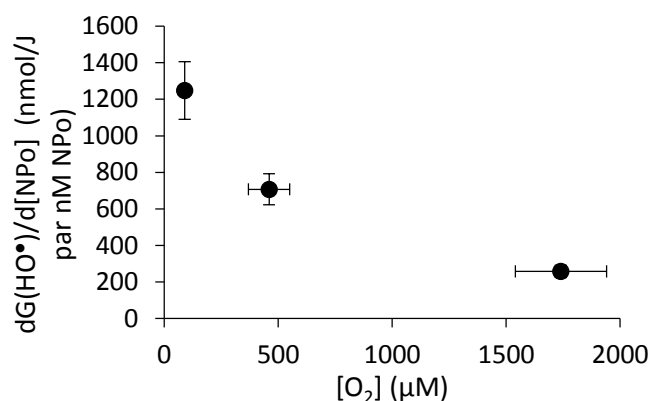
### 2. Impact de la quantité de dioxygène en solution

En milieu biologique, les conditions peuvent être aérobies, soit l'analogue d'une atmosphère aérée, ou anaérobies, soit l'analogue d'une atmosphère inerte. Par ailleurs, en milieu aéré, les électrons sont captés par

le dioxygène pour former l'anion superoxyde (**équation II 23**). Il est donc intéressant de quantifier l'impact de la quantité de dioxygène en solution. Pour cela, des solutions de NPo en présence de 0,5 mM de coumarine ont été mises à barboter pendant au minimum 1 h avec l'atmosphère souhaitée. Nous avons mesuré la concentration d'oxygène d'abord sous atmosphère aérée en présence et en l'absence de NPo en solution puis sous différentes atmosphères ( $N_2$ ,  $O_2$ ) à l'aide d'une électrode à dioxygène. Quelle que soit la concentration en NPo, dans une gamme de 0 à 10 nM, la présence des NPo n'affecte pas la quantité d'oxygène en solution. Les valeurs obtenues ont été répertoriées **Table III 5**. Que ce soit en présence ou en absence de NPo, une valeur nulle de la quantité de dioxygène en solution n'est jamais atteinte même après 24h de bullage. Ce résultat est surprenant et pourrait témoigner soit d'une légère infiltration d'air lors de nos mesures, soit que le dégazage n'est pas suffisant pour atteindre une valeur nulle. L'impact de la concentration en dioxygène sur la production de radicaux hydroxyle en solution est illustré **Figure III 27**.  $G_{HO^{\bullet}(N_2)}$ ,  $G_{HO^{\bullet}(air)}$  et  $G_{HO^{\bullet}(O_2)}$  permettent d'extraire l'impact de la quantité de dioxygène en solution sur la quantité de radicaux hydroxyle produite. Nous pouvons constater que sous atmosphère d'azote, la production de radicaux hydroxyle est plus grande que sous air qui elle-même est plus grande que sous atmosphère saturée en dioxygène (**Table III 5**). La production de  $HO^{\bullet}$  est donc fortement impactée par la quantité de dioxygène en solution.

NPo non fonctionnalisées	$N_2$	air	$O_2$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ (nmol.J <sup>-1</sup> par nM de NPo)	$1248 \pm 158$	$707 \pm 85$	$258 \pm 33$
Concentration en $O_2$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$90 \pm 15$	$460 \pm 90$	$1740 \pm 200$

**Table III 5** : Efficacités de production en radicaux hydroxyle sous différentes atmosphères pour des NPo de 32 nm de diamètre non fonctionnalisées et concentrations en dioxygène correspondantes.



**Figure III 27** : Influence de la concentration en dioxygène sur le rendement de production en radicaux hydroxyle.



Ces résultats montrent que  $dG_{HO\cdot}/d[NPo]$  diminue fortement lorsque la quantité de dioxygène en solution augmente. Sous atmosphère saturée en dioxygène, le rendement en radicaux hydroxyle diminue de 79% comparativement à une atmosphère inerte indiquant un impact majeur du dioxygène dans la production des radicaux hydroxyle. Aussi, compte tenu de ce fort impact, il sera intéressant dans la suite de cette étude de quantifier cet effet dans chaque condition.

### 3. Influence de la concentration en sel

L'environnement ionique local des NPo influence leurs propriétés physico-chimiques [Pfeiffer, 2014]. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier l'influence de faibles concentrations en sel sur la production de radicaux hydroxyle. Le sel étant connu pour déstabiliser les NPo, il nous fallait identifier les concentrations en sel permettant la réalisation de l'expérience sans altération des échantillons. En effet, aucune agrégation des NPo ne doit venir perturber l'expérience. Une concentration maximale de 1,7 mM en NaCl a alors été déterminée puisqu'aucune modification du spectre d'absorption des NPo ou du diamètre hydrodynamique obtenu en DLS n'a été observée jusqu'à cette valeur.

Nous avons mesuré les rendements en radicaux hydroxyle pour différentes concentrations en NaCl (0 ; 0,425 ; 0,85 et 1,7 mM) sous atmosphère aérée. Le sel pouvant être un capteur de radicaux, nous avons réalisé la quantification des radicaux hydroxyle sans nanoparticule en présence de 1,7 mM de sel. Dans ces conditions, aucune modification de la production de radicaux hydroxyle n'a été observé en l'absence de NPo. La capture des radicaux  $HO\cdot$  par les ions  $Cl^-$  est donc très faible et sera négligée. Les résultats obtenus sont présentés **Table III 6** et **Figure III 28**.

Concentration en NaCl (mM)	0	0,425	0,85	1,7
$dG(HO\cdot)/d[NPo]$ (nmol.J <sup>-1</sup> par nM de NPo)	707 ± 85	496 ± 37	458 ± 25	290 ± 18

**Table III 6** : Influence de la concentration en sel sur l'efficacité de production des radicaux hydroxyle sous air.

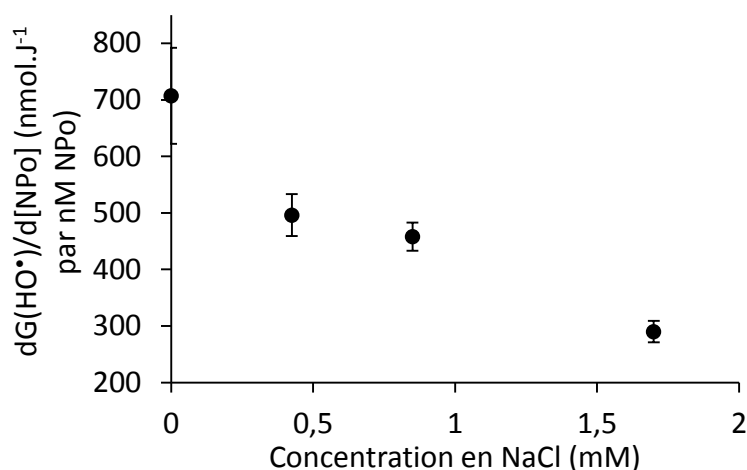


Figure III 28 : Influence de la concentration en NaCl sur le rendement en radicaux hydroxyle.

Les résultats montrent une décroissance importante de la production en radicaux hydroxyle avec l'augmentation de la concentration en NaCl en solution. Un tel impact est très surprenant, en effet une concentration de 1,7 mM en NaCl conduit à une diminution du rendement en  $\text{HO}^\bullet$  de près de 50% sous atmosphère aérée. Nous avons également mesuré la production de radicaux hydroxyle sous atmosphère inerte dans une solution de NaCl concentrée à 1,7 mM. Les résultats obtenus sont présentés **Figure III 29** et **Table III 7**.

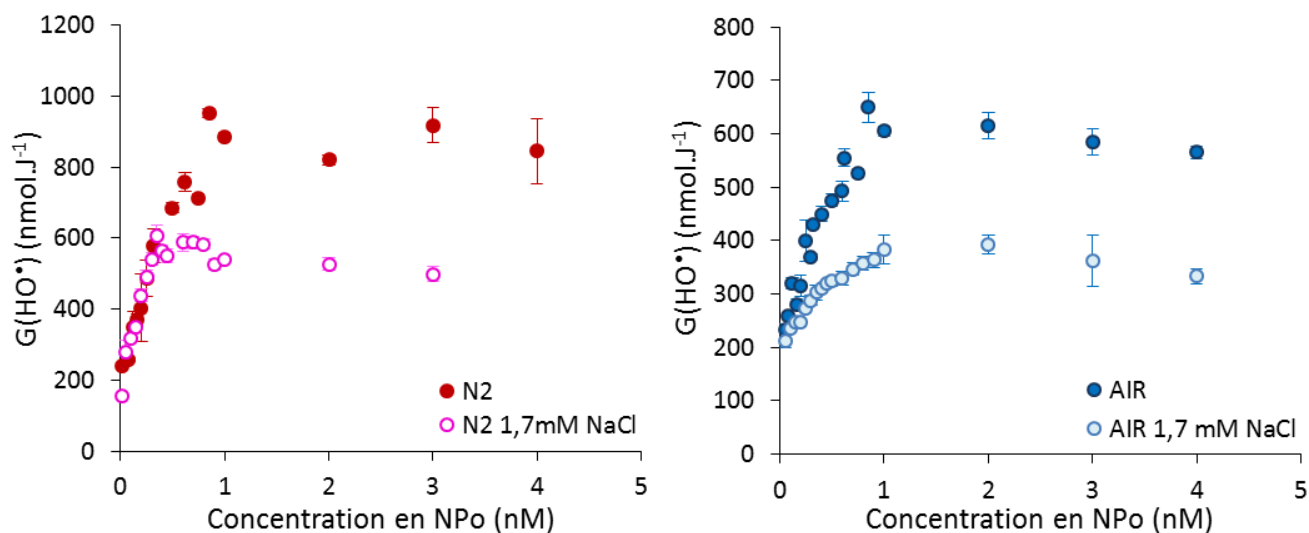


Figure III 29 : Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous différentes atmosphères en présence et en l'absence de 1,7 mM de NaCl.

NPo non fonctionnalisées	N <sub>2</sub>	air
dG <sub>HO•</sub> /d[NPo]	1248 ± 158	707 ± 85
dG <sub>HO•</sub> /d[NPo] 1,7mM NaCl	1157 ± 76	290 ± 18

**Table III 7 :** Rendements de production en radicaux hydroxyle pour des NPo non fonctionnalisées sous différentes atmosphères en présence et en l'absence de 1,7 mM de NaCl.

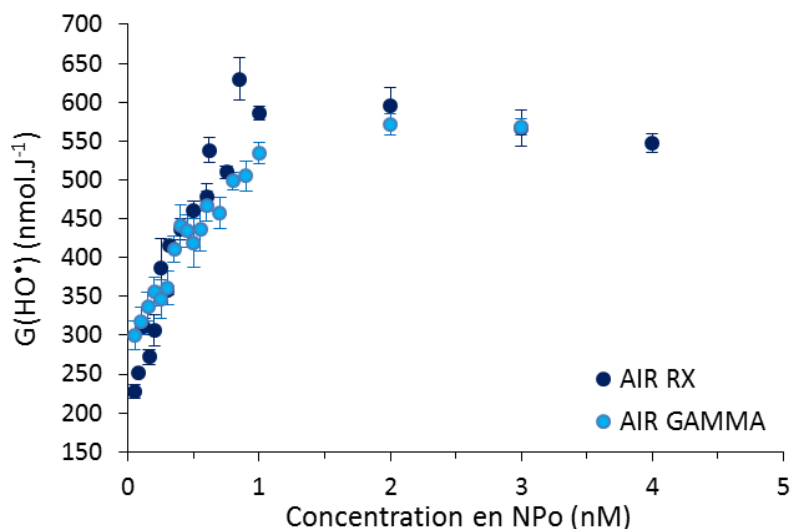
Les résultats mettent en évidence des rendements de production en radicaux hydroxyle identiques en présence ou en l'absence de 1,7 mM de sel sous atmosphère désoxygénée, entre 0 et 0,3 nM en NPo. Au-delà de 0,3 nM, dans le cas d'une solution dépourvue de sel nous observons une diminution de la valeur de la pente entre 0,3 et 1 nM jusqu'à l'apparition d'un plateau au-delà de 1 nM. Dans le cas d'une solution de NaCl à 1,7 mM, la production de radicaux hydroxyle atteint un plateau à partir de 0,3 nM en NPo. Sous atmosphère inerte, les rendements de production maximum de radicaux hydroxyle sous N<sub>2</sub> sont donc différents en présence ou en l'absence de NaCl. En effet, ces derniers sont respectivement égaux à 600 et 950 nmol.J<sup>-1</sup>, soit une perte d'efficacité maximale à produire des radicaux hydroxyle de 37% en présence de 1,7 mM de NaCl.

En conclusion, cette expérience confirme un rôle particulier de l'oxygène pour la production d'espèces radicalaires en présence de NPo. En effet, nos résultats montrent une influence de la concentration en sel uniquement en présence de dioxygène.

#### 4. Influence du type de rayonnement (rayons $\gamma$ versus rayons X)

Compte tenu de la différence entre les coefficients d'absorption massique de l'or et de l'eau (**Figure II.3**), les calculs théoriques d'augmentation de la dose identifient une gamme d'énergie de l'ordre du keV comme gamme optimale pour la radiosensibilisation par des NPo et ne prévoit aucun effet pour des énergies de l'ordre du MeV. Cependant au sein de la littérature certaines études reportent un effet radiosensibilisateur notable dans cette gamme d'énergie (**partie II.2.c**). Il est donc intéressant d'étudier l'influence du rayonnement et de ses caractéristiques sur la production de radicaux. Dans ce paragraphe, nous quantifierons la production de radicaux hydroxyle sous rayonnement gamma. Ces photons sont issus de la désintégration d'une source de Cobalt et possèdent une énergie de près de 1,2 MeV et un TEL de 0,23 keV.μm<sup>-1</sup>. Ainsi, de la même manière que pour les expériences sous rayonnement X, des solutions de NPo en présence de 0,5 mM de coumarine ont été mises à barboter pendant une heure sous l'atmosphère désirée avant d'être irradiées. Les valeurs de G<sub>HO•</sub> ont été obtenues comme précédemment. Les rendements G<sub>7OH</sub> ont été convertis en G<sub>HO•</sub> par extrapolation de la valeur de G<sub>7OH</sub> à 0 nM en NPo. Nous nous sommes basés sur les valeurs de G<sub>HO•</sub> suivantes

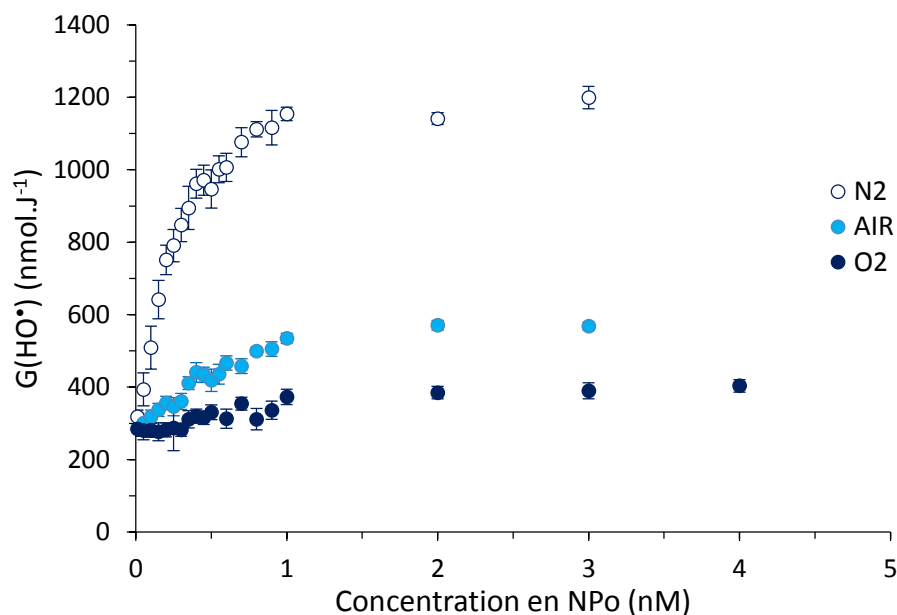
pour 0 nM en NPo:  $G_{\text{HO}^{\bullet}(\text{air})} = G_{\text{HO}^{\bullet}(\text{N}_2)} = 280 \pm 35 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  [Spinks, 1990]. Nous utilisons ces valeurs pour la conversion des valeurs de rendement de 7-hydroxycoumarine en rendement de radicaux hydroxyle dans les différentes conditions d'irradiation. Les résultats obtenus sont présentés **Figure III 30** et **Table III 8**.



**Figure III 30** : Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous atmosphère aérée pour des rayons gamma et des rayons X.

Nous obtenons un rendement en radicaux hydroxyle en solution aérée de  $G_{\text{HO}^{\bullet}(\text{air})} = (350 \pm 33) \times [\text{NPo}] + 280 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  déterminé entre 0 et 0,3 nM. Cette valeur est plus faible que celle obtenue pour des rayons X. De plus, au-delà de 0,3 nM, ces rendements atteignent un même rendement de production maximal que pour des rayons X d'environ  $600 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ . (**Figure III 30**).

Nous avons également mesuré le rendement en radicaux hydroxyle en présence de NPo sous différentes atmosphères (**Figure III 31**).



**Figure III 31** : Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous différentes atmosphères pour des rayons gamma.

NPo non fonctionnalisées	N <sub>2</sub>	air	O <sub>2</sub>
dG <sub>HO•</sub> /d[NPo] Gamma 1,2 MeV	2361 ± 64	350 ± 33	7 ± 13

**Table III 8** : Influence de la concentration en dioxygène sur l'efficacité de production des radicaux hydroxyle entre 0 et 0,3 nM pour des NPo de 32 nm de diamètre non fonctionnalisées sous rayonnement gamma.

Sous atmosphère inerte de diazote:  $G_{HO•(N_2)} = (2361 \pm 64) \times [NPo] + 280 \text{ nmol.J}^{-1}$ , ce qui correspond à une valeur de HO• surproduits à 0,25 nM de 590 nmol.J<sup>-1</sup> contre 312 nmol.J<sup>-1</sup> pour des rayons X de 17,5 keV. Ainsi sous atmosphère inerte en présence de NPo, une production 4 fois plus importante de radicaux hydroxyle est observée comparativement à la radiolyse de l'eau seule. Cette augmentation est inattendue voire même spectaculaire (**Table III 8**). Il faut noter qu'en absence de dioxygène, les rayons gamma sont donc plus efficaces pour produire des radicaux hydroxyle que les rayons X. Sous atmosphère saturée en dioxygène, nous n'avons quantifié aucune surproduction de radicaux hydroxyle puisque  $G_{HO•(O_2)} = (7 \pm 13) \times [NPo] + 280 \text{ nmol.J}^{-1}$ . Ici encore, un impact important de la quantité de dioxygène en solution est mis en évidence. Par ailleurs, les rendements de production maximum sont également différents entre rayons X et gamma sous atmosphère inerte. Ces résultats sont très surprenants au regard des prédictions théoriques d'autant plus que l'effet d'oxygène mis en évidence pour un rayonnement gamma est plus prononcé que celui obtenu pour des rayons X.

### 5. Impact de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or

L'un de nos objectifs était d'étudier l'impact de la fonctionnalisation sur la production en radicaux hydroxyle. Des solutions de NPo fonctionnalisées ont été irradiées en présence de 0,5 mM de coumarine dans des conditions aérées. De ces irradiations, les valeurs de  $G_{HO\cdot}$  ont été extraites en mesurant la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en NPo comme précédemment. Dans cette partie, les  $G_{HO\cdot}$  représentent en fait un rendement en radicaux hydroxyle non « captés » par le recouvrement et donc les radicaux disponibles en solution plus qu'un rendement de formation.

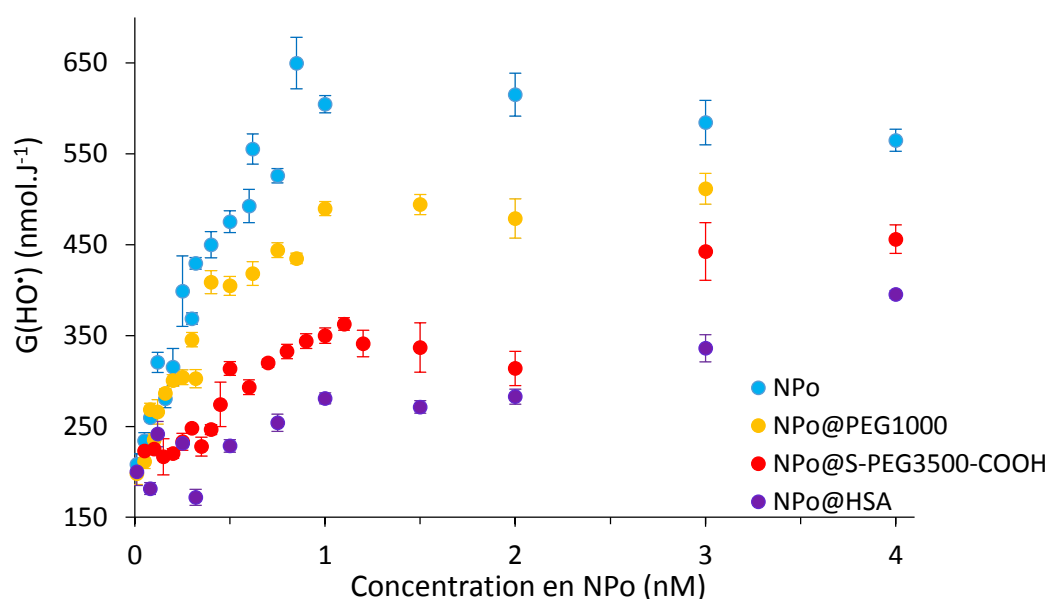


Figure III 32 : Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo pour quelques fonctionnalisations de NPo.

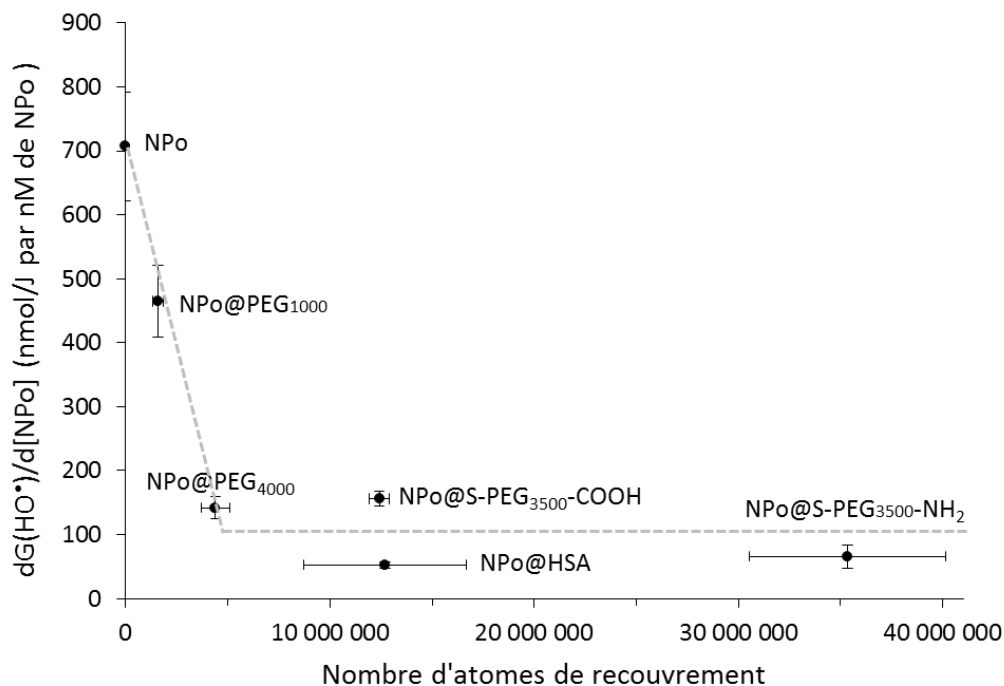
	air	N <sub>2</sub>
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo	$707 \pm 85$	$1248 \pm 102$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo@PEG <sub>1000</sub>	$465 \pm 56$	$702 \pm 100$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo@PEG <sub>4000</sub>	$142 \pm 17$	$898 \pm 86$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	$156 \pm 12$	$250 \pm 17$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	$66 \pm 18$	$159 \pm 6$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ NPo@HSA	$53 \pm 5$	$113 \pm 5$

Table III 9 : Impact de la fonctionnalisation sur l'efficacité de production de radicaux hydroxyle sous atmosphère inerte et aérée.

Ces résultats sont présentés Figure III 32 pour quelques NPo fonctionnalisées afin de ne pas surcharger la figure. L'allure des courbes obtenues est similaire que les NPo soient fonctionnalisées ou non. La première

partie de la courbe possède une pente  $dG_{HO\cdot}/d[NPo]$  qui représente l'efficacité des NPo à produire des radicaux hydroxyle (**Table III 9**). Pour les concentrations les plus élevées, la croissance des courbes ralentit jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Pour une dose d'irradiation d'un gray et un débit de dose de  $0,33 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ , 0,25 nM de NPo non fonctionnalisées apportent une quantité supplémentaire de radicaux hydroxyle de 159 nmol par rapport à la radiolyse de l'eau. A noter que cette valeur diminue de manière significative quel que soit le recouvrement : 107 nmol pour 0,25 nM de NPo@PEG<sub>1000</sub>, 12,5 nmol pour 0,25 nM de NPo@HSA. Nos mesures montrent clairement que la fonctionnalisation capte et/ou empêche une partie de la production de radicaux hydroxyle. Cependant, bien qu'elle soit faible, il reste toujours une production de radicaux excédentaire comparativement à celle obtenue en absence de NPo. Par exemple, pour les NPo@HSA, il reste une surproduction d'environ  $50 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  de radicaux hydroxyle par nM de NPo (**Table III 9**).

La comparaison des NPo@PEG<sub>1000</sub> et NPo@PEG<sub>4000</sub>, qui ont des diamètres hydrodynamiques similaires, montre que la quantité de radicaux hydroxyle mesurée est quatre fois plus élevée pour les NPo@PEG<sub>1000</sub> que pour les NPo@PEG<sub>4000</sub> (**Table III 3**). Compte tenu des diamètres hydrodynamiques mesurés en DLS et par conséquent du nombre d'atomes de recouvrement du PEG<sub>4000</sub> environ 4 fois plus grand que celui du PEG<sub>1000</sub> autour des NPo (**partie III.B.2.c**), nous proposons que la variation du rendement de production en radicaux hydroxyle avec la concentration en NPo dépend du nombre d'atomes total de recouvrement (**Figure III 33**). En comparant des PEG de masses moléculaires similaires avec ou sans fonction thiol, nous souhaitons mettre en évidence le rôle des atomes de soufre qui sont connus pour être de bons capteur d' $HO\cdot$ . La **Table III 9** et la **Figure III 33** mettent en évidence des rendements en radicaux hydroxyle similaires pour les NPo@PEG<sub>4000</sub> et les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH. Les atomes de soufres ne semblent pas avoir un effet significatif dans ce cas. Il faut noter que les atomes de soufre en question sont liés à la surface d'or, ils sont donc peut-être moins disponibles pour capter  $HO\cdot$ . Au contraire, la HSA possède des soufres au sein des acides aminés qui la composent, qui peuvent être exposés au solvant puis réagir avec les radicaux hydroxyle et ainsi réduire leur quantité en solution. Ainsi la faible différence de production de radicaux hydroxyle observée entre les NPo@HSA et les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH, qui possèdent des recouvrements ayant des nombres d'atomes similaires, pourrait être due à la présence de soufre accessibles dans le cas de la HSA.

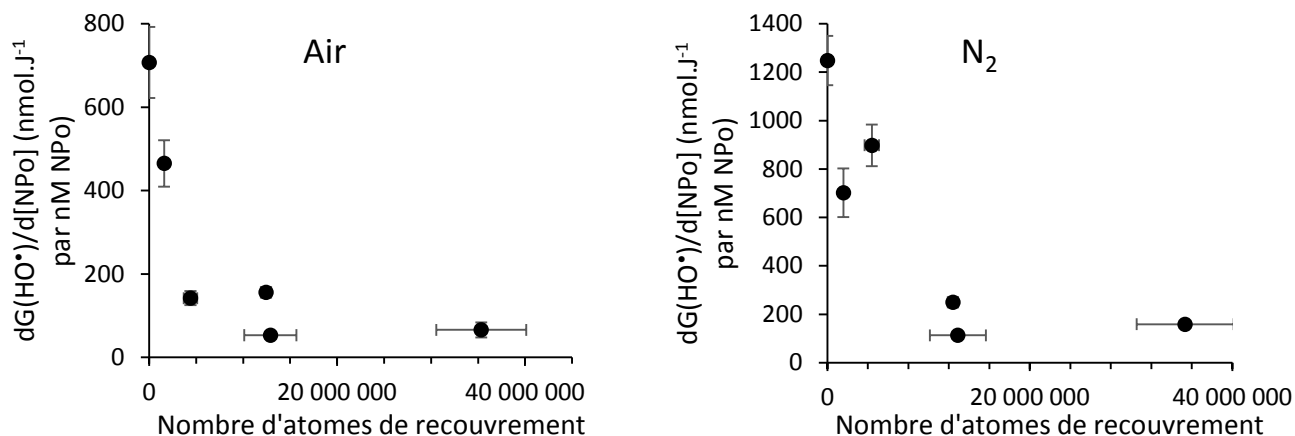


**Figure III 33** : Influence du nombre d'atomes de recouvrement des NPo sur l'efficacité de production des radicaux hydroxyle. Les lignes en pointillés sont seulement des guides pour les yeux.

La **Figure III 33** met en évidence une diminution linéaire de l'efficacité à produire des radicaux hydroxyle entre les NPo non fonctionnalisées et les NPo@PEG<sub>4000</sub>. Aussi, nous proposons que la quantité de radicaux hydroxyle disponibles en solution diminue linéairement avec le nombre d'atomes présents dans le recouvrement des NPo jusqu'à  $4 \times 10^6$  atomes de recouvrement. Pour des recouvrements plus grands, un minimum constant est observé. Ce plateau correspond à une surproduction moyenne de HO<sup>•</sup> d'environ  $50 \pm 25$  % comparativement à la radiolyse de l'eau seule.

Il est également intéressant d'étudier l'impact de la fonctionnalisation sur la production d'espèces radicalaires dans des conditions inertes (anaérobie). Nous avons donc effectué les expériences sous atmosphère N<sub>2</sub>. Les résultats obtenus sont répertoriés **Table III 9**.





**Figure III 34** : Influence du nombre d'atomes de recouvrement des NPo sur l'efficacité de production des radicaux hydroxyle. A gauche les résultats sous atmosphère aérée ; à droite les résultats sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>).

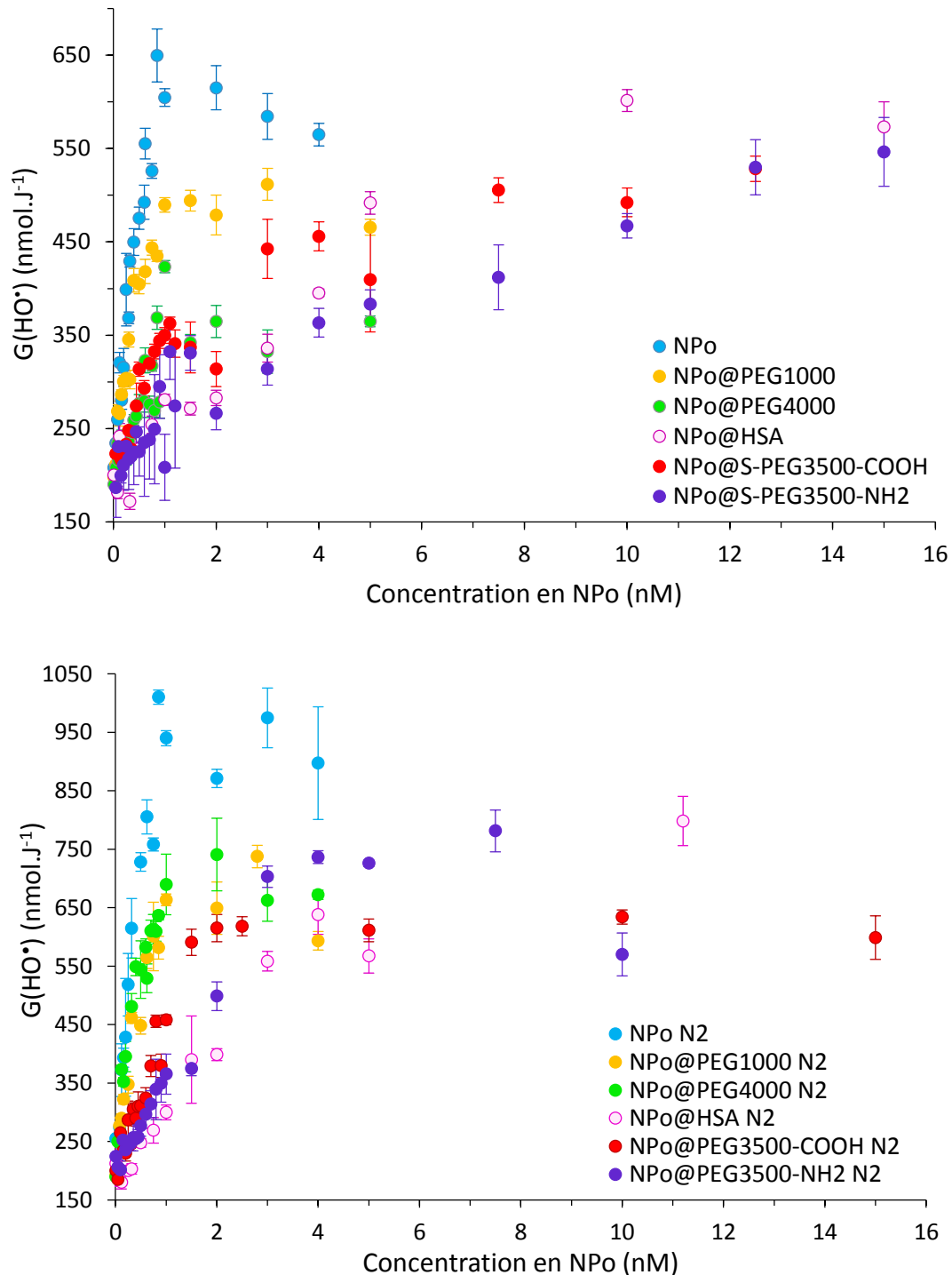
La **Figure III 34** représente les rendements en radicaux hydroxyle en fonction du nombre d'atomes du recouvrement sous air et diazote. Quelle que soit la fonctionnalisation des NPo, nous pouvons remarquer que la valeur obtenue sous atmosphère de diazote est plus grande que celle obtenue dans des conditions aérées. Ces résultats confirment le rôle important du dioxygène préalablement observé. Par ailleurs, l'impact de la fonctionnalisation sur la production de radicaux hydroxyle est similaire en présence ou en l'absence de dioxygène en solution. En effet, pour toutes les fonctionnalisations hormis les NPo@PEG<sub>4000</sub>, les pourcentages de perte d'efficacité de production des radicaux hydroxyle sont quasi-égaux sous atmosphères inerte et aérée (**Table III 10**). Sous atmosphère inerte, nous retrouvons donc l'impact drastique du recouvrement des NPo sur l'efficacité de production des radicaux hydroxyle précédemment énoncé, avec près de 90% de perte d'efficacité pour des recouvrements les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH, NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> et NPo@HSA.

	air	N <sub>2</sub>
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo (nmol.L <sup>-1</sup> par nM de NPo)	707 ± 85	1248 ± 102
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo@PEG <sub>1000</sub>	-35%	-44%
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo@PEG <sub>4000</sub>	-80%	-28%
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	-78%	-80%
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	-91%	-88%
$dG_{\text{HO}\cdot}/d[\text{NPo}]$ NPo@HSA	-92%	-91%

**Table III 10** : Pourcentages de perte d'efficacité de production des radicaux hydroxyle sous air et sous N<sub>2</sub> pour différents types de NPo fonctionnalisées comparativement à l'efficacité de production radicalaire mesurée pour des NPo non fonctionnalisées.

Les résultats décrits jusqu'ici se concentraient sur la variation des rendements en radicaux hydroxyle avec la concentration en NPo, c'est-à-dire sur la première partie de la courbe  $G_{\text{HO}\cdot} = f[\text{NPo}]$ . Nous nous sommes

également intéressés à l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur les rendements maximum en radicaux produits. La **Figure III 35** met en évidence les rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo jusqu'à 15 nM pour différentes fonctionnalisations sous air et sous N<sub>2</sub>.

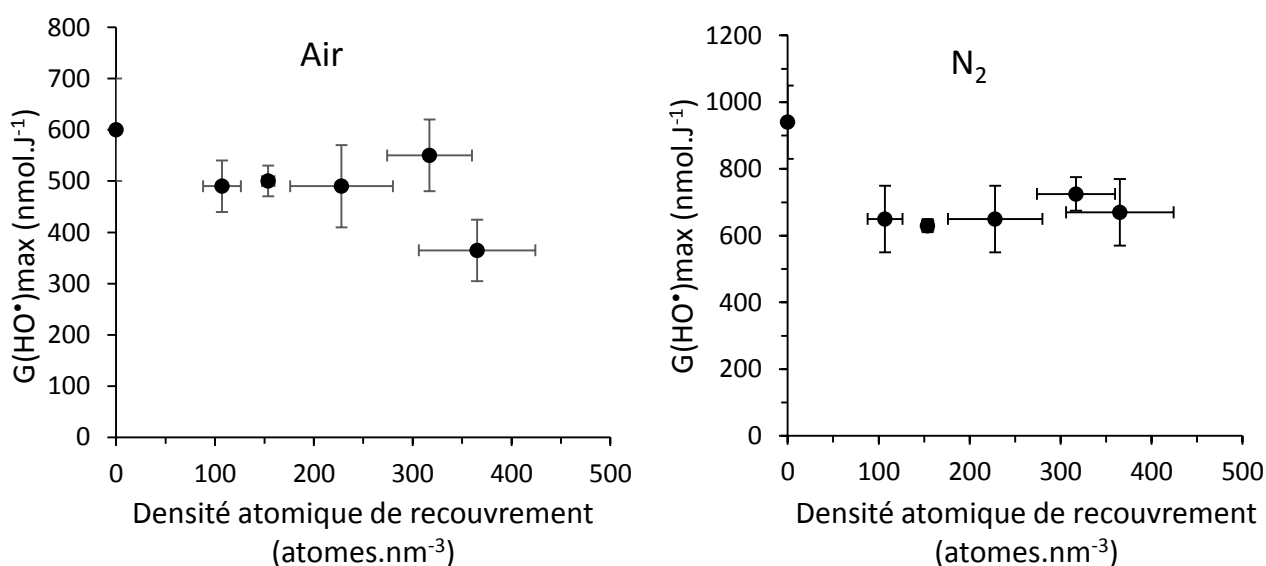


**Figure III 35 :** Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo pour différentes fonctionnalisations des NPo sous atmosphères aérée et inerte.

La **Figure III 35** montre que les plateaux correspondant aux rendements maximum de radicaux hydroxyle sont atteints à partir de concentrations en NPo différentes suivant le type de NPo fonctionnalisées. Par exemple, on peut estimer cette concentration à 1 nM pour des NPo non fonctionnalisées, des NPo@PEG<sub>1000</sub> et NPo@PEG<sub>4000</sub> et à 11 nM pour des NPo@HSA. On constate également des rendements maximum similaires pour tous les types de NPo fonctionnalisées avec une valeur d'environ 500 nmol.J<sup>-1</sup> sous air et 650 nmol.J<sup>-1</sup> sous diazote. Compte tenu de l'allure des plateaux, il n'est pas trivial d'en estimer la hauteur. C'est pourquoi l'incertitude sur les valeurs que nous donnerons est très grande. En effet, les hauteurs des plateaux et les incertitudes données par la suite représentent donc les moyennes et écarts types entre les valeurs extrêmes du rendement en radicaux hydroxyle maximal entre 1 et 15 nM. Le **Table III 11** donne alors les  $G_{\max}$  sous air et sous N<sub>2</sub> et la **Figure III 36** représente ces valeurs en fonction de la densité du recouvrement dans les mêmes conditions. Pour un type de NPo, cette valeur représente la quantité de radicaux hydroxyle maximale disponible en solution.

	air	N <sub>2</sub>
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo	600 ± 100	940 ± 110
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo@PEG <sub>1000</sub>	490 ± 50	650 ± 100
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo@PEG <sub>4000</sub>	365 ± 60	670 ± 100
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	500 ± 50	630 ± 20
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	550 ± 70	725 ± 50
$G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$ NPo@HSA	490 ± 80	650 ± 100

**Table III 11** : Impact de la fonctionnalisation sur le rendement de production maximal de radicaux hydroxyle sous atmosphère inerte et aérée.



**Figure III 36** : Dépendance du rendement maximal de production de radicaux hydroxyle en fonction de la densité atomique de recouvrement des NPo.

Au regard des valeurs reportées **Table III 11**, les résultats mettent à nouveau en évidence un effet d'oxygène. En effet, les valeurs obtenues sous atmosphère inerte sont toutes plus élevées que celles obtenues sous atmosphère aérée. Sous air ou sous atmosphère inerte, les résultats montrent qu'à partir de 150 atomes par nm<sup>3</sup> de recouvrement, une valeur constante du rendement maximal en radicaux hydroxyle est observée. Ce plateau correspond à une perte d'environ 30% sous atmosphère inerte et d'environ 20% sous air (hormis pour les NPo@PEG<sub>4000</sub>) comparativement au rendement de radicaux hydroxyle maximal obtenu pour des NPo non fonctionnalisées.

Compte tenu des incertitudes concernant la détermination de la hauteur du plateau et indépendamment de l'atmosphère, l'impact du recouvrement sur la production maximale de radicaux hydroxyle est similaire quel que soit le recouvrement (**Table III 12**). Il est en moyenne égal à 30% de perte par rapport aux NPo non fonctionnalisées. Ainsi la perte d'efficacité des NPo fonctionnalisées à produire des radicaux hydroxyle est moins importante pour de fortes concentrations en NPo, c'est-à-dire entre 1 et 15 nM. En effet, on rappelle qu'entre 0 et 0,3 nM de NPo, les rendements en radicaux hydroxyle étaient impactés, pour certains, à plus de 90% par la présence d'un recouvrement (**Table III 10**). Par ailleurs, la **Figure III 35** montre que lorsque la concentration en NPo augmente au-delà de la valeur maximale correspondant à  $G_{HO\bullet,max}$ , le rendement en radicaux hydroxyle diminue. Ainsi nos résultats montrent qu'il existe pour chaque type de NPo, une concentration optimale pour laquelle la production de radicaux hydroxyle est maximale.

	HO• air	HO•
$G_{HO\bullet,max}$ NPo (nmol.J <sup>-1</sup> )	600 ± 90	940 ± 110
$G_{HO\bullet,max}$ NPo@PEG <sub>1000</sub>	-18%	-31%
$G_{HO\bullet,max}$ NPo@PEG <sub>4000</sub>	-39%	-29%
$G_{HO\bullet,max}$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	-17%	-33%
$G_{HO\bullet,max}$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	-8%	-23%
$G_{HO\bullet,max}$ NPo@HSA	-18%	-31%

**Table III 12** : Pourcentages de perte la production maximale des radicaux hydroxyle sous air et sous N<sub>2</sub> pour différents types de NPo fonctionnalisées comparativement au  $G_{HO\bullet,max}$  mesuré pour des NPo non fonctionnalisées.

### Résumé :

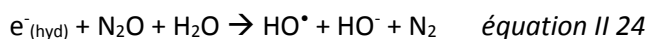
Dans cette partie nous avons mis en évidence une production massive de radicaux hydroxyle en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant. Nous avons montré une influence du rayonnement ainsi qu'un impact majeur de la quantité de dioxygène en solution. De plus, dans l'optique d'applications thérapeutiques, nous avons étudié l'influence de la fonctionnalisation des nanoparticules sur la production de radicaux

hydroxyle en solution. Tout d'abord, nous avons constaté une diminution drastique de la quantité de radicaux libres quantifiés en solution à mesure que le nombre d'atomes contenu dans le recouvrement des NPo augmente entre 0 et 0,32 nM. Nous avons de plus conclu que pour garder les NPo efficaces pour une production massive de radicaux hydroxyle et donc pour la radiosensibilisation dans cette gamme de concentrations, un recouvrement contenant moins de  $4 \times 10^6$  atomes est nécessaire. Par ailleurs, nous avons conclu que pour des concentrations en NPo plus élevées (entre 1 et 15 nM), l'impact du recouvrement est moindre et conduit à une diminution maximale de  $G_{HO\cdot\max}$  d'environ 30%. Ainsi, il existe pour chaque type de nanoparticule, une concentration optimale pour laquelle la production de radicaux hydroxyle est maximale.

Si la production de radicaux hydroxyle en présence de NPo provenait d'une radiolyse secondaire, elle devrait aller de pair avec la production d'électrons. Dans la partie suivante, nous nous attacherons donc à présenter la quantification des électrons en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant. Nous étudierons les mêmes paramètres que ceux déclinés pour la quantification des radicaux hydroxyle.

## E. Quantification de la production d'électrons en présence de nanoparticules d'or

Au sein de cette partie, nous nous sommes intéressés à la quantification des électrons produits en présence de NPo. Nous rappelons que la méthode est basée sur la conversion de l'électron en radical hydroxyle selon sa réaction avec le protoxyde d'azote :



Le rendement en radicaux hydroxyle sous atmosphère  $N_2O$  ( $G_{HO^\bullet(N_2O)}$ ) dans l'eau est alors égal à la somme de  $G_{HO^\bullet}$  et de  $G_{e^-}$  :

$$G_{HO^\bullet(N_2O)} = G_{HO^\bullet(N_2)} + G_{e^-} \quad \text{et donc} \quad G_{e^-} = G_{HO^\bullet(N_2O)} - G_{HO^\bullet(N_2)}$$

Il faudra donc comparer la valeur du rendement hydroxyle obtenue sous  $N_2O$  avec celle obtenue sous  $N_2$  qui nous fournira une quantification des  $HO^\bullet$  de référence sous atmosphère inerte ( $G_{HO^\bullet(N_2)}$ ).

De la même manière, il sera possible de quantifier les électrons sous atmosphère oxygénée en réalisant l'expérience sous atmosphère  $N_2O/O_2$  79 :21. Alors :

$$G_{HO^\bullet(N_2O/O_2)} = G_{HO^\bullet(air)} + G_{e^-(air)} \quad \text{et donc} \quad G_{e^-(air)} = G_{HO^\bullet(N_2O/O_2)} - G_{HO^\bullet(air)}$$

Il s'agit donc de quantifier les radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous différentes atmosphères: air,  $N_2$ ,  $N_2O$  et  $N_2O/O_2$ . Afin de faciliter la compréhension du phénomène advenant sous les différentes atmosphères étudiées, la

**Table III 13** résume les différentes espèces quantifiées par notre méthode sous chaque atmosphère.

Sans dioxygène		
$N_2$	$N_2O$	$N_2O-N_2$
$HO^\bullet$	$HO^\bullet, e^-$	$e^-$

21% dioxygène		
Air	$N_2O/O_2$	$N_2O/O_2 - Air$
$HO^\bullet$	$HO^\bullet, e^-$	$e^-$

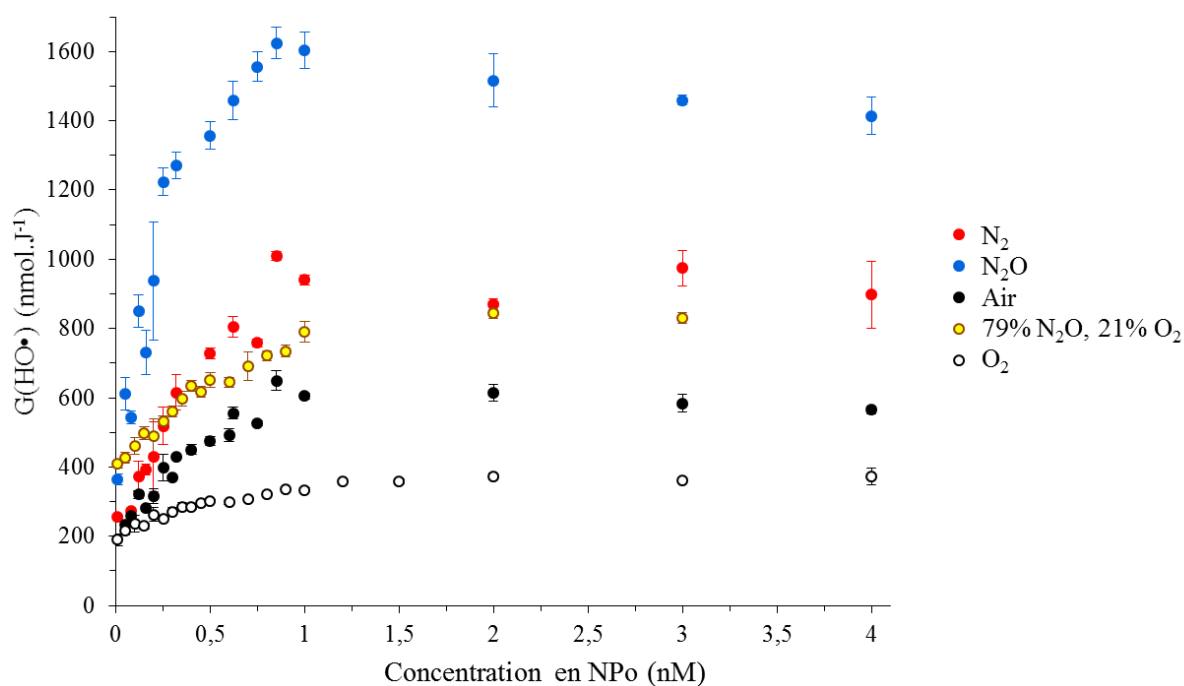
100% dioxygène
$O_2$
$HO^\bullet$

**Table III 13** : Espèces quantifiées par la coumarine sous différentes atmosphères.

## 1. Production massive

Les valeurs de  $G_{HO\cdot}$  ont été obtenues comme décrit dans la **partie III.C.4**. Les rendements  $G_{70H}$  ont ensuite été convertis en  $G_{HO\cdot}$  par extrapolation de la valeur de  $G_{70H}$  à 0 nM en NPo. Nous avons considéré que  $G_{HO\cdot(N_2O)} = 400 \pm 50 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  de même que  $G_{HO\cdot(N_2O/O_2)}$ .

La **Figure III 37** montre l'évolution des valeurs de  $G_{HO\cdot}$  en fonction de la concentration en NPo sous chaque atmosphère pour des NPo de 32 nm de diamètre non fonctionnalisées.



**Figure III 37** : Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous différentes atmosphères pour des rayons X de 17,5 keV ( $0,33 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Les valeurs de  $dG_{HO\cdot}/d[\text{NPo}]$  dans la gamme de concentration 0 - 0,3 nM ont donc été obtenues (**Table III 14**).

sans dioxygène	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O - N <sub>2</sub>
$dG_{HO\cdot}/d[\text{NPo}] \text{ RX } 17,5\text{keV}$	$2796 \pm 496$	$1248 \pm 158$	$1548 \pm 506$
21% dioxygène	N <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub>	Air	N <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub> - Air
$dG_{HO\cdot}/d[\text{NPo}] \text{ RX } 17,5\text{keV}$	$634 \pm 53$	$707 \pm 85$	$-73 \pm 80$
100% dioxygène	O <sub>2</sub>		
$dG_{HO\cdot}/d[\text{NPo}] \text{ RX } 17,5\text{keV}$	$258 \pm 33$		

**Table III 14** : Efficacités de production en radicaux hydroxyle entre 0 et 0,3 nM pour des NPo non fonctionnalisées sous différentes atmosphères pour des rayons X de 17,5 keV.

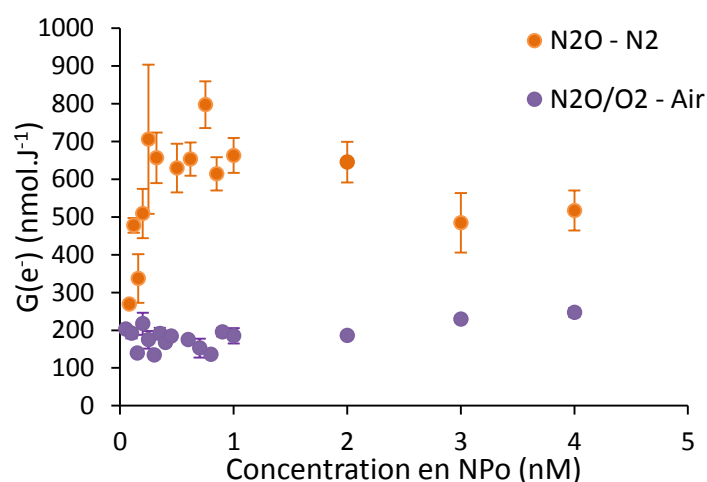
Sous atmosphère de protoxyde d'azote,  $G_{\text{HO}\cdot(\text{N}_2\text{O})} = G(\text{HO}\cdot + e^-) = (2796 \pm 496) \times [\text{NPo}] + 400 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ . Les résultats obtenus en présence de NPo montrent que le rendement de production en radicaux hydroxyle sous  $\text{N}_2\text{O}$  est proche de 2 fois celui obtenu sous  $\text{N}_2$  comme c'est le cas aussi en absence de NPo (**partie III.C.2.**). D'autre part,  $G_{\text{HO}\cdot\text{N}_2} = (1248 \pm 158) \times [\text{NPo}] + 200 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ .

Ainsi :  $G_{e^-} = G_{\text{HO}\cdot\text{N}_2\text{O}} - G_{\text{HO}\cdot\text{N}_2} = (1548 \pm 506) \times [\text{NPo}] + 200 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ .

Ici encore, il est très important de remarquer que ces quantités sont très grandes. Beaucoup d'électrons et de radicaux hydroxyle sont surproduits en présence de NPo. En effet, pour 0,25 nM de NPo, 387  $\text{nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  sont surproduits par rapport à la radiolyse de l'eau seule, soit des quantités presque 3 fois plus importantes. Par ailleurs, la comparaison entre les électrons et les radicaux hydroxyle surproduits par les NPo montre qu'en tenant compte des barres d'erreurs, ces quantités sont très proches.

Considérons maintenant une atmosphère aérée. Nous souhaitons quantifier les électrons sous 21% de dioxygène afin de mettre en évidence l'impact du dioxygène sur la production d'électrons. Sous atmosphère saturée avec le mélange  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  dans des proportions 79:21,  $G_{\text{HO}\cdot(\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2)} = (634 \pm 53) \times [\text{NPo}] + 400 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ , cette valeur est la même que sous air. Ici, il faut remarquer que nous nous sommes basés sur une production d'électrons en absence de NPo égale à 200  $\text{nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ . Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'électrons surproduits sous atmosphère oxygénée pour un rayonnement X de 17,5 keV puisque  $G_{e^-} = G_{\text{N}_2\text{O}-\text{N}_2} = (-73 \pm 80) \times [\text{NPo}] + 200 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ . Il semble donc que les électrons produits en présence de NPo aient des propriétés et des réactivités différentes des électrons produits par la radiolyse de l'eau puisque les électrons produits par radiolyse de l'eau sont captés préférentiellement par  $\text{N}_2\text{O}$  (plutôt que  $\text{O}_2$ ) sous  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  (**Figure III 17**).

La **Figure III 38** représente la production d'électrons en présence de NPo sous atmosphère oxygénée ou non dans toute la gamme de concentrations étudiée.



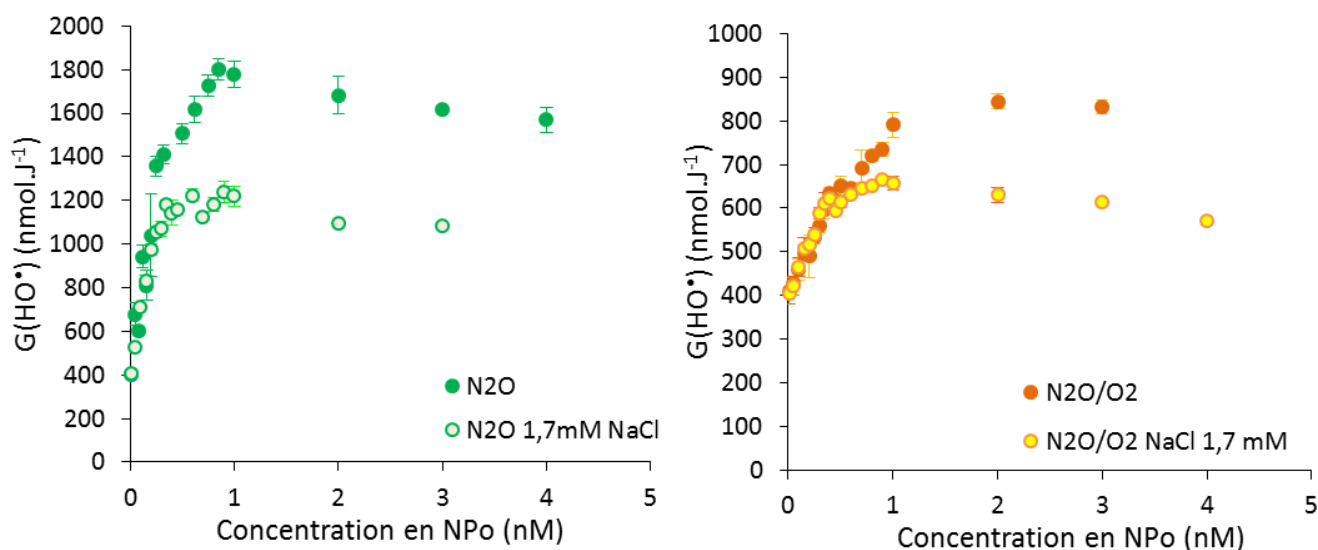
**Figure III 38** : Rendements en électrons en fonction de la concentration en NPo sous différentes atmosphères pour des rayons X de 17,5 keV (0,33 Gy·s⁻¹).



Sous air, les résultats mettent en évidence que quelle que soit la concentration en NPo entre 0 et 4 nM, aucune surproduction d'électron n'est observée. Sous atmosphère inerte, une surproduction maximale d'environ  $650 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  d'électrons est mesurée à partir de 0,3 nM de NPo. Ici encore cette quantité est très proche de la valeur de  $G_{\text{HO}\cdot\text{max}}$  égale à  $600 \pm 90 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$ . A partir de 2 nM de NPo, cette production décroît témoignant peut être de phénomènes de recombinaison.

## 2. Production d'espèces radicalaires en milieu salin (1,7mM NaCl)

Comme pour les radicaux hydroxyle, nous avons également mesuré les productions d'électrons sous atmosphère inerte dans une solution de NaCl à 1,7 mM. Les résultats obtenus sont présentés **Table III 7** et **Figure III 29**.



**Figure III 39 :** Rendements en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo sous  $\text{N}_2\text{O}$  en présence et en l'absence de 1,7 mM de NaCl.

Atmosphère inerte	$dG_{HO^{+e-}}/d[NPo]$		$dG_e/d[NPo]$
NPo non fonctionnalisées	$N_2O$	$N_2$	$N_2O - N_2$
$dG_{HO\bullet}/d[NPo]$	$2796 \pm 496$	$1248 \pm 158$	$1548 \pm 506$
$dG_{HO\bullet}/d[NPo]$ 1,7mM NaCl	$2753 \pm 146$	$1157 \pm 76$	$1596 \pm 70$

Conditions aérées	$dG_{HO^{+e-}}/d[NPo]$		$dG_e/d[NPo]$
NPo non fonctionnalisées	$N_2O/O_2$	Air	$N_2O/O_2 - Air$
$dG_{HO\bullet}/d[NPo]$	$634 \pm 53$	$707 \pm 85$	$-73 \pm 80$
$dG_{HO\bullet}/d[NPo]$ 1,7mM NaCl	$611 \pm 31$	$290 \pm 18$	$321 \pm 20$

**Table III 15** : Efficacités de production en radicaux hydroxyle entre 0 et 0,3 nM pour des NPo de 32 nm de diamètre non fonctionnalisées sous différentes atmosphères en présence et en l'absence de 1,7 mM de NaCl.

Sous atmosphère de protoxyde d'azote oxygénée ou non, ces résultats mettent en évidence des rendements de production en radicaux hydroxyle identiques en présence ou en l'absence de 1,7 mM de sel. En effet, la première partie de la courbe, entre 0 et 0,3 nM en NPo, est identique dans les deux cas (**Figure III 39**). Au-delà de 0,3 nM, dans le cas d'une solution dépourvue de sel nous observons une diminution de la valeur de la pente entre 0,3 et 1 nM jusqu'à l'apparition d'un plateau au-delà de 1 nM. Dans le cas d'une solution de NaCl à 1,7 mM, les productions d'électrons et de radicaux hydroxyle atteignent directement un plateau au-delà de 0,3 nM en NPo. La somme des rendements de production maximaux de radicaux hydroxyle et d'électrons est donc différente en présence ou en l'absence de NaCl. Ce phénomène avait également été mis en évidence pour les radicaux hydroxyle sous  $N_2$  (**partie III.B.3**).

Nous avons donc tracé la **Figure III 40** afin de mieux mettre en évidence l'influence de la présence de sel sur l'électron.

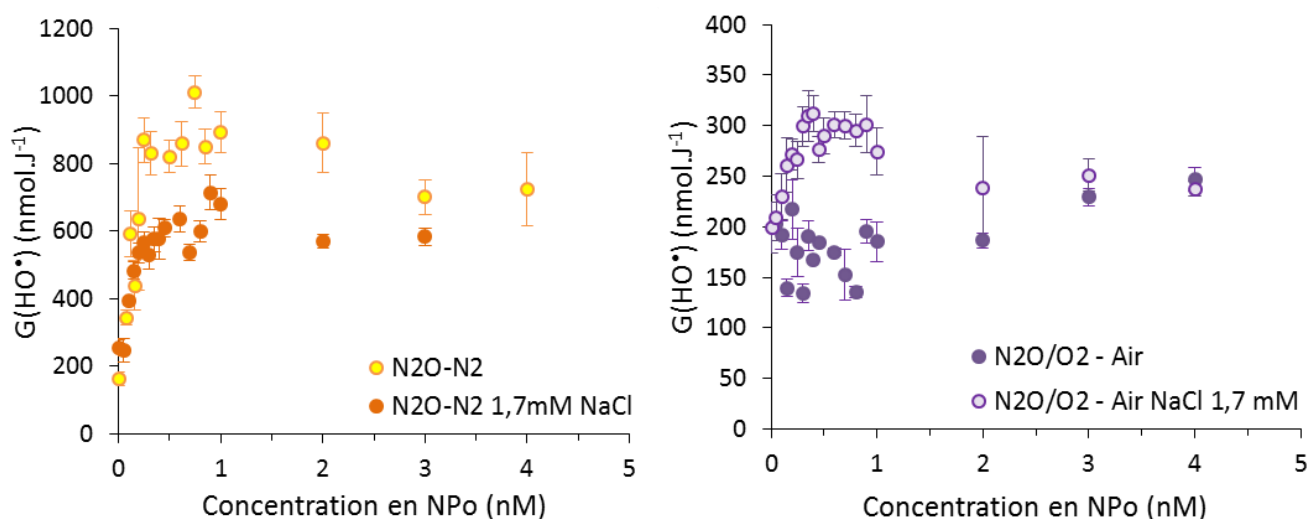


Figure III 40 : Rendements en électrons en fonction de la concentration en NPo en présence et en l'absence de 1,7 mM de NaCl.

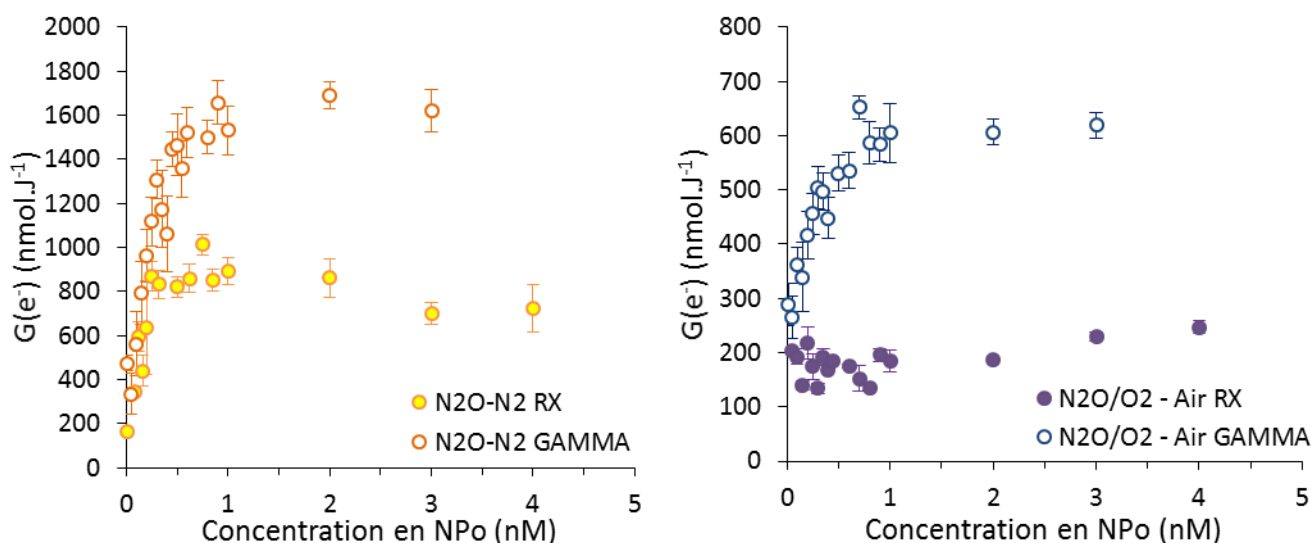
Sous atmosphère inerte, les résultats mettent en évidence des rendements de production d'électrons identiques avec ou sans sel. Au-delà de 0,3 nM, la production maximale d'électrons est impactée par la présence de sel. En effet, une diminution de 25% du  $G_{e-\max}$  est mesurée en présence de sel. Dans des conditions aérées, les résultats montrent que la présence de sel impacte le rendement de production d'électrons. Alors qu'aucune surproduction n'est observée en absence de sel, la présence de 1,7 mM de sel en solution conduit à une efficacité de production d'électrons  $dG_e/d[\text{NPo}] = 321 \pm 20 \text{ nmol.J}^{-1}$  par nM de NPo entre 0 et 0,3 nM. Au-delà de 0,3 nM un plateau est atteint et  $G_{e-\max} = 300 \text{ nmol.J}^{-1}$ . Puis cette valeur s'effondre entre 1 et 4 nM pour revenir à une surproduction d'électrons nulle.

Ici encore, nous mettons en évidence un rôle particulier du dioxygène moléculaire dans le processus de production d'espèces radicalaires en présence de NPo. En effet, dans le cas d'une atmosphère oxygénée, la présence d'oxygène influe sur les productions de radicaux hydroxyle (cf **partie III.D.3.**) et d'électrons en présence de sel. Alors que l'efficacité de production des radicaux hydroxyle diminue en présence de sel, celle des électrons augmente. Ces résultats sont inattendus puisque des tendances différentes sont observées pour les productions d'électrons et de radicaux hydroxyle, suggérant une décorrélation des productions de ces deux radicaux.

### 3. Influence du type de rayonnement (rayons $\gamma$ versus rayons X)

Comme pour les radicaux hydroxyle, nous avons quantifié les électrons sous rayonnement  $\gamma$ . Pour la conversion de  $G_{70H}$  en  $G_{HO\cdot}$ , nous nous sommes basés sur les valeurs de  $G_{HO\cdot}$  à 0 nM en NPo suivantes:  $G_{HO\cdot-N_2O} = G_{HO\cdot-N_2O/O_2} = 560 \pm 70 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  [Spinks, 1990].

La **Figure III 41** met en évidence l'influence du rayonnement sur les rendements de production d'électrons sous atmosphères aérée et inerte. La **Table III 16** donne les valeurs de  $dG_{HO\cdot}/d[NPo]$  dans une gamme de concentrations de 0 à 0,3 nM.



**Figure III 41:** Rendements en électrons en fonction de la concentration en NPo avec des rayons X ou gamma.

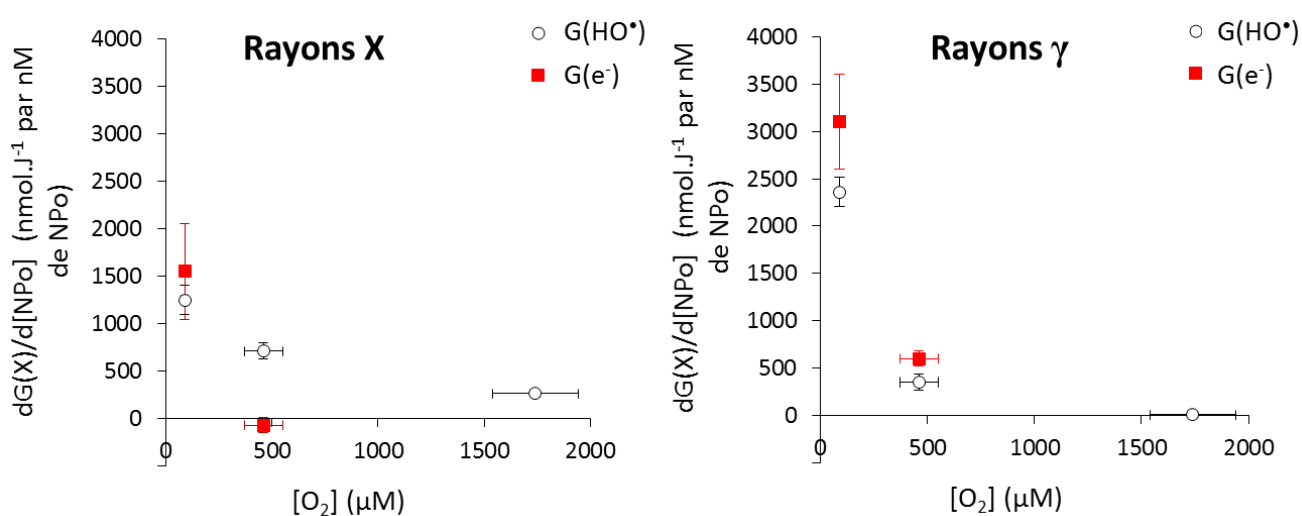
	$dG_{HO\cdot+e^-}/d[NPo]$		$dG_{e^-}/d[NPo]$
NPo non fonctionnalisées	$N_2O$	$N_2$	$N_2O - N_2$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ Gamma	$5466 \pm 373$	$2361 \pm 64$	$3105 \pm 309$
NPo non fonctionnalisées	$N_2O/O_2$	Air	$N_2O/O_2 - Air$
$dG_{HO\cdot}/d[NPo]$ Gamma	$950 \pm 104$	$350 \pm 33$	$600 \pm 71$

**Table III 16 :** Efficacités de production de radicaux entre 0 et 0,3 nM en présence de NPo non fonctionnalisées sous différentes atmosphères.

Sous atmosphère inerte, pour des rayons gamma,  $dG_{e^-}/d[NPo] = (3105 \pm 309) \times [NPo] + 280 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  entre 0 et 0,3 nM de NPo. A 0,25 nM de NPo, cela correspond à une valeur surproduite de  $776 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  d'électrons comparativement aux  $312 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  produits pour des rayons X. Par ailleurs, quelle que soit la concentration en

NPo entre 0 et 4 nM, la production d'électrons est deux fois plus importante sous rayonnement gamma que sous rayonnement X (**Figure III 41**). Sous atmosphère aérée,  $dG_{e^-}/[NPo] = (600 \pm 71) \times [NPo] + 280 \text{ nmol.J}^{-1}$ , soit une valeur surproduite à 0,25 nM de  $150 \text{ nmol.J}^{-1}$  d'électrons. Au-delà de 0,3 nM, la production d'électrons augmente selon la même allure de courbe de saturation décrite précédemment. A partir de 1 nM de NPo, le rendement de production maximal d'électrons est atteint et  $G_{e^- \text{max}} = 600 \text{ nmol.J}^{-1}$ .

Ainsi, quel que soit le rayonnement, en présence d'oxygène, les productions de radicaux hydroxyle et d'électrons sont toutes deux affectées. Cependant, cet impact est différent en fonction du rayonnement (**Figure III 42**).



**Figure III 42** : Variation de l'efficacité de production en radicaux hydroxyle et en électrons pour différentes concentrations en dioxygène et pour deux types de rayonnements : des rayons X de 17,5 keV et des rayons γ de 1,2 MeV. X symbolise HO\* ou l'électron.

Si pour un rayonnement γ, les évolutions des efficacités de production de HO\* et d'électrons sont similaires, pour un rayonnement X, ce n'est pas le cas. En effet, dans des conditions aérées, plus aucun électron n'est quantifié pour un rayonnement X, alors que pour un rayonnement γ, il reste encore 20% des électrons produits sous atmosphère inerte. Ces observations mettent en évidence une grande différence entre rayonnements X et γ, suggérant une grande différence des propriétés et donc des réactivités des électrons produits dans ces deux cas.

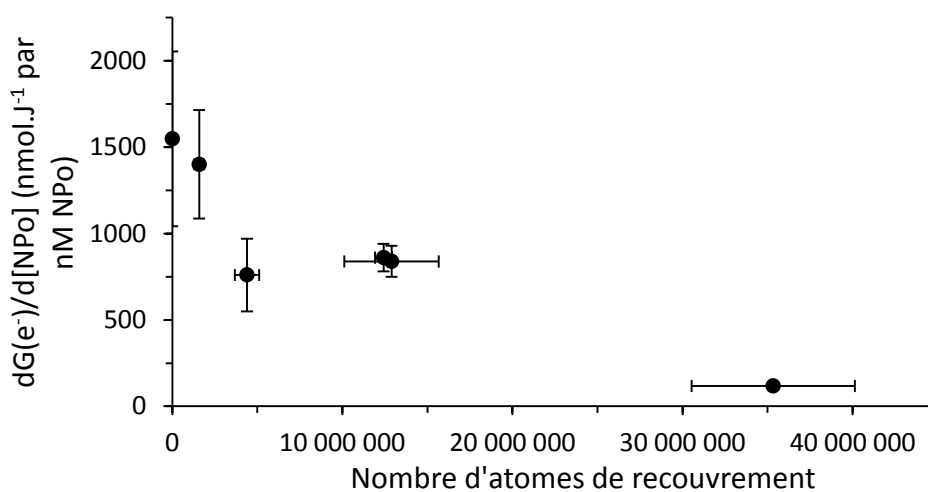
#### 4. Influence de la fonctionnalisation

Il est intéressant de quantifier l'impact de la fonctionnalisation sur la production d'électrons afin de comprendre dans quelle mesure les productions d'électrons et de radicaux hydroxyle sont liées ou non. Pour des rayons X de 17,5 keV, nous avons montré que tous les électrons sont captés par l'oxygène sous atmosphère

aérée. Nous avons donc étudié l'impact de la fonctionnalisation sur la production d'électrons sous atmosphère inerte. Nous avons donc effectué les expériences sous  $N_2$  et  $N_2O$  comme précédemment. Les résultats obtenus sont répertoriés **Table III 17** et les efficacités de production d'électrons calculées sont reportées sur un graphe en fonction du nombre d'atomes de recouvrement (**Figure III 43**).

	$dG_{HO^{\bullet+e^-}}/d[NPo]$		$dG_{e^-}/d[NPo]$
	$N_2O$	$N_2$	$N_2O - N_2$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo	$2797 \pm 496$	$1248 \pm 102$	$1549 \pm 506$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo@PEG <sub>1000</sub>	$2103 \pm 299$	$702 \pm 100$	$1401 \pm 315$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo@PEG <sub>4000</sub>	$1658 \pm 192$	$898 \pm 86$	$760 \pm 210$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	$1111 \pm 78$	$250 \pm 17$	$861 \pm 80$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	$277 \pm 18$	$159 \pm 6$	$118 \pm 19$
$dG_{HO^{\bullet}}/d[NPo]$ NPo@HSA	$952 \pm 90$	$113 \pm 5$	$839 \pm 90$

**Table III 17** : Valeurs des efficacités de production en radicaux hydroxyle pour différents types de NPo fonctionnalisées de 32 nm de diamètre sous  $N_2$  et  $N_2O$ .



**Figure III 43** : Influence de la fonctionnalisation des NPo sur l'efficacité de production en électrons: dépendance en fonction du nombre d'atomes constituant le recouvrement des NPo.

La **Figure III 43** rend compte de l'influence de la fonctionnalisation sur l'efficacité des NPo à produire des électrons quantifiables en solution. Ces résultats mettent en évidence une diminution de la quantité d'électrons lorsque le nombre d'atomes constituant le recouvrement des NPo augmente. Cette diminution pourrait être considérée comme linéaire hormis pour les NPo@PEG<sub>4000</sub>. Nous avons déjà mis en évidence un résultat déviant pour ce type de NPo en comparant les efficacités de production en radicaux hydroxyle sous air et sous  $N_2$  (**Figure III 34**). Peut-être cela suggère-t-il un problème avec le lot de PEG<sub>4000</sub> utilisé pour toutes

nos expériences? Une telle dépendance des productions d'électrons est compréhensible puisque les électrons éjectés doivent traverser la couche de fonctionnalisation pour s'en extraire. Ainsi plus le nombre d'atomes composant le recouvrement augmente, plus la probabilité de collision de l'électron éjecté est grande. Les électrons perdent alors progressivement leur énergie cinétique et moins il y a d'électrons capables de traverser l'intégralité du recouvrement.

Au cours des deux dernières parties, nous avons mesuré l'impact de la fonctionnalisation sur les productions de radicaux hydroxyle et d'électrons. La **Table III 18** donne les pourcentages de pertes de radicaux pour des NPo fonctionnalisées comparativement à la production quantifiée pour des NPo non fonctionnalisées.

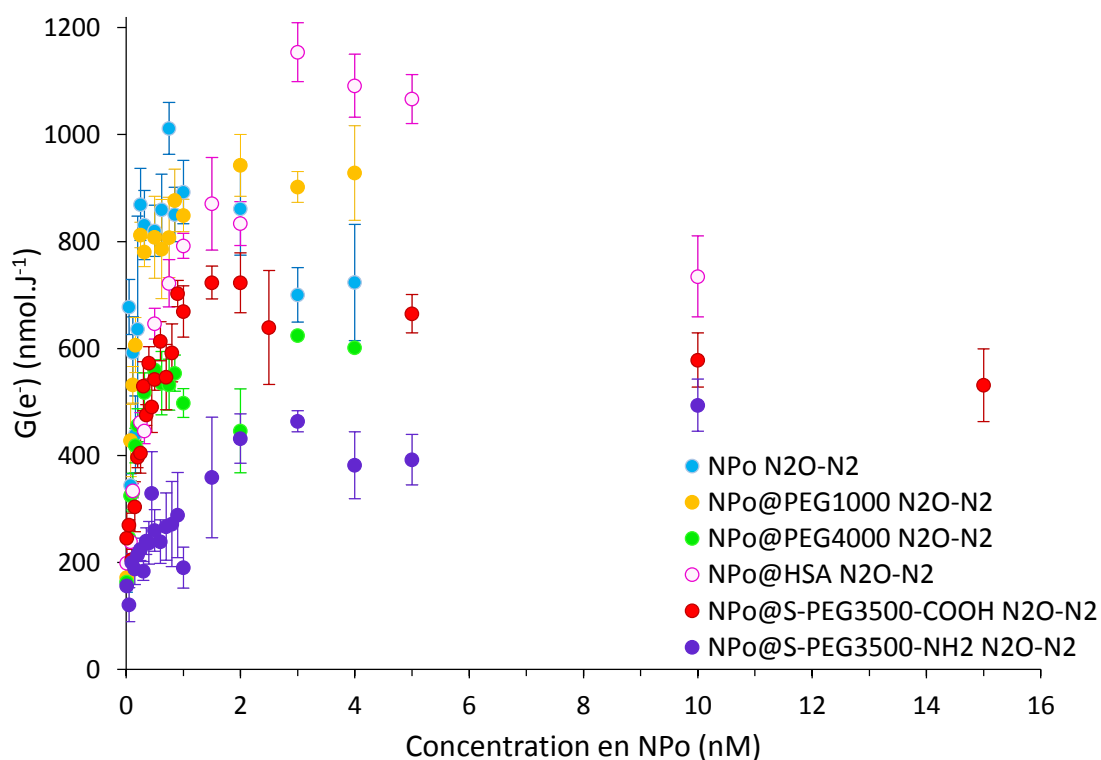
	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo (nmol.J <sup>-1</sup> par nM de NPo)	1248 ± 102	1549 ± 506
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo@PEG <sub>1000</sub>	-44%	-10%
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo@PEG <sub>4000</sub>	-28%	-51%
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	-80%	-45%
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	-88%	-93%
dG <sub>HO<sup>•</sup></sub> /d[NPo] NPo@HSA	-91%	-45%

**Table III 18** : Pourcentages de perte d'efficacité de production des radicaux hydroxyle et des électrons pour différents types de NPo fonctionnalisées comparativement à l'efficacité de production radicalaire mesurée pour des NPo non fonctionnalisées sous N<sub>2</sub>.

Sous atmosphère inerte, ce tableau confirme des évolutions différentes des pertes d'électrons et de radicaux hydroxyle en fonction du recouvrement. Il semble que les quantités d'électrons et de radicaux hydroxyle mesurées soient décorrélées l'une de l'autre. L'impact du recouvrement dépend donc, d'une part de sa nature, mais également du nombre d'atomes qui le composent. Pour des NPo@PEG<sub>1000</sub>, beaucoup de radicaux hydroxyle sont perdus (-40%) alors que l'impact sur la quantité d'électrons produits est faible (-10%). On pourrait alors penser que le PEG capte efficacement les radicaux hydroxyle. Or, pour un recouvrement du même type 4 fois plus dense (cas des NPo@PEG<sub>4000</sub>), 51% des électrons sont captés contre seulement 28% de radicaux hydroxyle. Les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH et NPo@HSA possèdent un nombre d'atomes de recouvrement similaire et peuvent donc nous permettre de comparer l'impact de la présence de nombreux atomes de soufre dans le recouvrement. Dans les deux cas, environ 80% des HO<sup>•</sup> et 45% des électrons sont captés par le recouvrement sachant que pour le PEG thiolé, les atomes de soufres sont liés à la surface des NPo et pour la protéine, ils sont dispersés dans le recouvrement. Il ne semble donc pas y avoir d'impact significatif de la présence d'atomes de soufre dans le recouvrement. Ce serait donc plutôt le nombre d'atomes de recouvrement identique de ces deux fonctionnalisations qui serait responsable d'une telle similitude. Les

NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> correspondent au recouvrement le plus important. Dans ce cas, environ 90% des radicaux hydroxyle et des électrons produits sont perdus. Comme discuté dans la partie II.B.4, il n'est pas possible de quantifier l'impact de la charge sur les productions d'électrons et de radicaux hydroxyle puisque deux paramètres varient entre les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> et les NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH: la charge et le nombre d'atomes de recouvrement.

Les résultats décrits ci-dessus se concentraient sur les efficacités de production en électrons, c'est-à-dire sur la première partie de la courbe de quantification en fonction de la concentration en NPo. A présent, nous allons nous intéresser à l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur les rendements maximum en électrons produits. La **Figure III 44** met en évidence les rendements de formation de l'électron en fonction de la concentration en NPo jusqu'à 15 nM pour différentes fonctionnalisations sous atmosphère inerte.



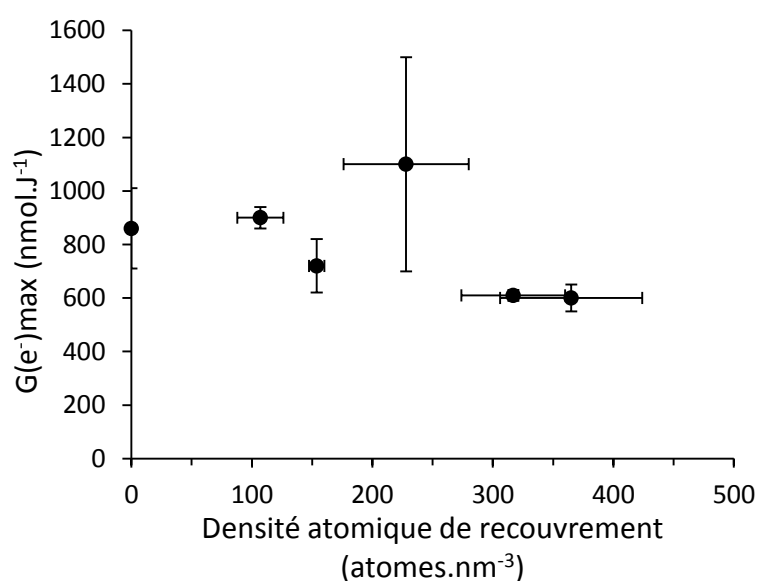
**Figure III 44:** Rendements en électrons en fonction de la concentration en NPo pour différentes fonctionnalisations des NPo sous atmosphère inerte.

La **Figure III 44** montre que les plateaux correspondant aux rendements maximum d'électrons sont atteints à partir de concentrations en NPo différentes suivant le type de NPo fonctionnalisées comme pour les  $G_{HO\cdot max}$ . Les hauteurs des incertitudes des plateaux ont été déterminées comme précédemment et sont données **Table III 19** et mettent en évidence un impact du recouvrement sur le rendement maximal d'électrons. La **Figure III 45** représente les valeurs de  $G_{e\cdot max}$  en fonction de la densité du recouvrement sous atmosphère inerte.



	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>
G <sub>max</sub> NPo	940 ± 110	860 ± 150
G <sub>max</sub> NPo@PEG <sub>1000</sub>	650 ± 100	900 ± 40
G <sub>max</sub> NPo@PEG <sub>4000</sub>	670 ± 100	600 ± 50
G <sub>max</sub> NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -COOH	630 ± 20	720 ± 100
G <sub>max</sub> NPo@S-PEG <sub>3500</sub> -NH <sub>2</sub>	725 ± 50	610 ± 20
G <sub>max</sub> NPo@HSA	650 ± 100	1110 ± 400

**Table III 19:** Impact de la fonctionnalisation sur les rendements de production maximum d'électrons et de radicaux hydroxyle sous atmosphère inerte.



**Figure III 45:** Dépendance du rendement maximal de production d'électrons en fonction de la densité atomique de recouvrement des NPo.

Sous atmosphère inerte, les résultats montrent une faible diminution de  $G_{e-max}$  en fonction de la densité du recouvrement jusqu'à 30% pour 365 atomes.nm<sup>-3</sup> de recouvrement comparativement à des NPo non fonctionnalisées. Au regard des valeurs reportées **Table III 19**, les résultats montrent des impacts similaires du recouvrement sur les rendements de production maximum d'électrons et de radicaux hydroxyle.

Au sein de cette partie, nous avons présenté la première quantification de la production d'électrons en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant. A nouveau, nous avons mis en évidence une influence du rayonnement incident et de la quantité de dioxygène en solution. L'influence de la fonctionnalisation sur l'efficacité de production des électrons a montré une diminution linéaire en fonction du nombre d'atomes de

recouvrement menant à 90% de perte de cette efficacité. Par ailleurs, nous avons confirmé que la concentration en NPo optimale pour laquelle les productions de radicaux hydroxyle et d'électrons sont maximales est dépendante du type de NPo. Nous avons alors conclu que pour des concentrations en NPo plus élevées (entre 1 et 15 nM), l'impact du recouvrement est plus faible et conduit à une diminution de  $G_{e-max}$  maximale de 30%. La partie suivante de ce travail s'attache à la discussion de tous les résultats de quantification des espèces radicalaires obtenues dans ce travail.

## F. Discussion, aspect mécanistique

Des nanoparticules de 32 nm de diamètre ont été synthétisées par la méthode de Turkevitch et différentes fonctionnalisations ont été réalisées et caractérisées finement par multiplication de techniques d'analyse complémentaires (**Table III 20**). Nous avons établi un protocole fiable et reproductible, permettant le dosage des radicaux hydroxyle et des électrons en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant, comme discuté dans la **partie III.C**. Nous avons mis en évidence plusieurs interférences à ce dosage comme par exemple une extinction de la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine en présence de NPo. Il était donc indispensable de réaliser un ensemble de contrôles pour s'assurer de la validité de ce protocole. L'importance d'un tel protocole est qu'il peut être généralisé à tous les types de nano-objets aujourd'hui étudiés pour des applications biologiques (quantum dots, nanoparticules d'autres métaux) sous couvert des vérifications nécessaires à sa validation.

Le dosage des radicaux hydroxyle et des électrons en fonction de la concentration en NPo a mis en évidence une dépendance à l'allure de courbes de saturation décomposables en 3 parties. La première partie de cette courbe correspond à une augmentation linéaire de la production de radicaux avec la concentration molaire en NPo représentant leur rendement de formation. Ces rendements ont été étudiés en fonction de différents paramètres tels que la présence de dioxygène et de sel, l'impact de la fonctionnalisation des NPo ou encore l'influence du rayonnement incident. Pour des concentrations plus élevées de NPo, un ralentissement de la production conduit à l'apparition d'un maxima représentant le rendement maximal de formation des radicaux. Une augmentation supplémentaire de la concentration en NPo conduit à un plateau et/ou à une décroissance du rendement de production en espèces radicalaires. Cette allure pourrait être due à des phénomènes de recombinaison entre radicaux ou entre radicaux et NPo favorisés par leur quantité de plus en plus importante. L'ensemble de nos résultats montre que l'environnement local des NPo joue un rôle majeur sur les productions maximales de radicaux. En effet, les courbes obtenues en présence d'une faible quantité de sel ont montré une forte variation de la hauteur du plateau. La présence d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  en solution pourrait affecter les phénomènes de recombinaison en surface des NPo. Ainsi la concentration en NPo à partir de laquelle le plateau est atteint peut être modifiée, et cet impact se répercute sur la hauteur du plateau et donc le rendement de production maximal en radicaux. Nous avons également montré que le rendement maximal en radicaux est influencé par la présence d'un recouvrement à la surface des NPo. Ainsi, la présence locale d'ions ou de ligands au voisinage de la surface des NPo sont des facteurs importants pour le processus de radiosensibilisation.

## 1. Production massive

L'ensemble des efficacités de production déterminées est reporté **Table III 20**.

	ATMOSPHERE				
	INERTE		AEREE		SATUREE EN O <sub>2</sub>
RAYONS X 17,5 keV	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>	HO <sup>•</sup>
<i>NPo</i>	1248 ± 102	1549 ± 506	707 ± 85	-73 ± 80	258 ± 33
<i>NPo@PEG<sub>1000</sub></i>	702 ± 100	1401 ± 315	465 ± 56		
<i>NPo@PEG<sub>4000</sub></i>	898 ± 86	760 ± 210	142 ± 17		
<i>NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-COOH</i>	250 ± 17	861 ± 80	156 ± 12		
<i>NPo@S-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub></i>	159 ± 6	118 ± 19	66 ± 18		
<i>NPo@HSA</i>	113 ± 5	839 ± 90	53 ± 5		
<i>NPo 1,7 mM NaCl</i>	1157 ± 76	1596 ± 70	290 ± 18	321 ± 20	
RAYONS GAMMA 1,2 MeV	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>	HO <sup>•</sup>	e <sup>-</sup>	HO <sup>•</sup>
<i>NPo</i>	2361 ± 64	3105 ± 309	350 ± 33	600 ± 71	7 ± 13

**Table III 20:** Rendements de production des espèces radicalaires déterminés dans cette étude. Les rendements sont exprimés en nmol.J<sup>-1</sup> par nM de NPo. Différentes atmosphères et différents paramètres ont été étudiés (fonctionnalisation des NPo, type de rayonnement, présence de sel).

Le premier résultat frappant est la production massive de radicaux mesurée, inattendue par les prédictions physiques. Considérant l'interaction entre rayons ionisants et NPo, nous pouvons calculer l'absorption supplémentaire due à la présence de nanoparticules en solution à l'aide des coefficients d'absorption massiques (**partie II.C.2**). Des NPo de 32 nm de diamètre sont composées d'environ un million d'atomes d'or par nanoparticule (59 atomes.nm<sup>-3</sup> [Kittel, 1996]). Les coefficients d'absorption massiques de l'or et de l'eau sont respectivement égaux à 1,106 x 10<sup>2</sup> cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> et 1,118 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour des rayons X de 17,5 keV et à 5,971 x 10<sup>-2</sup> cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> et 6,457 x 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour des rayons γ de 1,2 MeV [NIST]. Le supplément d'absorption des rayons X dû à l'or pour un échantillon contenant 1 nM de NPo (équivalent à une fraction massique de 2,07 x 10<sup>-4</sup>) est alors donné par : 2,07 x 10<sup>-4</sup> x 1,106 x 10<sup>2</sup> / (1,118) = 2,04 x 10<sup>-2</sup>. De même pour un rayonnement γ : 2,07 x 10<sup>-4</sup> x 5,971 x 10<sup>-2</sup> / (6,457 x 10<sup>-2</sup>) = 1,91 x 10<sup>-4</sup>. L'augmentation de l'énergie des rayons X déposée dans l'échantillon est donc de 2% par nM de NPo et de 0,02% pour des rayons γ. Dans un premier temps, nous pouvons supposer que toute l'absorption supplémentaire due à l'or est à l'origine de la

surproduction d'électrons dans le milieu en présence de NPo comparativement à la radiolyse de l'eau seule. Alors, la concentration en électrons générée en fonction de la concentration en NPo peut être estimée à  $200 \times 0,02 = 4,0 \text{ nmol.J}^{-1}$  d'électrons par nM de NPo puisque  $G_{e^-} = 200 \text{ nmol.J}^{-1}$  [Fulford, 2001] pour des rayons X. Respectivement, pour des rayons  $\gamma$ ,  $280 \times 1,91 \times 10^{-4} = 0,05 \text{ nmol.J}^{-1}$  d'électrons par nM de NPo pourraient être produits puisque  $G_{e^-} = 280 \text{ nmol.J}^{-1}$  [Spinks, 1990]. Cette production est bien plus faible que la quantité d'électrons mesurée. L'absorption physique due à l'or n'est donc pas capable de rendre compte du phénomène compte tenu de la très faible masse d'or présente en solution. Les quantités massives de radicaux quantifiées ont suscité de nombreuses interrogations, en particulier, comment rendre compte de telles quantités de radicaux produits ?

### ***Un effet local ?***

Une première hypothèse serait une concentration locale en coumarine à la surface des NPo qui augmenterait l'efficacité de la capture du radical hydroxyle par la coumarine et par conséquent la quantité de radicaux dosée. En effet, la répartition spatiale de la coumarine n'est pas homogène en solution, alors que les valeurs de rendements radiolytiques  $G$  que nous donnons en présence de NPo correspondent à des productions moyennes en solution. Cependant, il faut remarquer que nos mesures sous atmosphère inerte sont identiques en présence de 1,7 mM de NaCl à celles réalisées sans sel (**Table III 20**). Or nous avons montré que le sel a un rôle majeur dans l'interaction coumarine-NPo puisqu'il influe sur le nombre de coumarines adsorbées à la surface des NPo. S'il s'agissait d'un effet local, un impact non négligeable de la présence de sel devrait être observé, ce qui n'est pas le cas. Ainsi, nous pouvons exclure le fait qu'un effet local rende compte des quantités massives de radicaux mesurées.

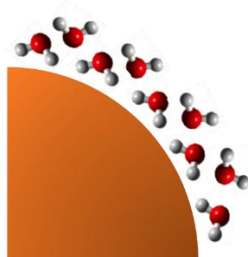
### ***La dose ?***

Une deuxième hypothèse permettant d'expliquer les grandes valeurs de rendements mesurées pourrait être liée à la définition du rendement radiolytique. Ce dernier est défini comme le rapport entre la quantité de matière d'une espèce issue de la radiolyse et la quantité d'énergie absorbée (c'est-à-dire la dose). Dans cette étude, nous avons effectué de nombreux contrôles afin d'assurer la quantification des radicaux mesurés. Mais la dose utilisée dans ce calcul de rendement pourrait être remise en question. En effet, nous avons considéré la dose dans la solution colloïdale comme l'équivalent de la dose dans l'eau. En effet, le calcul précédent utilisant les coefficients d'absorption massique montre une augmentation de la dose de 2% pour des atomes d'or répartis en solution. Cependant, nos résultats montrent que ces coefficients ne sont pas adaptés pour rendre compte du phénomène de radiosensibilisation par les NPo. Il serait donc possible que l'état colloïdal des NPo soit à la base d'une augmentation de la dose en solution. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait donc nécessaire d'établir une dosimétrie absolue en présence de NPo. La réalisation de ce

type d'expérience est loin d'être triviale. En effet, ces mesures nécessitent un dispositif spécial ainsi qu'une maîtrise de la pureté et du contenu en gaz dissous de l'eau, afin de mesurer l'élévation de la température au sein du calorimètre sous irradiation en présence de NPo [Rapp, 2010].

### ***Un processus catalytique ?***

Une troisième hypothèse n'exclut pas que les NPo puissent être à l'origine d'un processus catalytique qui rendrait la radiolyse particulièrement efficace. Il a été proposé, sur la base de calculs théoriques, que les couches d'eau aux interfaces eau-solide soient structurées [Carrasco, 2012; Saavedra, 2014; Soussi, 2013] (**Figure III 46**). Il s'ensuit la formation de liaisons hydrogène supplémentaires entre les molécules d'eau à la surface des NPo, affaiblissant les liaisons H-O par allongement ou rétrécissement des liaisons intramoléculaires. Ces liaisons sont contraintes et pourraient donc être plus faciles à rompre. Les électrons éjectés de la nanoparticule ou produits par radiolyse en solution seraient alors susceptibles de casser ces liaisons plus facilement pour produire HO<sup>•</sup> et H<sup>•</sup>. Aurait alors lieu une catalyse hétérogène de la dissociation d'une molécule d'eau. Si une telle catalyse pouvait être responsable d'une forte production de radicaux hydroxyle en solution, elle n'expliquerait pas la production massive d'électrons quantifiée.



**Figure III 46** : Schéma d'une couche d'eau structurée à la surface d'une NPo.

Considérons à présent les différentes voies mécanistiques possibles afin de rendre compte de l'origine des radicaux mesurés.

## 2. Mécanisme de production

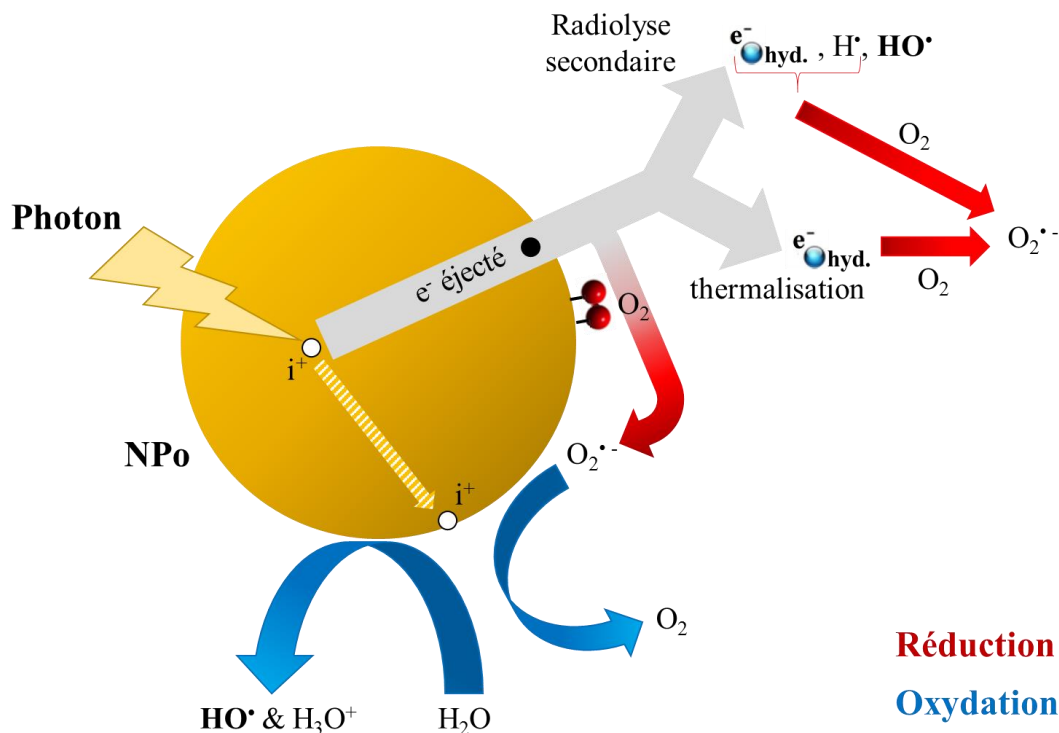
### ***Une radiolyse secondaire ?***

Afin d'expliquer l'effet radiosensibilisateur des NPo, il est généralement proposé dans la littérature que, sous rayonnement ionisant, les nanoparticules émettent des électrons responsables d'une radiolyse secondaire en solution lors de leur interaction avec le rayonnement [Butterworth, 2013]. Les électrons énergétiques générés (photoélectrons, électrons Auger) par effet photoélectrique (rayons X) ou Compton (rayons  $\gamma$ ) pourraient être considérés comme une source secondaire de radiolyse et ainsi produire des électrons hydratés et des radicaux hydroxyle supplémentaires. Mais ils pourraient également se thermaliser. Le processus de thermalisation implique de nombreuses collisions entre les électrons et les molécules d'eau du milieu. L'électron perd petit à petit son énergie et devient un électron de basse énergie (EBE ;  $E < 30\text{eV}$ ). Il est depuis longtemps connu qu'un métal soumis à un rayonnement X produit des EBE [Henke, 1977]. Ce n'est que plus récemment que plusieurs groupes se sont penchés sur la production d'EBE par des NPo soumises à des photons [Casta, 2014a; Casta, 2014b; Chow, 2012]. Ces études mettent en évidence la production directe d'une cascade d'EBE ou indirecte via la production d'électrons ou de photons secondaires par les NPo. Ces EBE sont connus pour être très réactifs et capables d'induire des lésions à l'ADN ou à d'autres biomolécules [Boudaïffa, 2000; Sanche, 2005] via un processus d'attachement électronique dissociatif. Cependant toutes les connaissances concernant les EBE proviennent d'études théoriques ou d'expériences menées en phase gaz ou solide, sous vide voire même sous ultra-vide. Il serait donc intéressant de mettre en évidence l'effet de ces électrons en solution aqueuse et leur capacité à dissocier l'eau pour produire  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{H}^\bullet$  de manière très efficace.

Ce mécanisme de radiolyse secondaire implique des productions d'électrons et de radicaux hydroxyle en quantités égales. Cependant, plusieurs résultats de cette thèse ne sont pas en accord avec une production exclusive de radicaux par cette voie. En effet, sous rayonnement  $\gamma$ , la production d'électrons est 30% plus élevée que la production de radicaux hydroxyle. De même, sous rayonnement X, une même production d'espèces réductrice et oxydante n'est pas totalement respectée. Par ailleurs, l'ajout d'une faible quantité de sel en solution a montré un impact opposé sur les quantités d'électrons et de radicaux hydroxyle produites lors d'une irradiation X dans des conditions aérées. En effet, la production de radicaux hydroxyle diminue de 50% en présence de 1,7 mM de NaCl comparativement à la même expérience sans sel, alors que la production d'électrons mesurée en présence de sel est réduite à zéro en l'absence de sel. Ce comportement opposé de la production de ces deux radicaux nous amène donc à considérer une nouvelle voie mécanistique décorrélant leurs origines. De plus, ce travail a mis en évidence un impact différent du recouvrement des NPo sur ces

productions sous atmosphère inerte (**Figure III 34, Figure III 36, Figure III 43, Figure III 45**). Ce qui ne semble pas être compatible avec une production de radicaux uniquement par radiolyse secondaire.

C'est pourquoi nous proposons le schéma suivant pour expliquer la production d'espèces radicalaires par des NPo soumises à un rayonnement ionisant (**Figure III 47**).



**Figure III 47:** Représentation schématique des processus proposés pour rendre compte des quantités très élevées d'électrons et de radicaux hydroxyle dosés dans des solutions irradiées de NPo.

L'interaction entre des photons de haute énergie et une nanoparticule conduit à l'éjection d'électrons qui va de pair avec l'apparition de lacunes en surface ( $e^-$ ,  $i^+$ ). Les électrons éjectés peuvent alors directement se recombiner avec une NPo, se thermaliser ou encore générer une radiolyse secondaire dans le milieu et produire ainsi des espèces radicalaires secondaires ( $HO^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ,  $e^-_{\text{hyd.}}$ ). Quelle que soit leur voie de formation, les électrons hydratés sont quantifiés par notre protocole de dosage en présence de  $N_2O$ . Quelques réactions de réduction pourraient survenir en surface, comme par exemple la réduction d'éventuelles molécules de citrate résiduelles. L'ion  $H_3O^+$  pourrait également réagir en surface pour former  $H_2$ , cette dernière espèce ayant été observée en grande quantité pour des NPo de tailles et de concentrations plus élevées que dans cette étude [Merga, 2006]. En plus de cette radiolyse secondaire, une production supplémentaire de radicaux hydroxyle pourrait être causée par réaction d'une molécule d'eau avec le cation  $i^+$ , peut être via la formation de  $H_2O^{++}$



[Ma, 2013]. Ce schéma révèle donc deux voies de production parallèles : une radiolyse secondaire et la formation du radical hydroxyle par le cation  $i^+$ .

### ***Ce nouveau mécanisme supporte-t-il la comparaison avec nos résultats expérimentaux ?***

Un très fort impact de la quantité d'oxygène moléculaire sur les rendements en radicaux a été mis en évidence. Considérant ce nouveau schéma, l'impact du dioxygène sur les productions radicalaires mesurées peut être expliqué en considérant la formation d'une paire d'ionisation ( $e^-$ ,  $i^+$ ). Les électrons éjectés des NPo se thermalisent et sont ensuite captés par  $O_2$  pour former des anions superoxyde.  $O_2^{\cdot-}$ , produit près de la surface des NPo, peut alors réagir avec le cation pour former une nouvelle molécule de dioxygène. Cette hypothèse a déjà été proposée dans le cas de semi-conducteur où  $O_2$  réagit avec le trou pour former  $O_2^{\cdot-}$  [Fujishima, 2000]. Une forte affinité du dioxygène avec la surface des NPo a été proposée sur la base de calculs théoriques. S'il est communément admis qu'une telle affinité est énergétiquement défavorable pour l'or massif, l'adsorption et la dissociation de  $O_2$  à la surface de nanoparticules ont été largement proposées [Boronat, 2010; Franceschetti, 2003; Jiang, 2009; Lopez, 2002; Mills, 2003; Remediakis, 2005; Roldán, 2009].  $O_2$  pourrait être ancré à la surface et s'insérer dans les liaisons Au-H pour former Au-OOH [Campbell] ou O-Au-O [Franceschetti, 2003]. Dans tous les cas, la littérature est unanime sur l'interaction  $O_2$ /NPo. Ainsi la capacité de capture des électrons par  $O_2$  pourrait avoir lieu au voisinage de la surface des NPo. Considérant des molécules de dioxygène adsorbées à la surface des NPo, les électrons éjectés des NPo pourraient réagir avec  $O_2$  et former  $O_2^{\cdot-}$ . Cette réaction peut alors entrer en compétition avec l'oxydation de l'eau et réduire la production de radicaux hydroxyle. Si seul l'électron hydraté peut être capté par  $O_2$ , alors sa capture n'affecte pas la production de radical hydroxyle par radiolyse secondaire. Or, nous avons également mis en évidence un fort impact de la concentration en dioxygène sur la production de radicaux hydroxyle. De plus, pour des rayons X de 17,5 keV, en présence de dioxygène, nous n'avons quantifié aucune surproduction d'électron comparativement à la radiolyse de l'eau seule. Ainsi dans le cas où seul l'électron hydraté est capté par le dioxygène, l'hypothèse de radiolyse secondaire ne peut pas être considérée seule. Dans ce nouveau mécanisme, les deux voies de production du radical hydroxyle (radiolyse secondaire et réaction avec le cation d'ionisation  $i^+$ ) seraient affectées par la présence d'oxygène moléculaire en accord avec une diminution significative de  $G(HO^{\cdot})$  mesurée en fonction de la concentration en  $O_2$  dans la solution colloïdale. Cette hypothèse est également en accord avec les productions d'électrons et de radicaux hydroxyle plus élevées sous atmosphère inerte que sous air.

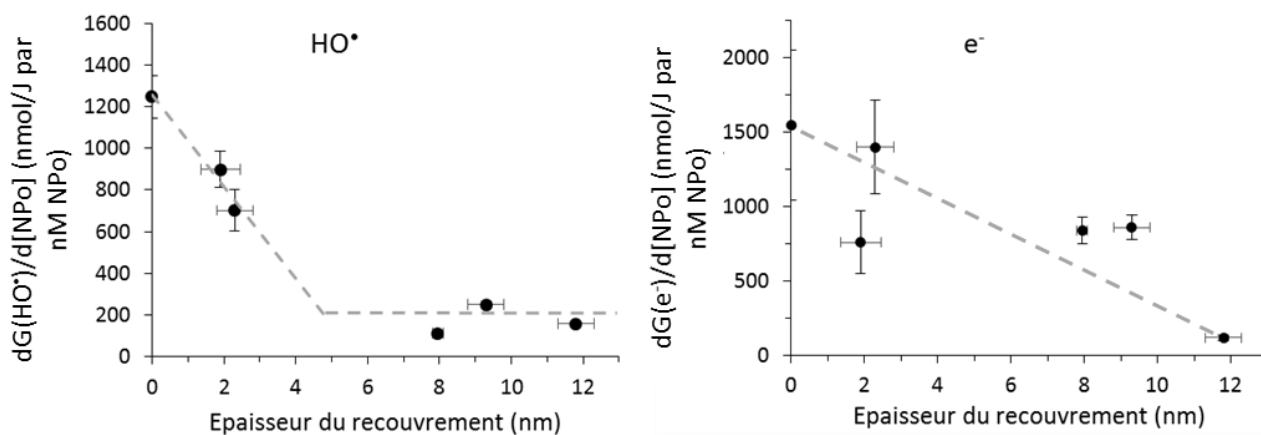
Nos expériences ont également mis en évidence un fort impact de la présence de sel. Pfeiffer *et al.* proposent que les anions  $Cl^-$  sont localisés en surface des nanoparticules [Pfeiffer, 2014], ceux-ci pourraient

alors réagir avec le cation  $i^+$ . Dans notre cas, cela pourrait expliquer la diminution de la production de radicaux hydroxyle observée sous air en présence de NaCl. Cependant, nous n'avons observé aucun effet du sel dans des conditions inertes, nous pouvons donc exclure l'occupation de la lacune  $i^+$  par  $Cl^-$  à 1,7 mM de NaCl. Par ailleurs, la présence de 1,7 mM de sel impacte également la production d'électrons sous atmosphère oxygénée. En effet, si aucun électron n'a été quantifié pour des rayons X de 17,5 keV en présence de NPo sans sel, la présence de 1,7 mM de NaCl a conduit à une production de  $321 \pm 20 \text{ nmol.J}^{-1}$  d'électrons par nM de NPo. Nous proposons donc que le sel perturbe les processus impliquant le dioxygène via la modification de son adsorption à la surface des NPo, par exemple.

Un autre des résultats significatifs de ce travail est la plus grande efficacité des rayons  $\gamma$  par rapport aux rayons X à produire des espèces radicalaires sous atmosphère inerte. En effet, dans ces conditions,  $G(e^-)$  et  $G(HO^*)$  se sont révélés deux fois plus élevés pour des rayons  $\gamma$  que pour des rayons X (**Table III 20**). Ces résultats sont inattendus car contraires aux prédictions théoriques qui s'appuient sur l'absorption supplémentaire due à l'or et qui prévoit un maximum d'absorption vers 50 keV. Une première explication pourrait provenir d'une pénétration différente des deux rayonnements au travers d'une NPo. Nous avons donc vérifié que la pénétration du rayonnement à travers de la solution de NPo ne constituait pas un facteur limitant dans le cas des rayons X et ne pouvait donc pas être responsable d'une telle différence. Pour des énergies de photons respectives de 17,5 keV et 1,2 MeV, le rapport entre l'intensité transmise et l'intensité incidente  $\frac{I}{I_0} = e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)x}$  est égal à 1 et 0,999997 au travers d'une NPo. Ainsi, la pénétration du faisceau incident dans les NPo n'explique pas la différence de production radicalaire mesurée entre les deux types de rayonnement. En considérant le processus de radiolyse secondaire, les électrons éjectés vont avoir des énergies différentes en fonction de l'énergie du rayonnement incident ce qui pourrait être la cause d'une telle différence. Ce résultat souligne la nécessité d'étendre aujourd'hui le domaine de connaissances concernant les propriétés (quantité, énergie, TEL) des électrons émis par des NPo soumises à un rayonnement ionisant en fonction de l'énergie du rayonnement et de la taille des NPo. Considérons à présent une production via une paire électron-cation au sein d'une NPo. La vitesse de formation ainsi que la vitesse de diffusion des paires et leur taux de recombinaison pourraient dépendre de l'énergie du rayonnement incident. Ainsi une énergie plus grande pourrait diminuer le taux de recombinaison directe électron-cation. Il y aurait donc plus de paires efficaces pour la génération de radicaux libres sous rayonnement  $\gamma$  que sous rayonnement X. Par ailleurs, l'impact différent de la quantité de dioxygène en fonction du type de rayonnement (**Figure III 42**) montre ici encore des propriétés différentes des électrons émis en présence de NPo. Ce résultat confirme une nouvelle fois, la nécessité d'une meilleure connaissance des propriétés des électrons émis par les NPo.

La différence de production d'électrons entre une atmosphère inerte et une atmosphère aérée correspond aux électrons ayant été capté par le dioxygène. Des anions superoxyde seraient alors produits en présence de NPo :  $G(O_2^{\bullet-}) \sim 1550 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  par nM de NPo pour des rayons X de 17,5 keV car aucun électron surproduit n'a été quantifié sous air dans ce cas.  $G(O_2^{\bullet-}) \sim 3100 - 600 = 2500 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  par nM de NPo pour des rayons  $\gamma$ . Dans notre mécanisme, cette quantité de  $O_2^{\bullet-}$  serait consommée par sa réduction pour former  $O_2$  par l'ionisation en surface des NPo. Ces anions superoxydes ne seraient alors pas disponibles pour dégrader une cible biologique.

En outre, nous avons observé deux comportements différents pour les productions du radical hydroxyle et de l'électron en présence de NPo fonctionnalisées sous atmosphère inerte. Les rendements en radicaux hydroxyle et en électron sont très impactés par la présence d'un recouvrement. Nous avons montré que le rendement en électrons décroît quasi-linéairement avec le nombre d'atomes constituant le recouvrement des NPo. Le rendement en radicaux hydroxyle, quant à lui, décroît linéairement jusqu'à environ  $4 \times 10^6$  atomes de recouvrement puis atteint un minimum constant. Les électrons éjectés des NPo sont captés par le recouvrement avant qu'ils ne puissent réagir avec l'eau pour produire des radicaux hydroxyle par radiolyse secondaire, alors la production de  $HO^{\bullet}$  provenant de cette radiolyse secondaire devrait diminuer de façon similaire ce qui n'est pas le cas ici.



**Figure III 48:** Influence de la fonctionnalisation des NPo sur les rendements de production en radicaux hydroxyle et en électrons sous atmosphère inerte : dépendance en fonction de l'épaisseur du recouvrement des NPo.

Cette décroissance peut aussi être représentée en fonction de l'épaisseur du recouvrement (**Figure III 48**). Un électron d'une dizaine de keV tel que l'électron éjecté possède un libre parcours moyen dans l'eau d'une vingtaine de nanomètres [Emfietzoglou, 2009], il peut donc traverser le recouvrement et se solvater à une distance éloignée des NPo. Pour les radicaux hydroxyle, la **Figure III 48** révèle l'apparition d'un minimum

constant pour une épaisseur de recouvrement environ égal à 5 nm. Le radical hydroxyle, s'il est produit en surface des NPo, doit traverser le recouvrement afin d'être quantifié par la coumarine en solution. Sachant que le radical hydroxyle possède un libre parcours moyen d'environ 5 nm [Lesser, 2006; Roots, 1975], nous pouvons proposer que les radicaux hydroxyle produit en surface (par  $i^+$ ) ne pourront pas s'échapper du recouvrement des NPo et être quantifiés par la coumarine. La surproduction moyenne de radicaux hydroxyle de 200 nmol.J<sup>-1</sup> mesurée pour des recouvrements dont l'épaisseur est supérieure à 5 nm de fonctionnalisation représenterait alors la part de radical hydroxyle produite par radiolyse secondaire par les électrons éjectés loin des NPo dans l'eau. Les radicaux hydroxyle produits par radiolyse secondaire représenteraient alors environ 15% de la surproduction totale et 85% des HO<sup>•</sup> seraient formés via une ionisation des molécules d'eau par  $i^+$  en surface des NPo. Ainsi, nous pouvons proposer que plus de 85 % des électrons éjectés des NPo se thermaliseraient sans générer de radicaux hydroxyle.

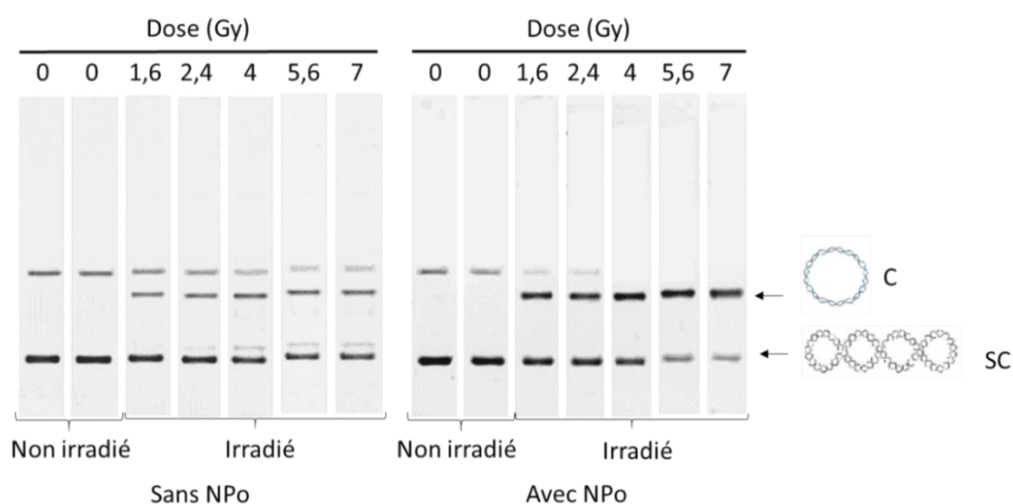
Pour garder des NPo de 32 nm très efficaces pour la production massive de radicaux hydroxyle, soit une quantité de radicaux produite au moins deux fois supérieure à celle produite en l'absence de NPo, un recouvrement contenant moins de  $4 \times 10^6$  atomes est nécessaire. Cette affirmation est valable pour la première partie de la courbe de saturation précédemment décrite. Cependant, nous avons montré que quel que soit le type de NPo, il existe une concentration optimale pour laquelle les productions de radicaux hydroxyle et d'électrons sont maximales. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence que cette quantité était moins impactée par la fonctionnalisation que pour de faibles concentrations en NPo. En effet, quel que soit le recouvrement des NPo, une diminution d'un maximum de 30% des productions maximales en radicaux hydroxyle et en électrons ont été mesurées. Ainsi ces résultats sont rassurants et confortent les effets radiosensibilisateurs qui ont pu être reportés dans la littérature pour différents recouvrements. Pour des applications radiothérapeutiques, il suffira donc à l'avenir de déterminer la concentration en NPo pour laquelle les productions de radicaux sont maximales pour des recouvrements donnés et de choisir le recouvrement le plus adapté pour minimiser la concentration en NPo injectée au patient.

En conclusion, nous avons mis en évidence des productions radicalaires massives en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant. Ces quantifications nous ont conduits à proposer un nouveau mécanisme de production de ces espèces en présence de NPo. Ce travail de thèse constitue donc un premier pas vers la compréhension du phénomène de radiosensibilisation des NPo. En raison du caractère délétère majeur du radical hydroxyle *in vivo*, notre étude *in vitro*, portant sur la quantification des radicaux hydroxyle produits en présence de NPo, doit être considérée dans un contexte biologique et notamment dans le contexte de la radiosensibilisation. Pour la suite de cette étude, il sera donc pertinent de quantifier l'influence de la fonctionnalisation des NPo sur l'effet radiosensibilisateur sur une cible d'intérêt : en l'occurrence un plasmide d'ADN.

## G. ADN

En raison des productions massives de radicaux hydroxyle quantifiées, nous avons voulu tester l'efficacité de ces radicaux produits par les NPo à dégrader une cible : l'ADN. Pour ce faire, nous nous placerons dans des conditions aérées et nous étudierons l'impact de la fonctionnalisation des NPo sur la dégradation d'un plasmide d'ADN. Dans la plupart des études *in vitro* traitant de radiosensibilisation, l'ADN est choisi comme cible en raison de sa facilité de manipulation et de quantification des dommages qui lui sont causés par les radicaux hydroxyle [Brun, 2009a; Butterworth, 2008; Carter, 2007]. Il est à noter que seulement quelques grays sont nécessaires afin de dégrader l'ADN de manière significative, nous avons réalisé toutes nos expériences à un débit de dose plus faible à savoir  $3,4 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $0,09 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Comme précisé au sein de la littérature [Sicard-Roselli, 2014], un abaissement du débit de dose conduit à une augmentation de la production en radicaux hydroxyle en fonction de la concentration en NPo. Cependant, la variation de la production de radicaux entre 20 et  $3,4 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$  (respectivement  $0,33$  et  $0,09 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ ) est négligeable. En effet, nous avons déterminé expérimentalement des valeurs respectives de  $dG_{70H}/d[\text{NPo}]$  de  $14,6$  et  $14,9 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  par nM de NPo. Ainsi, dans ces deux conditions :  $G_{\text{HO}\cdot} = (707 \pm 85) \times [\text{NPo}] + 200 \text{ nmol}\cdot\text{J}^{-1}$  par nM de NPo.

Nous avons résolu les différentes conformations du plasmide d'ADN irradié et quantifié sa dégradation sur gel d'électrophorèse à 1% en agarose. Cette quantification de la dégradation de l'ADN ne rend compte que des cassures du plasmide et non des modifications de bases. La **Figure III 49** met donc en évidence la différence de migration des différentes conformations de l'ADN.



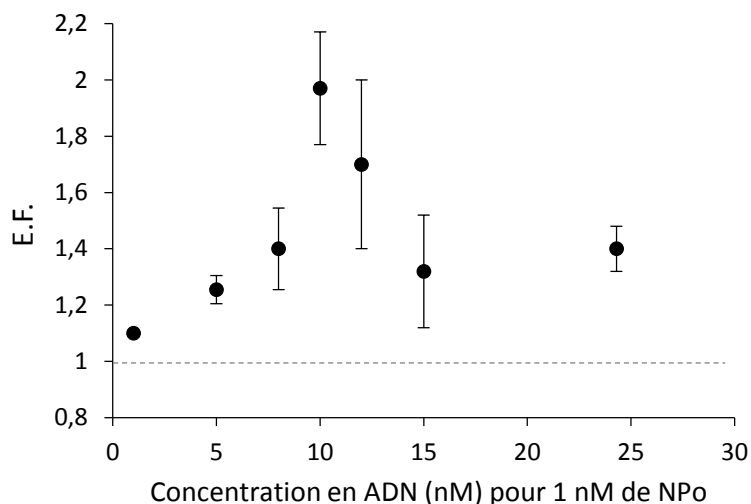
**Figure III 49** : Mise en évidence des différentes configurations d'un plasmide d'ADN. Avant irradiation, l'ADN est majoritairement sous forme surenroulée (SC). Une cassure simple brin modifie sa topologie : il devient circulaire (C), une cassure double entraîne sa linéarisation (L). Les échantillons d'ADN irradiés ont reçu des doses allant jusqu'à 7 Gy en présence ou non de 1 nM de NPo avec un rapport ADN : NPo de 10 : 1. Les irradiations ont été effectuées avec des rayons X de 17,5 keV et un débit de dose de  $0,09 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$ .

La **Figure III 49** met en évidence que l'ADN non irradié est majoritairement sous la forme surenroulée (à 85%). Il est également présent sous une forme concatémère SC-SC. Après irradiation, la proportion d'ADN surenroulé diminue avec la dose et on note l'apparition de la forme circulaire : il se produit donc des cassures simple brin (SSB). Les gels montrent également la présence d'autres bandes peu intenses correspondant aux formes concatémériques<sup>8</sup> (CT) ou à des associations covalentes (*cross-link*) entre les configurations surenroulée et circulaire. Il est important de noter que la présence de NPo ne perturbe pas la migration des différentes conformations de l'ADN et n'induit pas l'apparition de nouvelles espèces sur le gel d'électrophorèse. Par ailleurs, en comparant l'intensité des bandes correspondantes aux formes SC et C avec et sans NPo, pour une même dose, on constate que l'intensité de la bande SC est moins forte en présence qu'en l'absence de NPo. De façon analogue, l'intensité de la bande C est plus forte en présence qu'en l'absence de NPo. Aussi ces observations témoignent d'ores et déjà d'un effet radiosensibilisateur des NPo. Pour chaque échantillon, nous avons tracé le profil électrophorétique et intégré tous les pics obtenus (SC, C, L ainsi que les formes concatémériques et *cross-link*). Le pourcentage que représente l'aire de la forme surenroulée est alors calculé par rapport à l'aire totale de tous les pics. La dégradation de l'ADN SC a alors été quantifiée en fonction de la dose d'irradiation.

Pour réaliser notre étude, nous souhaitons nous placer dans les meilleures conditions possibles, à savoir pour un effet radiosensibilisateur maximal. Nous avons donc choisi une concentration de 1 nM en NPo, qui est la concentration minimale pour laquelle la production de radicaux hydroxyle est maximale (début du plateau). Nous nous sommes intéressés à l'influence du ratio ADN : NPo pour un nombre de NPo (et donc de HO<sup>•</sup>) constant. A priori, pour un nombre de radicaux hydroxyle constant, nous devrions obtenir un nombre de dégâts à l'ADN constant. Nous avons donc déterminé la décroissance de l'ADN sous sa forme surenroulée pour des solutions aérées avec des concentrations finales de 1 nM pour les NPo et de 0 à 24 nM pour le plasmide d'ADN. Dans chaque cas, le pourcentage d'ADN surenroulé décroît linéairement en fonction de la dose d'irradiation dans la gamme explorée, soit entre 0 et 7 Gy. La **Figure III 50** représente la variation du facteur de radiosensibilisation en fonction du ratio ADN : NPo. Le facteur de radiosensibilisation (EF) est défini comme le rapport des pentes de ces courbes en présence et en l'absence de NPo.

---

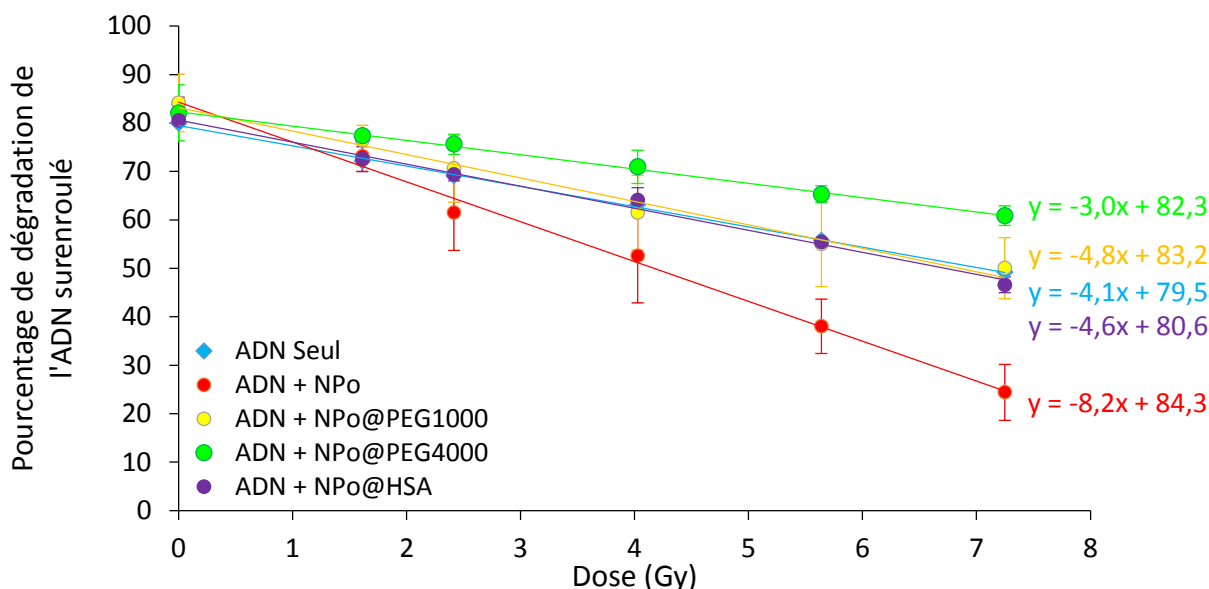
<sup>8</sup> Les formes concatémériques sont en fait des dimères non covalents SC-C et SC-SC [Cai, 2005].



**Figure III 50 :** Dépendance du facteur de radiosensibilisation (EF) en fonction du ratio ADN : NPo. La concentration en NPo est fixée à 1 nM et la concentration en plasmide varie. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types d'un minimum de trois expériences indépendantes.

Quel que soit le ratio ADN : NPo, un effet radiosensibilisateur est observé. De plus, ces résultats mettent en évidence une augmentation du facteur de radiosensibilisation entre 0 et 10 plasmides d'ADN par NPo. Puis, entre 10 et 24 plasmides par NPo, l'effet radiosensibilisateur diminue. Aussi, la dépendance observée présente un maximum pour un ratio ADN : NPo de 10 : 1 avec une valeur de 2. Ce résultat est surprenant puisque pour une même concentration en NPo (1 nM ici) la quantité de radicaux hydroxyle est constante. Ce résultat suggère un rôle de la distance ADN-NPo et/ou de la structure de l'ADN qui peut varier avec sa concentration. Cependant ce travail ne fait pas l'objet principal de notre étude et ne sera pas plus développé ici. Le second résultat significatif de cette analyse concerne la valeur du facteur de radiosensibilisation. Elle vaut au maximum de 2 pour un rapport ADN:NPo de 10:1 alors que nous avons quantifié une quantité de radicaux hydroxyle environ 4 fois plus importante qu'en l'absence de NPo. Cela signifie que tous les radicaux hydroxyle ne sont pas efficace pour produire des cassures simple brin à l'ADN.

La **Figure III 51** présente l'impact de la fonctionnalisation sur la perte de la forme surenroulée de l'ADN en fonction de la dose dans l'eau d'où sont calculés les facteurs de radiosensibilisation pour chaque type de NPo rassemblés **Table III 21**. Par exemple, nous avons obtenu des pentes de respectivement 8,2 et 4,1 pour des échantillons d'ADN en présence et en l'absence de NPo. Aussi le facteur de radiosensibilisation des NPo non fonctionnalisées est de  $8,2/4,1 = 2,0$ .



**Figure III 51 :** Influence de la fonctionnalisation des NPo sur la dégradation de l'ADN surenroulé en fonction de la dose. Les expériences sont réalisées avec un ratio ADN : NPo de 10 nM : 1nM. Les irradiations sont effectuées dans l'eau avec les rayons X de 17,5 keV et un débit de dose de 0,09 Gy.s<sup>-1</sup>. Les données présentées sont les écarts-types et barres d'erreurs d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

	NPo	NPo@PEG <sub>1000</sub>	NPo@PEG <sub>4000</sub>	NPo@HSA
EF (ADN)	2,0 ± 0,4	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2
EF (HO•)	3,9 ± 0,7	3,2 ± 0,6	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,2

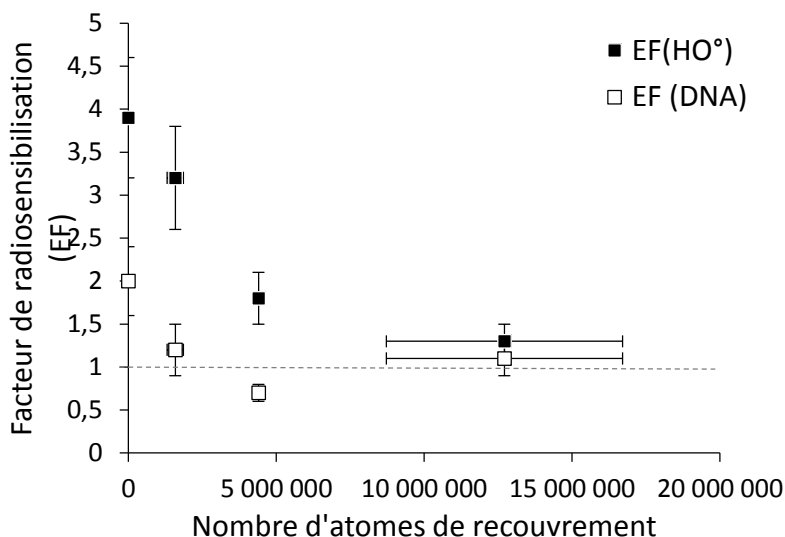
**Table III 21 :** Comparaison des facteurs de radiosensibilisation pour l'ADN et pour la production de radicaux hydroxyle.

Afin de corréliser la production de radicaux hydroxyle et l'effet radiosensibilisateur des NPo, il nous faut définir l'équivalent du facteur de radiosensibilisation pour la production de HO• (EF(HO•)). On définit donc le EF(HO•) comme le ratio entre le G<sub>HO•</sub> en présence et en l'absence de 1 nM de NPo (**Table III 21**).

Les résultats mettent en évidence un fort impact de la fonctionnalisation des NPo. En effet, si un facteur de radiosensibilisation de 2 est observé pour les NPo non fonctionnalisées, ce dernier est réduit à 1,2 pour les NPo@PEG<sub>1000</sub> et il devient même négligeable dans le cas des NPo@PEG<sub>4000</sub> et des NPo@HSA (**Figure III 51** et **Table III 21**). Ces résultats sont très importants puisqu'ils mettent en évidence une diminution significative de l'effet radiosensibilisateur des NPo même pour des fonctionnalisations peu épaisses et contenant peu d'atomes (NPo@PEG<sub>1000</sub>). La valeur obtenue pour les NPo@PEG<sub>4000</sub> est très surprenante puisqu'inférieure à 1. En effet, une valeur inférieure à 1 correspond à un effet radioprotecteur. Ce résultat corrobore une fois de plus le comportement étonnant des NPo@PEG<sub>4000</sub> tout au long de cette étude. Ces résultats suggèrent un



comportement déviant des NPo@PEG<sub>4000</sub> qui pourrait par exemple être dû à une impureté dans le lot de PEG<sub>4000</sub> utilisé pour la fonctionnalisation. L'efficacité des NPo@HSA à dégrader l'ADN est quasi nulle. Or, dès leur introduction au sein d'un fluide biologique, une couronne protéique se forme autour des NPo [Brun, 2014] majoritairement constituée de HSA. Aussi, en vue d'applications biologiques, un recouvrement protéique important pourrait s'avérer être un frein considérable à la radiosensibilisation.



**Figure III 52** : Facteurs de radiosensibilisation en fonction du nombre d'atomes du recouvrement.

La **Figure III 52** montre une tendance similaire entre la perte de production des radicaux hydroxyle et la perte d'efficacité à dégrader l'ADN en fonction du nombre d'atomes de recouvrement des NPo. Il apparaît que quel que soit le recouvrement, la moitié des radicaux hydroxyle produits par les NPo sont capables d'induire des cassures simple brin de l'ADN. Le reste des radicaux pourrait se recombinaison ou bien induire des oxydations aux bases de l'ADN qui ne sont pas quantifiées par l'utilisation des gels d'agarose.

Nos observations confirment la corrélation entre l'effet radiosensibilisateur et la production de radicaux hydroxyle en solution, confirmant ainsi la grande capacité des NPo à produire des radicaux délétères. Afin de guider la conception du recouvrement optimal pour la radiosensibilisation, il faudra s'assurer de minimiser le nombre d'atomes de recouvrement afin d'être efficace pour produire un effet radiosensibilisateur maximal. Cependant, il faut noter que de nombreux auteurs rapportent des facteurs de radiosensibilisation significatifs même avec des PEG de fortes masses moléculaires [Chattopadhyay, 2013; Joh, 2013; Liu, 2010]. Ceci met en évidence le fait que le phénomène de radiosensibilisation *in vivo* pourrait impliquer des phénomènes chimiques complexes à la surface des NPo et/ou des phénomènes biologiques en cascade lors de l'introduction des NPo dans les systèmes biologiques. Enfin, si l'ADN constitue une des cibles majeure étudiée, le radical hydroxyle peut également intervenir au niveau cellulaire dans des réactions d'oxydations des membranes qui

sont particulièrement sensibles à l'oxydation. En présence d'oxygène, il se produit même des réactions de peroxydation lipidique dont le mécanisme est bien connu dans la littérature [Halliwell, 1993]. Les réactions de peroxydation lipidique produisent alors des phénomènes d'inflammations conduisant à la mort cellulaire. HO<sup>•</sup> peut également oxyder des acides aminés au sein des protéines. Ces modifications peuvent entraîner des changements conformationnels qui se manifestent par exemple par l'inactivation d'enzymes. Ces modifications déstabilisent l'architecture cellulaire et les protéines altérées ne sont plus utilisées par la cellule. Le radical hydroxyle est donc une espèce très délétère en milieu biologique et bien que sa production en présence de NPo soit fortement impactée par le recouvrement des objets, elle pourrait tout de même en demeurer néfaste pour une localisation spécifique.



---

# *Conclusions et perspectives*

---

*«Le danger qui menace les chercheurs aujourd'hui serait de conclure qu'il n'y a plus rien à découvrir.»*

*Pierre Joliot*



## IV. Conclusions et Perspectives

---

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte d'optimisation des traitements de radiothérapie par l'utilisation des NPo. En effet, dans le cadre actuel de la recherche contre le cancer, les nanoparticules d'or présentent un fort potentiel pour l'amélioration de la radiothérapie et le traitement de cette pathologie par leur pouvoir radiosensibilisateur et leur vaste chimie de surface. Il est cependant nécessaire d'avoir une bonne connaissance du phénomène, de son origine et des paramètres qui le gouvernent. Ce travail visait donc à synthétiser et caractériser des NPo, à établir un protocole de dosage des radicaux hydroxyle et des électrons produits en présence de NPo, à les quantifier et à évaluer l'impact du rayonnement et enfin à comparer ces productions de radicaux avec la dégradation d'une cible.

La première étape de ce travail consistait en la **synthèse de NPo et leur caractérisation fine** par plusieurs techniques complémentaires en vue d'une étude quantitative. Nous avons alors obtenu six types de NPo différentes de même taille mais variant par leur charge ainsi que par la nature et l'épaisseur de leur fonctionnalisation. Bien qu'indispensable, une telle caractérisation est rare au sein de la littérature. Dans un deuxième temps, nous avons **mis en place un nouveau protocole pour la quantification des radicaux hydroxyle dans des solutions irradiées de NPo**. Il était essentiel de réaliser un ensemble de contrôles pour s'assurer de la validité de ce dosage. En effet, les NPo sont connues pour interférer dans de nombreux tests spectrophotométriques. Ce protocole permet aussi bien de doser les radicaux hydroxyle que les électrons. Il est transposable à n'importe quel type de nanomatériaux. Ce pourra être un outil pour la conception de nouveaux nano-objets efficaces pour produire des espèces radicalaires. Il est d'ailleurs en cours d'optimisation pour le dosage de radicaux hydroxyle en présence de nanoparticules de diamant en collaboration avec une équipe du CEA Saclay. Grâce à ce protocole, nous avons alors **quantifié pour la première fois les radicaux hydroxyle et les électrons produits en présence de NPo soumises à un rayonnement ionisant**. Nous avons alors mis en évidence une production massive de ces espèces ainsi que deux paramètres qui la gouvernent : la concentration en dioxygène en solution et l'énergie du rayonnement incident. Ces résultats nous ont amenés à **proposer un nouveau schéma réactionnel qui pourrait rendre compte de l'effet radiosensibilisateur des NPo**. Cette approche systématique et quantitative permet de définir des conditions optimales (NPo, source) en vue d'une radiosensibilisation efficace. De plus, elle constitue une base de données fiable pour mettre en place des approches théoriques nécessaires à la validation de nos propositions. Il apparaît essentiel d'effectuer des allers-retours entre des approches physico-chimiques *in vitro* et biologiques *in cellulo* afin d'optimiser systématiquement les paramètres (taille, recouvrement des NPo) entrant en jeu.

L'ensemble de ce travail permet dès à présent une première proposition de combinaison NPo-rayonnement efficace.

Nous avons montré que les rendements maximum de production de radicaux sont identiques quelle que soit la fonctionnalisation. Dans un souci de moindre toxicité, il est cependant primordial de minimiser la concentration en NPo pour des applications thérapeutiques. Parmi les NPo que nous avons synthétisées, les NPo@PEG<sub>1000</sub> seraient les plus adaptées. En ce qui concerne l'impact du rayonnement, nous avons suggéré que des rayons gamma seraient plus efficaces que des rayons X dans le cas de tumeurs hypoxiques. A l'inverse, les rayons X seraient plus efficaces dans des conditions aérobies. D'un point de vue thérapeutique, ce travail s'inscrit dans des conditions réalistes : faibles concentrations en NPo, sources présentes dans les hôpitaux, photons incidents d'énergie de l'ordre du keV, débit de dose dans la gamme du Gy.min<sup>-1</sup>.

En parallèle des travaux présentés, j'ai participé à 11 séries d'expériences au synchrotron Diamond (Oxfordshire, Royaume-Uni) où nous avons étudié l'impact de l'énergie entre 10 et 60 keV, de la taille des NPo entre 8 et 80 nm et leurs types (NP d'argent, NPo *hollow*).

Dans le cadre des travaux réalisés à Orsay et présentés dans ce travail de thèse, il serait également intéressant de déterminer la fonctionnalisation optimale afin de minimiser le recouvrement total au sein d'un milieu cellulaire. La première étape serait d'abord de caractériser très précisément les nano-objets après incubation en milieu cellulaire. Il faudrait ensuite effectuer des allers-retours entre expériences *in vitro* et *in cellulo* en prenant en compte de nouveaux paramètres. Par exemple, la taille des NPo sera un paramètre clé à optimiser pour maximiser les effets aux cellules. Il faudra dans ce cas trouver la taille qui permettra une internalisation maximale au sein des cellules et la production d'un maximum d'espèces radicalaires délétères. Il faudra également quantifier l'impact de la fonctionnalisation sur la production de radicaux après incubation *in cellulo* et sur l'effet radiosensibilisateur dans ces mêmes conditions. Par optimisation des ligands et de leur nombre, des NPo et de leur taille, il serait alors possible de définir l'objet le plus efficace pour la radiosensibilisation. Si la fonctionnalisation s'avère être un trop gros obstacle, il sera intéressant d'étudier également des ligands permettant leur libération contrôlée afin de restaurer l'effet radiosensibilisateur au sein de la tumeur. Dans ce processus, l'identification des dommages cellulaires spécifiques serait très intéressante et pourrait donner de nouvelles pistes quant au mécanisme de l'effet radiosensibilisateur *in cellulo*. Par ailleurs, compte tenu de la production massive d'électrons quantifiée, il faudrait également mesurer leurs effets directs sur des cibles biologiques.

D'un point de vue plus fondamental, des études concernant les productions de  $H^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2$  et  $H_2O_2$  seraient également intéressantes dans des conditions accessibles à la thérapie. Un développement des connaissances concernant les électrons éjectés des NPo seraient nécessaires en termes de quantité, d'énergie et de TEL.

Enfin, dans une autre optique, la méthode de quantification établie dans ce travail pourrait être étendue à des thématiques thérapeutiques parallèles et avec d'autres types de nanoparticules. Ce dosage pourrait ainsi permettre d'identifier les thérapies les plus efficaces. A plus long terme, il pourrait également présenter des intérêts dans d'autres domaines de la chimie sous rayonnement comme le stockage des déchets nucléaires, le stockage de l'énergie par exemple pour des batteries lithium, la catalyse et plus particulièrement l'électro-catalyse.





---

# *Matériels et Méthodes*

---

*« La méthode, c'est le chemin, une fois qu'on l'a parcouru. »*

*Marcel Granet*

A.	SYNTHESE DE NANOPARTICULES D'OR.....	147
B.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISEES .....	148
C.	IRRADIATIONS EN SOLUTION .....	151
D.	ADN .....	154
E.	QUANTIFICATION DE LA 7-HYDROXYCOUMARINE .....	155
F.	QUANTIFICATION DE LA QUANTITE DE DIOXYGENE EN SOLUTION.....	157



# V. Matériels et Méthodes

---

## A. Synthèse de nanoparticules d'or

Toute la verrerie utilisée pour la synthèse des NPo a été soigneusement lavée avec de l'eau régale (3:1 HNO<sub>3</sub>, HCl) puis rincée abondamment à l'eau.

### 1. Synthèse de nanoparticules (méthode Turkevitch)

Toutes les nanoparticules d'or préparées dans ce travail ont été synthétisées par la méthode de Turkevitch, il s'agit d'une réduction chimique des sels d'or par le citrate de tri-sodium [Turkevitch, 1985; Turkevitch, 1951]. Des NPo d'environ 32 nm de diamètre ont été synthétisées en chauffant 100 mL d'une solution aqueuse de KAuCl<sub>4</sub> à 10<sup>-3</sup> M. Lorsque la solution atteint 60°C environ, 4,6 mL de citrate trisodique à 1% (m/v) sont ajoutés d'un coup. La solution finale est ensuite maintenue à une température d'environ 60°C sous agitation vigoureuse pendant 10 minutes après virage à la couleur rouge vin de la solution, puis l'agitation est maintenue jusqu'à retour à température ambiante. Cette solution est par la suite utilisée comme base pour la fonctionnalisation de toutes les autres nanoparticules d'or. Afin de supprimer la plupart du citrate libre en solution, les NPo non fonctionnalisées ont été soumises à trois cycles de centrifugation (2300 g, 18 min) et d'une resuspension dans l'eau ; les culots de NPo concentrées ainsi obtenus ont été rassemblés et conservés à 4°C.

### 2. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

#### a. Fonctionnalisation par le PEG<sub>1000</sub> ou le PEG<sub>4000</sub>

Pour l'obtention de NPo fonctionnalisées par des polyéthylène-glycols de masses respectives 1000 et 4000 g/mol (PEG<sub>1000</sub> et PEG<sub>4000</sub>), la resuspension lors des lavages de la solution colloïdale de NPo de 32 nm précédemment décrite se fait dans une solution aqueuse de PEG à 10<sup>-3</sup> M pour les deux premiers cycles. Lors du troisième cycle les culots sont resuspendus dans l'eau de manière à éliminer le PEG en excès, et suivi d'une dernière centrifugation (2300 g, 15 min) afin de concentrer les nanoparticules d'or fonctionnalisées.

### b. Fonctionnalisation par le HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> ou le HS-PEG<sub>3500</sub>-COOH

Les fonctionnalisations par des ligands HS-PEG<sub>3500</sub>-NH<sub>2</sub> ou HS-PEG<sub>3500</sub>-COOH sont réalisées par adaptation de la méthode de Xia *et al.* [Xia, 2012]. Pour ce faire, 1,2 mL d'une solution aqueuse de PEG thiolés à 0,25 mM sont ajoutés à 4,8 mL de la solution colloïdale obtenue avant lavage dont la concentration est ajustée à 1 nM. Le mélange est immédiatement vortexé pendant 30 secondes puis incubé à 4°C pendant toute une nuit. La solution colloïdale ainsi obtenue est soumise à 3 cycles de centrifugation (18000 g, 7 min) avec resuspension dans l'eau afin d'éliminer l'excès de PEG en solution.

### c. Fonctionnalisation par la HSA

Pour l'obtention de NPo fonctionnalisées par la HSA, la solution colloïdale est soumise à deux cycles de centrifugation. Suite au premier cycle (2300 g pendant 20 min), les culots sont remis en suspension par l'ajout de 1 mL d'une solution aqueuse de protéine à 0,5 µM. Un second cycle de 18 min est alors effectué et les culots sont resuspendus dans l'eau. Enfin, un dernier cycle de centrifugation de 18 min permet d'éliminer l'excès de protéine et de récupérer les NPo concentrées.

## B. Caractérisation des nanoparticules d'or fonctionnalisées

Après chaque synthèse, tous les nano-objets obtenus ont été scrupuleusement caractérisés par un panel de différentes techniques : microscopie électronique à transmission, diffusion dynamique de la lumière, spectroscopie d'absorption UV-visible, potentiel zêta, dosage de l'or contenu dans les nanoparticules, expériences de floculation et spectroscopie infrarouge. Toutes ces techniques nous ont permis de caractériser finement le cœur d'or des nanoparticules, leur fonctionnalisation et de déterminer leur concentration.

### 1. Caractérisation du cœur d'or

#### a. Microscopie électronique à transmission

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées au sein de la plateforme ImaGif à Gif Sur Yvette. La microscopie électronique à transmission est une technique de microscopie donnant accès à la taille

du cœur des NPo avec une résolution théorique pouvant atteindre 0,08 nm. En pratique, compte tenu des diverses aberrations optiques<sup>9</sup>, la résolution est de l'ordre de 0,5 - 1 nm. Pour une analyse en MET, 1  $\mu$ L de la solution de NPo concentrée est déposé sur une grille de cuivre revêtue de formvar/carbone (400 mailles) préalablement ionisée pendant une minute. Les images sont réalisées avec un 100CXII instrument TEM JEOL (JEOL, Tokyo, Japon) fonctionnant à 120 keV et acquises à haute résolution (11 mégapixels) avec une caméra post-colonne haut débit (SC1000 Orius, Gatan). Elles sont ensuite traitées avec le Micrograph numérique (Gatan). La taille des NPo a été mesurée à partir des images obtenues en utilisant le logiciel ImageJ 1.41 [Abramoff, 2004] en comptant au moins 300 particules différentes par échantillon.

### b. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie d'absorption UV-visible permet d'analyser la solution de NPo entre 400 et 850 nm (en utilisant un spectrophotomètre Thermo Electron 500), gamme caractéristique des NPo et de leur résonance plasmonique [Mulvaney; Noguez, 2007]. La hauteur du pic d'absorption fournit une mesure de la concentration des NPo, et la longueur d'onde d'absorption fournit une estimation de la taille des NPo. Ces caractéristiques d'absorption sont utilisées pour vérifier les propriétés (concentration, taille, état d'agrégation) des NPo dans le temps [Brun, 2014].

## 2. Caractérisation de la fonctionnalisation

### a. Diffusion dynamique de la lumière

La DLS utilise la lumière diffusée pour mesurer la vitesse de diffusion des particules. Ces données de mouvement sont simplement traitées par une dérivée de la vitesse. La distribution de la taille d'un échantillon est alors donnée par le rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique de la particule. Ce rayon donne une mesure de l'objet et de sa couche de solvatation. L'utilisation de la DLS et sa sensibilité sont dictées par un protocole strict préalablement optimisé [Gilles] et utilisé tant pour la préparation de l'échantillon que pour la réalisation de la mesure. Les mesures de DLS sont effectuées sur un appareil Malvern ZetaSizer ZEN3600 équipé d'un laser de 633 nm dans des micro-cuvettes de 100  $\mu$ L. Pour la détermination du diamètre hydrodynamique, une

---

<sup>9</sup> Les aberrations optiques sont des défauts du système optique conduisant à la déformation des images. Il en existe deux types : les aberrations chromatiques (longueur d'onde) et les aberrations géométriques (position des lentilles, etc...). Ici, ce sont les aberrations géométriques qui conduisent à une perte de résolution du système.

concentration fixe de 0,8 nM en nanoparticules et une position fixe à 4,65 mm de la lentille de détection sont utilisées pour assurer la reproductibilité des mesures. L'atténuation du laser est laissée en mode automatique.

### b. Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par un échantillon analysé. Elle permet d'identifier les fonctions chimiques présentes dans l'échantillon. Elle a été utilisée ici pour vérifier la fonctionnalisation et déterminer le nombre de ligands et leurs densités autour des NPo. Cette technique a également permis de confirmer l'efficacité de nos lavages en déterminant le nombre de molécules de citrate résiduelles en surface de NPo non fonctionnalisées. La spectroscopie FTIR est réalisée avec un spectromètre Bruker FTIR Vertex 70 équipé d'un ATR. Les spectres sont enregistrés par accumulation de 128 scans avec une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$ . 1  $\mu\text{L}$  de la solution à analyser (nanoparticules ou calibration) est déposé sur l'ATR et séché au sèche-cheveu avant d'enregistrer les spectres. Les régions des modes d'étirement des groupements alkyle  $\nu_{\text{CH}_3}$  et  $\nu_{\text{CH}_2}$  ont été étudiées entre 2750 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Le nombre de molécules à la surface des NPo est déterminé en comparant les intensités des spectres de nanoparticules à une courbe de calibration, établie à partir de l'intensité des spectres des ligands libres en solution dans une gamme de concentration de 0,125 à 2 mM pour tous les PEG et de 15 à 50  $\mu\text{M}$  pour la HSA. Pour les nanoparticules PEGylées, une seconde analyse est conduite avec les modes d'étirement des groupements éther  $\nu_{\text{C-O}}$  entre 1000 et 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

### c. Zétamétrie

Le potentiel zêta représente la charge électrostatique de la particule en fonction de son environnement ionique. Le potentiel zêta dépend de la charge en surface et des ions en solution (types d'ions présents et concentrations). Ces mesures sont effectuées sur des NPo à 1 nM avec un appareil Malvern ZetaSizer ZEN3600 et une tension fixe de 150 mV est appliquée en cellule d'immersion.

## 3. Vérification de la concentration : Dosage de l'or

Afin de vérifier le coefficient d'absorption molaire des différents types de NPo et donc leur concentration, la quantité d'or contenue dans les nanoparticules a été déterminée par spectroscopie UV-visible selon la méthode optimisée par Tournebize *et al.* [Tournebize]. Cette méthode comprend une première étape de

digestion des NPo en anions  $\text{AuCl}_4^-$  par une solution acide bromée puis une deuxième étape de complexation des ions  $\text{AuCl}_4^-$  avec la forme cationique de la rhodamine B. De cette étape résulte un complexe violet dont l'absorbance est mesurée après extraction par le diisopropyl éther. La courbe de calibration est obtenue à partir d'une solution aqueuse de  $\text{KAuCl}_4$  (0 à 4  $\mu\text{M}$  final) mélangée avec 10 mL d'eau, 2,5 mL d'une solution de HCl à 20% (v/v), 5 mL d'une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 30% (v/v), 2,5 mL de rhodamine à 0,84 mM et 5 mL de diisopropyl éther. Le mélange obtenu est agité pendant 30 secondes afin d'assurer la complexation des ions  $\text{Au}^{3+}$  en solution avec la rhodamine B. Puis, le spectre d'absorption de la phase organique (éther) est enregistré entre 400 et 700 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 535$  nm). Pour ce qui est du dosage de l'or contenu dans les nanoparticules, un volume de NPo concentrées (0,5, 1 ou 2  $\mu\text{L}$ ) a été mélangé avec 1 mL d'une solution contenant  $5 \cdot 10^{-2}$  M de HCl,  $1,5 \cdot 10^{-2}$  M de NaCl et  $7 \cdot 10^{-4}$  M de  $\text{Br}_2$  afin de « digérer » les NPo. Le mélange obtenu est ensuite incubé à température ambiante pendant 20 min puis placé à  $60^\circ\text{C}$  sous hotte pendant 30 min de manière à évaporer toute quantité de brome restante. Pour chaque type de NPo, cette étape de digestion a été réalisée pour trois volumes de nanoparticules différents, en triplicata, de sorte à s'assurer que l'oxydation des atomes d'or par la solution bromée soit complète. La solution d'or ainsi obtenue est alors soumise au même dosage colorimétrique que précédemment (comme pour l'établissement de la courbe de calibration).

Le nombre d'atomes d'or attendu N est calculé selon :

$$N = [\text{NPo}] \times N_A \times 59 \times \frac{4}{3}\pi r^3 \times V_{\text{NPo}} \quad \text{équation V 1}$$

Avec  $[\text{NPo}]$  la concentration en NPo en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $N_A$  le nombre d'Avogadro ( $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), 59 le nombre d'atomes d'or par  $\text{nm}^3$  dans une NPo [Kittel, 1996],  $r$  le rayon moyen des NPo déterminé par MET en nm et  $V_{\text{NPo}}$  le volume en L de nanoparticules concentrées utilisé pour le dosage.

## C. Irradiations en solution

### 1. Irradiations X

Les irradiations ont été effectuées avec à un générateur de rayons X (Diffractis 583) équipé d'un tube possédant une anti-cathode en molybdène générant des rayons X non monochromatiques de 17,5 keV. Le faisceau horizontal qui permet l'irradiation d'échantillons en cuvettes plastiques de spectrophotomètre a été



utilisé. Le débit de dose est facilement ajustable en modifiant la tension (de 20 à 59 kV par pas de 1 kV) et l'intensité du générateur (10 intensités fixes accessibles de 6,5 à 50 mA). Il peut varier entre 1 et 25 Gy.min<sup>-1</sup> environ.

Les échantillons contenant de la coumarine ont été irradiés à un débit de dose de 0,33 Gy.s<sup>-1</sup> pour une gamme de dose comprise entre 0 et 15 Gy. Les irradiations des échantillons d'ADN ont été réalisées à un débit de dose de 0,09 Gy.s<sup>-1</sup>. Chaque série a été irradiée dans une gamme de dose comprise entre 0 et 7 Gy afin d'endommager suffisamment l'ADN plasmidique pour fournir des observations quantifiables et de rester dans la partie linéaire de la courbe de radiosensibilisation.

## 2. Irradiations Gamma

Les irradiations gamma ont été avec une source panoramique continue de cobalt 60 (<sup>60</sup>Co). Le <sup>60</sup>Co est un isotope du cobalt possédant 27 protons et 33 neutrons. Il s'agit d'un radionucléide qui se désintègre en <sup>60</sup>Ni par désintégration β<sup>-</sup> avec une énergie de désintégration de 2,82 MeV et une période radioactive de 5,27 ans. Les rayons β<sup>-</sup> (photoélectrons), faiblement pénétrants, sont émis en cascade par le noyau afin de palier l'excès de neutrons du <sup>60</sup>Co. La relaxation du noyau s'effectue alors très majoritairement par l'émission de deux photons d'énergies 1,17 et 1,33 MeV. Le débit de dose de cette source varie entre 0 et 130 Gy.min<sup>-1</sup> en fonction de la position par rapport à la source.

Les échantillons de NPo en présence de coumarine ont été irradiés pendant 1 min dans une gamme de débit de dose comprise entre 0 et 15 Gy.min<sup>-1</sup>.

## 3. Dosimétries

### a. Dosimétrie de Fricke

L'exposition au rayonnement ionisant se mesure par la dose absorbée, en Gray (Gy), qui donne une quantification des interactions entre rayonnements ionisants et matière (un Gy correspond à l'absorption d'un J.kg<sup>-1</sup>). Afin de déterminer précisément la dose appliquée aux échantillons, une dosimétrie de Fricke a d'abord été effectuée. Ce dosimètre chimique s'appuie sur la mesure de l'oxydation d'un sel ferreux après irradiation. Il contient 0,4 M d'acide sulfurique, 6.10<sup>-3</sup> M de sel de Mohr (fer (II)) et 10<sup>-3</sup> M de chlorure de potassium. Afin d'assurer sa saturation en dioxygène, la solution est préparée la veille de l'irradiation [Spinks, 1990] et agitée

en continue. L'oxydation radiolytique du Fe(II) en Fe(III) est ensuite suivie par absorption UV-visible à 304 nm. La dose est alors reliée à la différence d'absorbance à 304 nm  $\Delta A_{304}$  selon :

$$D = \frac{Na \times \Delta A_{304} \times 100}{G(Fe^{3+}) \times \epsilon_{304} \times 10^3 \times d \times l \times f} \quad \text{équation V 2}$$

Avec :

Na, le nombre d'Avogadro soit  $6,02 \times 10^{23}$  molécules.mol<sup>-1</sup>

$\Delta A_{304}$ , la différence d'absorbance de Fe<sup>3+</sup> mesurée à 304 nm

$\epsilon_{304}$ , le coefficient d'extinction molaire de Fe<sup>3+</sup> à 304 nm en M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

G(Fe<sup>3+</sup>), le rendement en Fe<sup>3+</sup> en molécules/100 eV dont les valeurs en fonction de l'énergie sont répertoriées dans [Spinks, 1990].

f =  $6,24 \times 10^{15}$  eV.Gy<sup>-1</sup>

d, la densité de la solution irradiée, égale à 1,024 pour une solution 0,4 M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Hoshi, 1992]

l, le chemin optique parcouru en cm.

Les rendements en Fe<sup>3+</sup> pour les différentes énergies utilisées dans ce travail sont répertoriés **Table V 1**.

Energie des photons	G (Fe <sup>3+</sup> ) ( $\mu\text{mol.J}^{-1}$ )	G (Fe <sup>3+</sup> ) (molécules/100 eV)
17,5 keV	1,42	13,7
Rayons $\gamma$ <sup>60</sup> Co 1,2 MeV	1,61	15,5

**Table V 1** : Valeurs de G(Fe<sup>3+</sup>) pour la dosimétrie de Fricke. [Spinks, 1990]

Le tracé de la droite de la valeur  $\Delta A_{304}$  en fonction du temps permet ainsi de remonter au débit de dose et donc de la dose. La dosimétrie de Fricke a également permis la calibration de la dosimétrie Gafchromic<sup>®</sup> qui a été réalisée à chaque expérience.

#### b. Dosimétrie Gafchromic<sup>®</sup>

Afin de suivre la dose appliquée aux échantillons à chaque expérience, un dosimètre radiochromique a été employé : le film Gafchromic<sup>®</sup> HD-810 (ISP Technologies INC, Wayne, NJ) [Butson, 2003]. En effet, la dosimétrie Gafchromic<sup>®</sup> présente l'avantage d'une utilisation quotidienne moins lourde que la dosimétrie de Fricke. Ce dosimètre a été utilisé en routine pour des irradiations quotidiennes avec des rayons X de 17,5 keV. Pour toutes les irradiations gamma, des dosimétries de Fricke ont été systématiquement réalisées. Après exposition au rayonnement, le Gafchromic<sup>®</sup> devient bleu par dégradation radio-induite d'une microcapsule

de colorant au sein du film. Il est ensuite stocké dans le noir pendant 48h à température ambiante car la stabilisation de la couleur n'est effective qu'au-delà de 24h. Il est ensuite scanné avec un scanner de bureau (CanoScan LiDE700F). L'intensité de lumière calibrée par rapport à une dosimétrie de Fricke est analysée grâce à Image J [Abramoff, 2004]. Pour chaque condition d'irradiation, deux échantillons de film radiochromique sont irradiés pour réduire l'erreur sur la dose ; en effet, l'uniformité de la réponse au sein d'une feuille est de l'ordre de 10%.

## D. ADN

Les plasmides pBlueScript (3197 paires de bases) ont été extraits d'E. Coli DH5a et purifiés avec le kit Giga plasmide de QIAfilter (Qiagen). Le culot d'ADN a été repris dans l'eau et stocké à environ 50 ng/ $\mu$ L à -20°C. La pureté de l'ADN a été vérifiée en comparant l'absorbance à 260 et 280 nm, un rapport de 1,98 a indiqué l'absence de toute contamination par des protéines. Pour toutes les préparations d'ADN, les électrophorèses sur gels d'agarose ont montré que 85% du plasmide extrait est sous forme surenroulée, la forme circulaire compte pour environ 15%. Les concentrations ont été déterminées par mesure de l'absorption de l'ADN à 260nm, en utilisant un coefficient d'absorption molaire de  $5,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à pH 7. Afin de quantifier les lésions à l'ADN, les différentes conformations de l'ADN plasmidique ont été séparées dans un gel à 1% m/v d'agarose en migrant à 130 V pendant 2,5 h. Le gel est ensuite coloré avec du SYBRGold®, puis imagé avec un lecteur de gel (Syngene Bioimaging). Les images obtenues sont analysées et les différentes conformations du plasmide résolues à l'aide du logiciel ImageJ. Lorsque le plasmide dans sa configuration surenroulée (SC) subit une cassure simple brin (SSB), un changement topologique se produit permettant ainsi à la molécule d'adopter une forme circulaire. Typiquement, une cassure double brin (DSB) provoque un changement conformation de l'ADN qui devient alors linéaire. D'autres conformations étaient présentes, dans une bien moindre mesure, il s'agit de formes concatémériques et cross-link de l'ADN. Les quantités relatives de chaque forme d'ADN ont été obtenues à partir de l'analyse ImageJ [Abramoff, 2004].

Des solutions aqueuses d'ADN et de NPo sont préparées immédiatement avant l'exposition aux rayons X, ce qui permet d'obtenir des solutions aérées avec des concentrations finales de 1 nM pour le NPo et de 0 à 24 nM pour l'ADN, ce qui correspond à des ratios ADN:NPo de 1, 5, 8, 10, 12, 15 et 24 molécules d'ADN. Immédiatement après irradiation, les échantillons sont dilués à une concentration finale de 1 nM en ADN. Les échantillons préparés, comme il suit, sont ensuite déposés sur gel d'électrophorèse : 15  $\mu$ L d'échantillon dilué est mélangé à 2  $\mu$ L de tampon de charge bleu et 3  $\mu$ L de TE (10 mM Tris, EDTA 1 mM, à pH 8).

## E. Quantification de la 7-hydroxycoumarine

### 1. Quantification du radical hydroxyle par la coumarine

Le dosage des radicaux hydroxyle est effectué par quantification de l'oxydation de la coumarine irradiée à 0,5 mM en présence de nanoparticules dans une gamme de concentrations allant de 0 à 15 nM.

La quantification de la 7-hydroxycoumarine par fluorescence a été effectuée sur un lecteur de microplaques Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA), à 25°C. L'excitation a été fixée à 326 nm et les spectres d'émission ont été enregistrés entre 380 et 700 nm, avec un maximum détecté à environ 450 nm. Lors des expériences en cuvettes, les nanoparticules sont précipitées immédiatement après l'irradiation par addition de 10 µL de sel à 10% (m/v) pour induire leur agrégation puis elles sont retirées de la solution par centrifugation et prélèvement du surnageant. Les cuves que nous utilisons pour l'irradiation ont une épaisseur de 1 mm. Quel que soit le type de rayonnement utilisé toute l'épaisseur d'échantillon est pénétrée par le rayonnement incident. En effet, nous avons calculé les épaisseurs de demi-atténuation<sup>10</sup> des rayonnements dans l'eau et dans l'or (massif), les résultats sont répertoriés **Table V 2**.

Rayons Gamma		Rayons X	
Or	Eau	Or	Eau
0,62 cm	11 cm	$2,32 \times 10^{-4}$ cm	0,83 cm

**Table V 2:** Epaisseur de la couche de demi-atténuation pour des rayonnements X ou gamma dans l'or ou dans l'eau. Les valeurs ont été calculées à partir des coefficients d'absorption massiques de l'or et de l'eau à 17,5 keV pour les rayons X et à 1,2 MeV pour les rayons gamma. [NIST]

Les épaisseurs calculées donnent des pénétrations des rayonnements très différentes entre les deux types de rayonnement. Cependant, la pénétration du rayonnement dans l'or est très supérieure à 32 nm (diamètre des NPo) dans les deux cas.

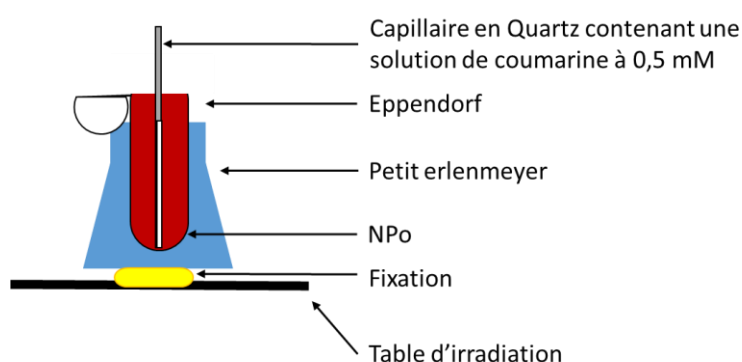
<sup>10</sup> L'épaisseur de demi-atténuation (EDA) est l'épaisseur pour laquelle le rayonnement incident a perdu la moitié du nombre initial de photons (ou bien de son énergie initiale).  
 $EDA = \ln(2) / \mu$  ; où  $\mu$  est le coefficient linéique global [NIST]

## 2. Extinction du signal de fluorescence en présence de NPo

La présence de NPo en solution peut engendrer l'extinction du signal de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine. Afin de quantifier ce phénomène, des échantillons de coumarine à 0,5 mM sont irradiés dans une gamme de dose de 0 à 150 Gy. Les échantillons irradiés sont ensuite incubés avec différentes concentrations en NPo (de 0 à 16 nM) pendant des temps de contact compris entre 10 s et 30 min. Le contact entre la coumarine et les nanoparticules est stoppé par ajout d'une solution de NaCl à 10% (m/v) qui permet d'induire l'agrégation des NPo. Puis, les agrégats d'or sont retirés de la solution par centrifugation (12 000 g, 1 min). Les surnageants sont ensuite analysés par spectroscopie de fluorescence avec le lecteur de microplaques. Des expériences similaires ont été réalisées sous différentes atmosphères. Pour cela, les échantillons de coumarine sont préalablement mis à barboter sous  $N_2$ ,  $O_2$  ou  $N_2O$  pendant 1h avant irradiation. Les mises en contact avec les NPo et les précipitations étant ensuite réalisées en boîte à gants sous atmosphère désirée.

## 3. Effet Čerenkov

75  $\mu$ L de coumarine à 0,5 mM ont été introduits dans un capillaire en quartz. Le capillaire en quartz a lui-même été placé dans un eppendorf® de 1,5 mL contenant 1,5 mL de NPo à différentes concentrations (0,3, 1 ou 5 nM). Ces échantillons ont ensuite été irradiés avec la source gamma et ont reçu une dose de 14 Gy avec un débit de dose de  $14 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ . Le système utilisé pour l'irradiation est schématisé **Figure V 1**. Les échantillons de coumarine irradiés contenus dans les capillaires ont ensuite été analysés par spectroscopie de fluorescence.



**Figure V 1** : Schéma du système d'irradiation sous rayonnement gamma pour la quantification de l'effet Čerenkov.

#### 4. HPLC

Afin de comparer les profils HPLC en présence de NPo ou non, nous avons réalisé des analyses HPLC de la coumarine irradiée en présence de nanoparticules. Des produits d'oxydation de la coumarine ont été séparés de la coumarine non oxydée par HPLC (Beckman 168) en phase inverse (Kromasil C18 5  $\mu$ m 250 x 4.6 mm. 100 Å - 5  $\mu$ m) avec un gradient de deux tampons d'élution A (89% d'eau (v/v), 10% de méthanol (v/v) et de l'acide acétique 1% (v/v)) et B (89% méthanol (v/v), 10% d'eau (v/v) et d'acide acétique à 1% (v/v)). Les échantillons ont été soumis au gradient suivant avec un débit de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>: 0% B pendant 5 min, 0–30% B en 5 min, 30–50% B en 20 min et 50-100% B en 5 min.

Tous les échantillons contenant des NPo sont centrifugés avant injection (14000 rpm, 2 min), seul le surnageant est injecté (200  $\mu$ L). L'absorbance est enregistrée simultanément à 265 et 325 nm. Pour identifier quelques-uns des produits d'oxydation de coumarine 3 -, 4 -, 6 - et 7-hydroxycoumarines sont co-injectés (25  $\mu$ L, 0,3 mM final) seul avec le même gradient. Leur temps de rétention permettant de les identifier dans le profil de la séparation de la solution de coumarine irradiée.

En ce qui concerne les expériences d'interaction coumarine-NPo, nous avons également réalisé des analyses HPLC (HP series 1050) de la coumarine en présence de NPo. Les échantillons de coumarine sont incubés en présence de NPo pendant 30 min, puis les NPo sont retirées des échantillons par précipitation (par ajout de sel) puis centrifugation ou par simple centrifugation (14000 g, 2 min) avant injection. Seul le surnageant est injecté. La coumarine est alors analysée par HPLC en phase inverse (Kromasil C18 5  $\mu$ m 250 x 4,6 mm. 100 Å - 5  $\mu$ m) avec une méthode isocratique à base des deux tampons d'élution précédemment décrit (43% B et 57% de A pendant 16 min). L'absorbance est enregistré simultanément à 265 et 325 nm.

#### F. Quantification de la quantité de dioxygène en solution

Des mesures de concentration en dioxygène ont été réalisées afin de quantifier l'impact du dioxygène sur le rendement de production en radicaux hydroxyle en présence de NPo. Des échantillons de 500  $\mu$ L sont mis à barboter sous différentes atmosphères (diazote, protoxyde d'azote ou dioxygène) pendant une heure, assurant ainsi la saturation de l'échantillon et du milieu environnant dans l'atmosphère désirée. Pour les échantillons dans des conditions aérées, les échantillons n'ont pas été mis à barboter. La pression partielle en dioxygène et donc la concentration en dioxygène au sein de la solution a ensuite été mesurée grâce à une sonde à dioxygène NeoFox®. Il s'agit d'une mesure de l'extinction de la fluorescence d'un composé par le

dioxygène. Ce composé fluorescent (le tris-(bipyridine)-ruthénium) est piégé dans une matrice sol-gel perméable à l'oxygène et optiquement transparent. La fluorescence de ce composé est excitée par une diode électroluminescente bleue. Le temps de décroissance moyen du signal de fluorescence du complexe de tris-(bipyridine)-ruthénium est alors mesuré par fluorimétrie impulsionnelle de phase et est utilisé pour déterminer la pression partielle en dioxygène dans le capteur.

---

# *Bibliographie*

---





# Bibliographie

---

- [Abramoff, 2004] Abramoff M. D., Magelhaes P. J., and Ram S. J. **2004**. Image processing with ImageJ, *Biophotonics International*, 11: 7 36-42.
- [Aguilera, 2011] Aguilera L. M. C., Romano M. F., Gil M. L. A., Rodriguez I. N., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros J. L., and Santander J. M. P. **2011**. New, fast and green procedure for the synthesis of gold nanoparticles based on sonocatalysis, *Ultrasonic Sonochemistry*, 18: 3 789-794.
- [Ahmadi, 1997] Ahmadi T. S., Logunov S. L., and ElSayed M. A. **1997**. Size-dependent electron dynamics of gold nanoparticles, *Nanostructured Materials*, 679125-140.
- [Aina, 2010] Aina V., Marchis T., Laurenti E., Diana E., Lusvardi G., Malavasi G., Menabue L., Cerrato G., and Morterra C. **2010**. Functionalization of sol gel bioactive glasses carrying Au nanoparticles: selective Au affinity for amino and thiol ligand groups, *Langmuir*, 26: 24 18600-18605.
- [Alkilany, 2010] Alkilany A. M., and Murphy C. J. **2010**. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 7 2313-2333.
- [Allen, 1961] Allen A. O. **1961**. The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions. (Van Nostrand-Reinhold: Princeton: New-York, USA).
- [Alric, 2008] Alric C., Taleb J., Le Duc G., Mandon C., Billotey C., Le Meur-Herland A., Brochard T., Vocanson F., Janier M., Perriat P., Roux S., and Tillement O. **2008**. Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging, *Journal of American Chemical Society*, 130: 18 5908-5915.
- [Arora, 1982] Arora H. K., Aggarwal A. R., and Singh R. P. **1982**. Acid dissociation constants of electronically excited coumarins, *Indian Journal of Chemistry*, 21844.
- [Ashawa, 1979] Ashawa S. C., Kini U. R., and Madhvanath U. **1979**. The aqueous coumarin system as a low range chemical dosimeter, *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 30: 1 7-10.
- [Attri, 2015] Attri P., Kim Y. H., Park D. H., Park J. H., Hong Y. J., Uhm H. S., Kim K.-N., Fridman A., and Choi E. H. **2015**. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis, *Scientific Report*, 59332.
- [Bababunmi, 1975] Bababunmi E. A., French M. R., Rutman R. J., Bassir O., and Dring L. G. **1975**. A study of the fluorescence of 5-hydroxycoumarin, 5-methoxycoumarin and aflatoxin B1, *Biochemical Society Transactions* 940-943.
- [Babaei, 2014] Babaei M., and Ganjalikhan M. **2014**. The potential effectiveness of nanoparticles as radiosensitizers for radiotherapy, *BiolImpacts : BI*, 4: 1 15-20.
- [Bailly, 2004] Bailly F., Maurin C., Teissier E., Vezin H., and Cotelle P. **2004**. Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12: 21 5611-5618.
- [Binnig, 1986] Binnig G., and Rohrer H. **1986**. Scanning Tunneling Microscopy - From Birth to Adolescence *Nobel lecture*.
- [Boisde, 2000] Boisde P. M., and Meuly W. C. **2000**. Coumarin. in, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- [Bond, 2006] Bond G. C., Louis C., and Thompson D. **2006**. Catalysis by Gold (Catalytic Science series).
- [Boronat, 2010] Boronat M., and Corma A. **2010**. Oxygen activation on gold nanoparticles: separating the influence of particle size, particle shape and support interaction, *Dalton Transactions*, 39: 36 8538-8546.

- [Boudaïffa, 2000] Boudaïffa B., Cloutier P., Hunting D., Huels M. A., and Sanche L. **2000**. Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons, *Science*, 287: 5458-1658-1660.
- [Boyle, 1969] Boyle J. W., Ghormley J. A., Hochanadel C. J., and Riley J. R. **1969**. Production of hydrated electrons by flash photolysis of liquid water with light in the first continuum, *Journal of Physical Chemistry*, 73: 9 2886-2890.
- [Brun, 2009a] Brun E. **2009a**. Vers la compréhension de l'effet radiosensibilisateur des nanoparticules d'or soumises à un rayonnement X, Thèse de Doctorat, Université Paris Sud.
- [Brun, 2009b] Brun E., Sanche L., and Sicard-Roselli C. **2009b**. Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72: 1 128-134.
- [Brun, 2014] Brun E., and Sicard – Roselli C. **2014**. Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction?, *Cancer Nanotechnology*, 5: 1 7.
- [Brust, 1994] Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D. J., and Whyman R. **1994**. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*: 7 801-802.
- [Butson, 2003] Butson M. J., Peter K., Cheung T., and Metcalfe P. **2003**. Radiochromic film for medical radiation dosimetry, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 41: 3 61-120.
- [Butterworth, 2010] Butterworth K. T., Coulter J. A., Jain S., Forker J., McMahon S. J., Schettino G., Prise K. M., Currell F. J., and Hirst D. G. **2010**. Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy, *Nanotechnology*, 21: 29 295101.
- [Butterworth, 2013] Butterworth K. T., McMahon S. J., Taggart L. E., and K.M. P. **2013**. Radiosensitization by gold nanoparticles: effective at megavoltage energies and potential role of oxidative stress, *Translational Cancer Research*, 2: 4 269-279.
- [Butterworth, 2008] Butterworth K. T., Wyer J. A., Brennan-Fournet M., Latimer C. J., Shah M. B., Currell F. J., and Hirst D. G. **2008**. Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles, *Radiation research*, 170: 3 381-387.
- [Buxton, 2003] Buxton G. V. **2003**. The Radiation Chemistry of Liquid Water: Principles and Applications (Mozumder, A.; Hatano, Y.: New York, USA).
- [Buxton, 1988] Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P., and Ross A. B. **1988**. Critical-Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen-Atoms and Hydroxyl Radicals (.OH/.O-) in Aqueous-Solution, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17: 2 513-886.
- [Cai, 2005] Cai Z. L., Cloutier P., Sanche L., and Hunting D. **2005**. DNA interduplex crosslinks induced by Al(K alpha) X rays under vacuum, *Radiation research*, 164: 2 173-179.
- [Campbell, 2011] Campbell C. T., Sharp J. C., Yao Y., Karp E. M., and Silbaugh T. L. **2011**. Insights into catalysis by gold nanoparticles and their support effects through surface science studies of model catalysts, *Faraday discussions*, 152227-239.
- [Cañaveras, 2012] Cañaveras F., Madueño R., Sevilla J. M., Blázquez M., and Pineda T. **2012**. Role of the Functionalization of the Gold Nanoparticle Surface on the Formation of Bioconjugates with Human Serum Albumin, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116: 18 10430-10437.
- [Carrasco, 2012] Carrasco J., Hodgson A., and Michaelides A. **2012**. A molecular perspective of water at metal interfaces, *Nature Material*, 11: 8 667-674.
- [Carrière, 2012] Carrière M. **2012**. What About Toxicity and Ecotoxicity of Gold Nanoparticles? . in Louis C. and Pluchery O. (eds.), *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology* (Imperial College Press: London).
- [Carter, 2007] Carter J. D., Cheng N. N., Qu Y., Suarez G. D., and Guo T. **2007**. Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures, *Journal of Physical Chemistry B*, 111: 40 11622-11625.
- [Casta, 2014a] Casta R., Champeaux J. P., Cafarelli P., Moretto-Capelle P., and Sence M. **2014a**. Model for electron emission of high-Z radio-sensitizing nanoparticle irradiated by X-rays, *Journal of Nanoparticle Research*, 16: 7 2480.

- [Casta, 2014b] Casta R., Champeaux J. P., Sence M., Moretto-Capelle P., Cafarelli P., Amsellem A., and Sicard-Roselli C. **2014b**. Electronic emission of radio-sensitizing gold nanoparticles under X-ray irradiation: experiment and simulations, *Journal of Nanoparticle Research*, 16: 4 2348.
- [Ceresa, 2014] Ceresa C., Bravin A., Cavaletti G., Pellei M., and Santini C. **2014**. The Combined Therapeutical Effect of Metal-based Drugs and Radiation Therapy: The Present Status of Research, *Current medicinal chemistry*, 21: 20 2237-2265.
- [Chatterjee, 2011] Chatterjee D. K., Diagaradjane P., and Krishnan S. **2011**. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy, *Therapeutic Delivery*, 2: 8 1001-1014.
- [Chattopadhyay, 2013] Chattopadhyay N., Cai Z. L., Kwon Y. L., Lechtman E., Pignol J. P., and Reilly R. M. **2013**. Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation, *Breast Cancer Research and Treatment*, 137: 1 81-91.
- [Chattopadhyay, 2010] Chattopadhyay N., Cai Z. L., Pignol J. P., Keller B., Lechtman E., Bendayan R., and Reilly R. M. **2010**. Design and Characterization of HER-2-Targeted Gold Nanoparticles for Enhanced X-radiation Treatment of Locally Advanced Breast Cancer, *Molecular Pharmaceutics*, 7: 6 2194-2206.
- [Chen, 2014] Chen G., Qiu H., Prasad P. N., and Chen X. **2014**. Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics, *Chemical Reviews*, 114: 10 5161-5214.
- [Chen, 2008] Chen Y.-M., Yu C.-J., Cheng T.-L., and Tseng W.-L. **2008**. Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 24: 7 3654-3660.
- [Cho, 2005] Cho S. H. **2005**. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study, *Physics in Medicine and Biology*, 50: 15 N163-173.
- [Cho, 2009] Cho W. S., Cho M., Jeong J., Choi M., Cho H. Y., Han B. S., Kim S. H., Kim H. O., Lim Y. T., Chung B. H., and Jeong J. **2009**. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicology Applied Pharmacology*, 236: 1 16-24.
- [Chow, 2012] Chow J. C., Leung M. K., and Jaffray D. A. **2012**. Monte Carlo simulation on a gold nanoparticle irradiated by electron beams, *Physics in Medicine and Biology*, 57: 11 3323-3331.
- [Cole, 2015] Cole L. E., Ross R. D., Tilley J. M. R., Vargo-Gogola T., and Roeder R. K. **2015**. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography, *Nanomedicine*, 10: 2 321-341.
- [Conde, 2014] Conde J., Dias J. T., Grazú V., Moros M., Baptista P. V., and De La Fuente J. M. **2014**. Revisiting 30 years of Biofunctionalization and Surface Chemistry of Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine, *Frontiers in Chemistry*, 2.
- [Creaven, 1965] Creaven P. J., Parke D. V., and Williams R. T. **1965**. A spectrofluorimetric study of the 7-hydroxylation of coumarin by liver microsomes, *Biochemistry Journal*, 96: 2 390-398.
- [Czapski, 1993] Czapski G., and Bielski B. H. J. **1993**. Absorption spectra of the  $\cdot\text{OH}$  and  $\text{O}^{\cdot-}$  radicals in aqueous solutions, *Radiation Physics and Chemistry*, 41: 3 503-505.
- [Dahmen, 2007] Dahmen C., and von Plessen G. **2007**. Optical effects of metallic nanoparticles, *Australian Journal of Chemistry*, 60: 7 447-456.
- [Daniel, 2003] Daniel M.-C., and Astruc D. **2003**. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104: 1 293-346.
- [Daniel, 2014] Daniel N. M., Takashi N., and David A. L. **2014**. A simple method for the quantification of molecular decorations on silica particles, *Science and Technology of Advanced Materials*, 15: 1 015002.
- [Debierne, 1914] Debierne A. **1914**. Recherches Sur Les Gaz Produits Par Les Substances Radioactives. Décomposition De L'eau, *Annales de Physique (Paris)*, 297-127.
- [Debouttière, 2006] Debouttière P. J., Roux S., Vocanson F., Billotey C., Beuf O., Favre-Réguillon A., Lin Y., Pellet-Rostaing S., Lamartine R., Perriat P., and Tillement O. **2006**. Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Advanced Functional Materials*, 16: 18 2330-2339.

- [Delorme, 2013] Delorme R. **2013**. Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules : modélisation à l'échelle sub-micromérique et comparaison expérimentale, Thèse de Doctorat, Université Paris Sud.
- [Deng, 2011] Deng Z. J., Liang M., Monteiro M., Toth I., and Minchin R. F. **2011**. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation, *Nature Nanotechnology*, 6: 1 39-44.
- [Dieterich, 2011] Dieterich S., and Gibbs I. C. **2011**. The CyberKnife in clinical use: current roles, future expectations, *Frontiers of radiation therapy and oncology*: 43 181-194.
- [Doane, 2012] Doane T. L., Chuang C. H., Hill R. J., and Burda C. **2012**. Nanoparticle zeta -potentials, *Account of Chemical Research*, 45: 3 317-326.
- [Dobrovolskaia, 2009] Dobrovolskaia M. A., Patri A. K., Zheng J. W., Clogston J. D., Ayub N., Aggarwal P., Neun B. W., Hall J. B., and McNeil S. E. **2009**. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 5: 2 106-117.
- [Dubois, 1992] Dubois L. H., and Nuzzo R. G. **1992**. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic-Surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*, 43437-463.
- [Dulkeith, 2002] Dulkeith E., Morteani A., Niedereichholz T., Klar T., Feldmann J., Levi S., Van Veggel F., Reinhoudt D., Möller M., and Gittins D. **2002**. Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects, *Physical review letters*, 89: 20 203002.
- [Dulkeith, 2005] Dulkeith E., Ringler M., Klar T., Feldmann J., Munoz Javier A., and Parak W. **2005**. Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression, *Nano Letters*, 5: 4 585-589.
- [Dykman, 2014] Dykman L. A., and Khlebtsov N. G. **2014**. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells, *Chemical Reviews*, 114: 2 1258-1288.
- [Emfietzoglou, 2009] Emfietzoglou D., Kyriakou I., Abril I., Garcia-Molina R., Petsalakis I., Nikjoo H., and Pathak A. **2009**. Electron inelastic mean free paths in biological matter based on dielectric theory and local-field corrections, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267: 1 45-52.
- [Enustun, 1963] Enustun B. V., and Turkevich J. **1963**. Coagulation of Colloidal Gold, *Journal of American Chemical Society*, 85: 21 3317-3328.
- [Ferradini, 1999] Ferradini C., and Jay-Gerin J. P. **1999**. Radiolysis of water and aqueous solutions - History and present state of the science, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 77: 9 1542-1575.
- [Feynman, 1959] Feynman R. **1959**. <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>.
- [Fleige, 2012] Fleige E., Quadir M. A., and Haag R. **2012**. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 9 866-884.
- [Foley, 2004] Foley S., Rotureau P., Pin S., Baldacchino G., Renault J. P., and Mialocq J. C. **2004**. Radiolysis of confined water: production and reactivity of hydroxyl radicals, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 44: 1 110-112.
- [Franceschetti, 2003] Franceschetti A., Pennycook S. J., and Pantelides S. T. **2003**. Oxygen chemisorption on Au nanoparticles, *Chemical Physics Letters*, 374: 5-6 471-475.
- [Frei, 2011] Frei M., Aradhya S. V., Koentopp M., Hybertsen M. S., and Venkataraman L. **2011**. Mechanics and chemistry: single molecule bond rupture forces correlate with molecular backbone structure, *Nano Letters*, 11: 4 1518-1523.
- [Frens, 1973] Frens G. **1973**. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions., *Nature*, 24120-22.
- [Fujishima, 2000] Fujishima A., Rao T. N., and Tryk D. A. **2000**. Titanium dioxide photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1: 1 1-21.
- [Fukushima, 2003] Fukushima M., Yanagi H., Hayashi S., Suganuma N., and Taniguchi Y. **2003**. Fabrication of gold nanoparticles and their influence on optical properties of dye-doped sol-gel films, *Thin Solid Films*, 43839-43.

- [Fulford, 2001] Fulford J., Nikjoo H., Goodhead D. T., and O'Neill P. **2001**. Yields of SSB and DSB induced in DNA by Al(K) ultrasoft X-rays and alpha-particles: comparison of experimental and simulated yields, *Int J Radiat Biol*, 77: 10 1053-1066.
- [Geng, 2011] Geng F., Song K., Xing J. Z., Yuan C. Z., Yan S., Yang Q. F., Chen J., and Kong B. H. **2011**. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer, *Nanotechnology*, 22: 28.
- [Ghosh, 2012] Ghosh D., Nandi N., and Chattopadhyay N. **2012**. Differential Forster resonance energy transfer from the excimers of poly(N-vinylcarbazole) to coumarin 153, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116: 15 4693-4701.
- [Ghosh, 2008] Ghosh P., Han G., De M., Kim C. K., and Rotello V. M. **2008**. Gold nanoparticles in delivery applications, *Advance Drug Delivery Review*, 60: 11 1307-1315.
- [Ghosh, 2004] Ghosh S. K., Nath S., Kundu S., Esumi K., and Pal T. **2004**. Solvent and Ligand Effects on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) of Gold Colloids, *The Journal of Physical Chemistry B*, 108: 37 13963-13971.
- [Giesel, 1902] Giesel F. **1902**. Uber Radium Und Radioactive Stoffe. , *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 353608-3611.
- [Giljohann, 2010] Giljohann D. A., Seferos D. S., Daniel W. L., Massich M. D., Patel P. C., and Mirkin C. A. **2010**. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 19 3280-3294.
- [Gilles, 2012] Gilles M. **2012**. Optimisation du design de Nanoparticules d'Or pour la radiothérapie, Rapport de Stage de M2, Université Paris Sud.
- [Gilles, in preparation] Gilles M., Brun E., Polin C., Wardlow N., Currell F., and Sicard-Roselli C. **in preparation**. Role of GNP size on hydroxyl radical generation.
- [Gilles, 2014] Gilles M., Brun E., and Sicard-Roselli C. **2014**. Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123770-777.
- [Gilles, 2015] Gilles M., Brun E., and Sicard-Roselli C. **2015**. Quantification of the radical species emitted from gold nanoparticules submitted to ionizing radiation, *Submitted to Journal of American Chemical Society*.
- [Goy-López, 2012] Goy-López S., Juárez J., Alatorre-Meda M., Casals E., Puentes V. F., Taboada P., and Mosquera V. **2012**. Physicochemical Characteristics of Protein–NP Bioconjugates: The Role of Particle Curvature and Solution Conditions on Human Serum Albumin Conformation and Fibrillogenesis Inhibition, *Langmuir*, 28: 24 9113-9126.
- [Guerrero, 2014] Guerrero A. R., Hassan N., Escobar C. A., Albericio F., Kogan M. J., and Araya E. **2014**. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release, *Nanomedicine*, 9: 13 2023-2039.
- [Hainfeld, 2014a] Hainfeld J., Slatkin D., Focella T., and Smilowitz H. **2014a**. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *The British Journal of Radiology*, 79: 939 248-253.
- [Hainfeld, 2014b] Hainfeld J. F., Lin L., Slatkin D. N., Dilmanian F. A., Vadas T. M., and Smilowitz H. M. **2014b**. Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10: 8 1609-1617.
- [Hainfeld, 2004] Hainfeld J. F., Slatkin D. N., and Smilowitz H. M. **2004**. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Physics in Medicine and Biology*, 49: 18 N309-N315.
- [Hakkinen, 2012] Hakkinen H. **2012**. The gold-sulfur interface at the nanoscale, *Nature Chemistry*, 4: 6 443-455.
- [Halliwell, 1993] Halliwell B., and Chirico S. **1993**. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The American journal of clinical nutrition*, 57: 5 715S-724S.
- [Halliwell, 2004] Halliwell B., and Whiteman M. **2004**. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, 142: 2 231-255.
- [Hart, 1962] Hart E. J. B., J. W. **1962**. Absorption Spectrum of the Hydrated Electron in Water and in Aqueous Solutions, *Journal of American Chemical Society*, 84: 21 4090-4095.
- [Hayat, 1989] Hayat M. A. **1989**. Colloidal gold: principles, methods and applications (Academic Press California, USA).
- [He, 1992] He X. M., and Carter D. C. **1992**. Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, 358: 6383 209-215.

- [He, 2005] He Y. Q., Liu S. P., Kong L., and Liu Z. F. **2005**. A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61: 13-14 2861-2866.
- [Henke, 1977] Henke B. L., Smith J. A., and Attwood D. T. **1977**. 0.1–10-keV x-ray-induced electron emissions from solids—Models and secondary electron measurements, *Journal of Applied Physics*, 48: 5 1852-1866.
- [Hermann, 2003] Hermann H. **2003**. Kinetics of aqueous phase reactions relevant for atmospheric chemistry, *Chemical Reviews*, 103: 12 4691-4716.
- [Hinterwirth, 2013] Hinterwirth H., Wiedmer S. K., Moilanen M., Lehner A., Allmaier G., Waitz T., Lindner W., and Lammerhofer M. **2013**. Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles, *Journal of Separation Science*, 36: 17 2952-2961.
- [Hoshi, 1992] Hoshi M., Uehara S., Yamamoto O., Sawada S., Asao T., Kobayashi K., Maezawa H., Furusawa Y., Hieda K., and Yamada T. **1992**. Iron(II) sulphate (Fricke solution) oxidation yields for 8.9 and 13.6 keV X-rays from synchrotron radiation, *Int J Radiat Biol*, 61: 1 21-27.
- [Hu, 2015] Hu C., Niestroj M., Yuan D., Chang S., and Chen J. **2015**. Treating cancer stem cells and cancer metastasis using glucose-coated gold nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 102065.
- [Huang, 2007] Huang X., Jain P. K., El-Sayed I. H., and El-Sayed M. A. **2007**. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, *Nanomedicine (London)*, 2: 5 681-693.
- [ICRU, 1970] ICRU. **1970**. Linear Energy Transfer. In *ICRU Report 16*. Washington, USA: International Commission on Radiation Units and Measurements.
- [INCa, 2013] INCa. **2013**. Rapport Inca, les données du cancer : les cancers en France.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili J. **1992**. Intermolecular and Surface Force, 2nd edition. In.: Academic Press, London.
- [Jain, 2011] Jain S., Coulter J. A., Hounsell A. R., Butterworth K. T., McMahon S. J., Hyland W. B., Muir M. F., Dickson G. R., Prise K. M., Currell F. J., O'Sullivan J. M., and Hirst D. G. **2011**. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies, *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 79: 2 531-539.
- [Jeremic, 2013] Jeremic B., Aguerri A. R., and Filipovic N. **2013**. Radiosensitization by gold nanoparticles, *Clinical and Translational Oncology*, 15: 8 593-601.
- [Jiang, 2009] Jiang H. L., Liu B., Akita T., Haruta M., Sakurai H., and Xu Q. **2009**. Au@ZIF-8: CO Oxidation over Gold Nanoparticles Deposited to Metal-Organic Framework, *Journal of the American Chemical Society*, 131: 32 11302.
- [Joh, 2013] Joh D. Y., Sun L., Stangl M., Al Zaki A., Murty S., Santoiemma P. P., Davis J. J., Baumann B. C., Alonso-Basanta M., Bhang D., Kao G. D., Tsourkas A., and Dorsey J. F. **2013**. Selective Targeting of Brain Tumors with Gold Nanoparticle-Induced Radiosensitization, *PloS one*, 8: 4 e62425.
- [Jokerst, 2011] Jokerst J. V., Lobovkina T., Zare R. N., and Gambhir S. S. **2011**. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine*, 6: 4 715-728.
- [Jones, 2010] Jones B. L., Krishnan S., and Cho S. H. **2010**. Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations, *Medical Physics*, 37: 7 3809-3816.
- [Joshi, 2004] Joshi H., Shirude P. S., Bansal V., Ganesh K. N., and Sastry M. **2004**. Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 31 11535-11540.
- [Kamenetska, 2009] Kamenetska M., Koentopp M., Whalley A. C., Park Y. S., Steigerwald M. L., Nuckolls C., Hybertsen M. S., and Venkataraman L. **2009**. Formation and Evolution of Single-Molecule Junctions, *Physical review letters*, 102: 12 6803.
- [Kaplan, 1990] Kaplan I. G. M., A. M.; Sukhonosov, V. Y. . **1990**. Simulation of the Primary Stage of Liquid Water Radiolysis, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 36: 3 493-498.
- [Kaura, 2013] Kaura H., Pujaria G., Semwalb M. K., Sarmaa A., and Kumar Avasthi D. **2013**. In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cell, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 3017-11.

- [Kawabata, 1966] Kawabata A., and Kubo R. **1966**. Electronic properties of fine metallic nanoparticles. II. Plasma resonance absorption, *Journal of the Physical Society of Japan*, 211765-1772.
- [Keene, 1960] Keene J. P. **1960**. Kinetics of Radiation-Induced Chemical Reactions, *Nature*, 188: 4753 843-844.
- [Keene, 1963] Keene J. P. **1963**. Absorption Spectra in Irradiated Water and Some Solutions: Optical Absorptions in Irradiated Water *Nature Nanotechnology*, 197: 4862 47-48.
- [Kelly, 2003] Kelly K. L., Coronado E., Zhao L. L., and Schatz G. C. **2003**. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment, *Journal of Physical Chemistry B*, 107: 3 668-677.
- [Khan, 2014] Khan F. M., and Gibbons J. P. **2014**. Khan's The Physics of Radiation Therapy (Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA).
- [Khan, 2004] Khan K. M., Saify Z. S., Khan M. Z., Zia-Ullah, Choudhary M. I., Atta-ur-Rahman, Perveen S., Chohan Z. H., and Supuran C. T. **2004**. Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19: 4 373-379.
- [Khan, 2013] Khan S., Gupta A., and Nandi C. K. **2013**. Controlling the Fate of Protein Corona by Tuning Surface Properties of Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4: 21 3747-3752.
- [Khlebtsov, 2011] Khlebtsov N., and Dykman L. **2011**. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, *Chemical Society Reviews*, 40: 3 1647-1671.
- [Kim, 2007] Kim D., Park S., Lee J. H., Jeong Y. Y., and Jon S. **2007**. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo x-ray computed tomography imaging, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 3: 4 352-352.
- [Kim, 2011] Kim J. H., Lavin B. W., Burnett R. D., and Boote B. W. **2011**. Controlled synthesis of gold nanoparticles by fluorescent light irradiation, *Nanotechnology*, 22: 28 5602.
- [Kimling, 2006] Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., and Plech A. **2006**. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 32 15700-15707.
- [Kittel, 1996] Kittel C. **1996**. Introduction to solid-state physics (Wiley: New York, USA).
- [Kolate, 2014] Kolate A., Baradia D., Patil S., Vhora I., Kore G., and Misra A. **2014**. PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 192: 0 67-81.
- [Komeda, 2012] Komeda S., and Casini A. **2012**. Next-generation anticancer metallodrugs, *Current topics in medicinal chemistry*, 12: 3 219-235.
- [Kong, 2008] Kong T., Zeng J., Wang X. P., Yang X. Y., Yang J., McQuarrie S., McEwan A., Roa W., Chen J., and Xing J. Z. **2008**. Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles, *Small*, 4: 9 1537-1543.
- [Kretschmann, 1968] Kretschmann E., and Raether H. **1968**. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Zeitschrift für Naturforschung A*, 232135-2136.
- [Kumar, 2003] Kumar A., Mandal S., Selvakannan P. R., Pasricha R., Mandale A. B., and Sastry M. **2003**. Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles, *Langmuir*, 19: 15 6277-6282.
- [Kumar, 2006] Kumar S., Gandhi K. S., and Kumar R. **2006**. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46: 10 3128-3136.
- [Kumar, 2011] Kumar V., and Yadav S. K. **2011**. Synthesis of Variable Shaped Gold Nanoparticles in One Solution Using Leaf Extract of Bauhinia Variegata L, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6: 4 1685-1693.
- [Lakowicz, 1973a] Lakowicz J. R., and Weber G. **1973a**. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules, *Biochemistry*, 12: 21 4161-4170.
- [Lakowicz, 1973b] Lakowicz J. R., and Weber G. **1973b**. Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale, *Biochemistry*, 12: 21 4171-4179.
- [Lechtman, 2011] Lechtman E., Chattopadhyay N., Mashouf S., Cai Z., Reilly R., and Pignol J. **2011**. Gold Nanoparticle Radiosensitization: Optimizing Photon Energy, Nanoparticle Size, and Location for Clinical Translation, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81: 2 S740-S740.



- [Lesser, 2006] Lesser M. P. **2006**. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology, *Annual Review of Physiology*, 68:253-278.
- [Leung, 2011] Leung M. K., Chow J. C., Chithrani B. D., Lee M. J., Oms B., and Jaffray D. A. **2011**. Irradiation of gold nanoparticles by x-rays: Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production, *Medical Physics*, 38: 2 624-631.
- [Levivier, 2011] Levivier M., Gevaert T., and Negretti L. **2011**. Gamma Knife, CyberKnife, TomoTherapy: gadgets or useful tools?, *Current opinion in neurology*, 24: 6 616-625.
- [Li, 2011] Li C., Li D., Wan G., Xu J., and Hou W. **2011**. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls, *Nanoscale Research Letters*, 6: 1 440.
- [Lim, 2011] Lim Z.-Z. J., Li J.-E. J., Ng C.-T., Yung L.-Y. L., and Bay B.-H. **2011**. Gold nanoparticles in cancer therapy, *Acta Pharmacologica Sinica*, 32: 8 983-990.
- [Link, 1999a] Link S., and El-Sayed M. A. **1999a**. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B*, 103:4212-4217.
- [Link, 1999b] Link S., and El-Sayed M. A. **1999b**. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103: 40 8410-8426.
- [Link, 2000] Link S., and El-Sayed M. A. **2000**. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *International Reviews in Physical Chemistry*, 19: 3 409-453.
- [Liu, 2010] Liu C. J., Wang C. H., Chen S. T., Chen H. H., Leng W. H., Chien C. C., Wang C. L., Kempson I. M., Hwu Y., Lai T. C., Hsiao M., Yang C. S., Chen Y. J., and Margaritondo G. **2010**. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles, *Physics in Medicine and Biology*, 55: 4 931-945.
- [Lopez, 2002] Lopez N., and Norskov J. K. **2002**. Catalytic CO oxidation by a gold nanoparticle: A density functional study, *Journal of the American Chemical Society*, 124: 38 11262-11263.
- [Loutit, 2005] Loutit G., Foley S., Cabillic J., Coffigny H., Taran F., Valleix A., Renault J. P., and Pin S. **2005**. The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography, *Radiation Physics and Chemistry*, 72: 2-3 119-124.
- [Loutit, 2009] Loutit G., Hanedanian M., Taran F., Coffigny H., Renault J. P., and Pin S. **2009**. Determination of hydroxyl rate constants by a high-throughput fluorimetric assay: towards a unified reactivity scale for antioxidants, *Analyst*, 134: 2 250-255.
- [Lundkvist, 2005] Lundkvist J., Ekman M., Ericsson S. R., Jönsson B., and Glimelius B. **2005**. Proton-therapy of cancer: Potential clinical advantages and cost-effectiveness, *Acta Oncologica*, 44: 8 850-861.
- [Lynch, 2008] Lynch I., and Dawson K. A. **2008**. Protein-nanoparticle interactions, *nano today*, 3: 1-2 40-47.
- [Ma, 2013] Ma J., Schmidhammer U., Pernot P., and Mostafavi M. **2013**. Reactivity of the Strongest Oxidizing Species in Aqueous Solutions: The Short-Lived Radical Cation  $H_2O^{\bullet+}$ , *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5: 1 258-261.
- [Schäffler, 2013] Schäffler M., Semmler-Behnke M., Sarioglu H., Takenaka S., Wenk A., Schleh C., Hauck S.M., Johnston B.D., Kreyling W.G. **2013**. Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles, *Nanotechnology*, 24: 26 265103.
- [Maus, 2009] Maus L., Spatz J. P., and Fiammengo R. **2009**. Quantification and Reactivity of Functional Groups in the Ligand Shell of PEGylated Gold Nanoparticles via a Fluorescence-Based Assay, *Langmuir*, 25: 14 7910-7917.
- [McMahon, 2011a] McMahon S. J., Hyland W. B., Brun E., Butterworth K. T., Coulter J. A., Douki T., Hirst D. G., Jain S., Kavanagh A. P., Krpetic Z., Mendenhall M. H., Muir M. F., Prise K. M., Requardt H., Sanche L., Schettino G., Sicard-Roselli C., and Currell F. **2011a**. Energy dependence of gold nanoparticle radiosensitization in plasmid DNA, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115: 41 20160-20167.
- [McMahon, 2011b] McMahon S. J., Hyland W. B., Muir M. F., Coulter J. A., Jain S., Butterworth K. T., Schettino G., Dickson G. R., Hounsell A. R., O'Sullivan J. M., Prise K. M., Hirst D. G., and Currell F. J. **2011b**. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy, *Radiotherapy Oncology*, 100: 3 412-416.

- [McMahon, 2008] McMahon S. J., Mendenhall M. H., Jain S., and Currell F. **2008**. Radiotherapy in the presence of contrast agents: a general figure of merit and its application to gold nanoparticles, *Physics in Medicine and Biology*, 53: 20 5635-5651.
- [Merga, 2006] Merga G., Milosavljevic B. H., and Meisel D. **2006**. Radiolytic Hydrogen Yields in Aqueous Suspensions of Gold Particles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 11 5403-5408.
- [Mie, 1908] Mie G. **1908**. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Annalen der Physik*, 330: 3 377-445.
- [Mills, 2003] Mills G., Gordon M. S., and Metiu H. **2003**. Oxygen adsorption on Au clusters and a rough Au(111) surface: The role of surface flatness, electron confinement, excess electrons, and band gap, *Journal of Chemical Physics*, 118: 4198-4205.
- [Muddineti, 2015] Muddineti O. S., Ghosh B., and Biswas S. **2015**. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, 484: 1-2 252-267.
- [Mulvaney, 1996] Mulvaney P. **1996**. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, *Langmuir*, 12: 3 788-800.
- [Nakken, 1965] Nakken K. F., and Pihl A. **1965**. On the ability of nitrous oxide to convert hydrated electrons into hydroxyl radical, *Radiation research*, 26: 4 519-526.
- [Nath, 2004] Nath N., and Chilkoti A. **2004**. Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: Optimization of nanoparticle size, *Analytical Chemistry*, 76: 18 5370-5378.
- [Nath, 1990] Nath R., Bongiorno P., and Rockwell S. **1990**. Iododeoxyuridine Radiosensitization by Low-Energy and High-Energy Photons for Brachytherapy Dose-Rates, *Radiation research*, 124: 3 249-258.
- [Nayak, 2008] Nayak N. C., and Shin K. **2008**. Human serum albumin mediated self-assembly of gold nanoparticles into hollow spheres, *Nanotechnology*, 19: 26 265603.
- [Nielsen, 1976] Nielsen S. O., Michael B. D., and Hart E. J. **1976**. Ultraviolet absorption spectra of hydrated electrons, hydrogen, hydroxyl, deuterium, and hydroxyl-d radicals from pulse radiolysis of aqueous solutions, *The journal of Physical Chemistry*, 80: 22 2482-2488.
- [NIST] NIST. <http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/>.
- [Noguez, 2007] Noguez C. **2007**. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111: 10 3806-3819.
- [Ojea-Jimenez, 2010] Ojea-Jimenez I., Romero F. M., Bastus N. G., and Puntès V. **2010**. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114: 4 1800-1804.
- [Otto, 1968] Otto A. **1968**. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik*, 216: 4 398-410.
- [Owens, 2006] Owens D. E., and Peppas N. A. **2006**. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307: 1 93-102.
- [Palpant, 2012] Palpant B. **2012**. Photothermal Properties of Gold Nanoparticles in Louis C. and Pluchery O. (eds.), *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology* (Imperial College Press: London).
- [Park, 1996] Park S. W., Seo B. S., Kim E. H., Kim D. H., and Paeng K. J. **1996**. Purification and determination procedure of coumarin derivatives, *Journal of Forensic Sciences*, 41: 4 685-688.
- [Patungwasa, 2008] Patungwasa W., and Hodak J. H. **2008**. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction, *Materials Chemistry and Physics*, 108: 1 45-54.
- [Petrola, 1986] Petrola R. **1986**. Absorptiometric and Fluorimetric study on the protonation of some hydroxy-substituted 2H-pyran-2-ones, *Finnish Chemical Letters*, 13: 185-191.
- [Pfeiffer, 2014] Pfeiffer C., Rehbock C., Hühn D., Carrillo-Carrion C., de Aberasturi D. J., Merk V., Barcikowski S., and Parak W. J. **2014**. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles, *Journal of the Royal Society Interface*, 11: 96 20130931.

- [Philip, 2008] Philip D. **2008**. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71: 1 80-85.
- [Pignol, 2003] Pignol J. P., Rakovitch E., Beachey D., and Le Sech C. **2003**. Clinical significance of atomic inner shell ionization (ISI) and Auger cascade for radiosensitization using IUdR, BUdR, platinum salts, or gadolinium porphyrin compounds, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 55: 4 1082-1091.
- [Pikaev, 1986] Pikaev A. **1986**. Water radiolysis mechanism. in, *Modern radiation chemistry. Radiolysis of gases and liquids* (Nauka: Moscow, Russia).
- [Polte, 2010] Polte J., Ahner T. T., Delissen F., Sokolov S., Emmerling F., Thunemann A. F., and Kraehnert R. **2010**. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation, *Journal of American Chemical Society*, 1321296.
- [Pong, 2007] Pong B. K., Elim H. I., Chong J. X., Ji W., Trout B. L., and Lee J. Y. **2007**. New Insights on the Nanoparticle Growth Mechanism in the Citrate Reduction of Gold(III) Salt: Formation of the Au Nanowire Intermediate and Its Nonlinear Optical Properties, *The Journal of Physical Chemistry C*, 1116281.
- [Popovtzer, 2008] Popovtzer R., Agrawal A., Kotov N. A., Popovtzer A., Balter J., Carey T. E., and Kopelman R. **2008**. Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Cancer, *Nano Letters*, 8: 12 4593-4596.
- [Prencipe, 2009] Prencipe G., Tabakman S. M., Welsher K., Liu Z., Goodwin A. P., Zhang L., Henry J., and Dai H. **2009**. PEG Branched Polymer for Functionalization of Nanomaterials with Ultralong Blood Circulation, *Journal of the American Chemical Society*, 131: 13 4783-4787.
- [Privman, 1999] Privman V., Goia D. V., Park J., and Matijević E. **1999**. Mechanism of formation of monodispersed colloids by aggregation of nanosize precursors, *Journal of Colloid and Interface Science*, 213: 1 36-45.
- [Rahman, 2013] Rahman M., Laurent S., Tawil N., Yahia H., and Mahmoudi M. **2013**. Protein-Nanoparticle Interactions, *Springer Series in Biophysics*, 15.
- [Rahman, 2011] Rahman M. R., Saleh F. S., Okajima T., and Ohsaka T. **2011**. pH Dependence of the size and crystallographic orientation of the gold nanoparticles prepared by seed-mediated growth, *Langmuir*, 27: 8 5126-5135.
- [Rahman, 2009] Rahman W. N., Bishara N., Ackerly T., He C. F., Jackson P., Wong C., Davidson R., and Geso M. **2009**. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy, *Nanomedicine*, 5: 2 136-142.
- [Rahman, 2014] Rahman W. N., Corde S., Yagi N., Abdul Aziz S. A., Annabell N., and Geso M. **2014**. Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams, *International Journal of Nanomedicine*, 92459-2467.
- [Rahme, 2013] Rahme K., Chen L., Hobbs R. G., Morris M. A., O'Driscoll C., and Holmes J. D. **2013**. PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions, *The Royal Society of Chemistry Advances*, 3: 17 6085-6094.
- [Ramachandran, 2003] Ramachandran G. K., Hopson T. J., Rawlett A. M., Nagahara L. A., Primak A., and Lindsay S. M. **2003**. A bond-fluctuation mechanism for stochastic switching in wired molecules, *Science*, 300: 5624 1413-1416.
- [Rapp, 2010] Rapp B., Ostrowsky A., and Daures J. **2010**. Development of a water calorimeter for dosimetry at LNE-LNHB, *Revue française de métrologie*, 2010-4: 24 3-8.
- [RCNDDC] RCNDDC. Radiation Chemistry Notre Dame Data Center. <https://www3.nd.edu/~ndrlrcdc/Compilations/Hydroxyl/OH.HTM>.
- [Remediakis, 2005] Remediakis I. N., Lopez N., and Norskov J. K. **2005**. CO oxidation on gold nanoparticles: Theoretical studies, *Applied Catalysis A: General*, 291: 1-2 13-20.
- [Riley, 1994] Riley P. A. **1994**. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation, *Int J Radiat Biol*, 65: 1 27-33.
- [Roa, 2009] Roa W., Zhang X. J., Guo L. H., Shaw A., Hu X. Y., Xiong Y. P., Gulavita S., Patel S., Sun X. J., Chen J., Moore R., and Xing J. Z. **2009**. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle, *Nanotechnology*, 20: 37 5101.

- [Roeske, 2007] Roeske J. C., Nunez L., Hoggarth M., Labay E., and Weichselbaum R. R. **2007**. Characterization of the theoretical radiation dose enhancement from nanoparticles, *Technology in Cancer Research and Treatment*, 6: 5 395-401.
- [Rohiman, 2011] Rohiman A., Surawijaya A., Anshori I., and Idris I. **2011**. Gold Nanoparticles Assisted Silicon Nanowire Growth using Vapor Liquid Solid Method, *4th Nanoscience and Nanotechnology Symposium (Nns2011): An International Symposium*, 1415.
- [Roldán, 2009] Roldán A., González S., Ricart J. M., and Illas F. **2009**. Critical Size for O<sub>2</sub> Dissociation by Au Nanoparticles, *Chemical Physics Chemistry*, 10: 2 348-351.
- [Roots, 1975] Roots R., and Okada S. **1975**. Estimation of Life Times and Diffusion Distances of Radicals Involved in X-Ray-Induced DNA Strand Breaks or Killing of Mammalian Cells, *Radiation research*, 64: 2 306-320.
- [Rostek, 2011] Rostek A., Mahl D., and Epple M. **2011**. Chemical composition of surface-functionalized gold nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 13: 10 4809-4814.
- [Rousseau, 2009] Rousseau J., Adam J.-F., Deman P., Wu T.-D., Guerquin-Kern J.-L., Gouget B., Barth R. F., Estève F., and Elleaume H. **2009**. Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma, *Journal of Synchrotron Radiation*, 16: 4 573-581.
- [Saavedra, 2014] Saavedra J., Doan H. A., Pursell C. J., Grabow L. C., and Chandler B. D. **2014**. The critical role of water at the gold-titania interface in catalytic CO oxidation, *Science*, 345: 6204 1599-1602.
- [Sanche, 2005] Sanche L. **2005**. Low energy electron-driven damage in biomolecules, *European Physical Journal D*, 35: 2 367-390.
- [Sandroff, 1985] Sandroff C. J., and Herschbach D. R. **1985**. Kinetics of displacement and charge transfer reactions probed by SERS: evidence for distinct donor and acceptor sites on colloidal gold surfaces, *Langmuir*, 1: 1 131-135.
- [Sanvicens, 2008] Sanvicens N., and Marco M. P. **2008**. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in Biotechnology*, 26: 8 425-433.
- [Schulz, 2014] Schulz F., Homolka T., Bastús N. G., Puentes V., Weller H., and Vossmeier T. **2014**. Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 30: 35 10779-10784.
- [Schwarz, 1981] Schwarz H. A. **1981**. Free Radicals Generated by Radiolysis of Aqueous Solutions, *Journal of Chemical Education*, 58: 2 101.
- [Sen, 2011] Sen T., Mandal S., Haldar S., Chattopadhyay K., and Patra A. **2011**. Interaction of gold nanoparticle with human serum albumin (HSA) protein using surface energy transfer, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115: 49 24037-24044.
- [Shang, 2007] Shang L., Wang Y., Jiang J., and Dong S. **2007**. pH-dependent protein conformational changes in albumin: gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study, *Langmuir*, 23: 5 2714-2721.
- [Sicard-Roselli, 2014] Sicard-Roselli C., Brun E., Gilles M., Baldacchino G., Kelsey C., McQuaid H., Polin C., Wardlow N., and Currell F. **2014**. A new mechanism for hydroxyl radical production in irradiated nanoparticle solutions, *Small*, 10: 16 3338-3346.
- [Sivaraman, 2011] Sivaraman S. K., Kumar S., and Santhanam V. **2011**. Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of chloroauric acid, *Journal of Colloid and Interface Science*, 361: 2 543-547.
- [Soussi, 2013] Soussi J., Voltz S., and Chalopin Y. **2013**. Thermal Properties of Functionalized Gold Nanoparticles for Hyperthermia In *GdR( Groupe de recherche) meeting Or-nano*. Nantes, France.
- [Spiers, 1949] Spiers F. W. **1949**. The influence of energy absorption and electron range on dosage in irradiated bone, *British Journal of Radiology*, 22: 261 521-533.
- [Spinks, 1990] Spinks J. W. T., and Woods R. J. **1990**. Introduction to radiation chemistry (Wiley: New-York, USA).
- [Stark, 2015] Stark W., Stoessel P., Wohlleben W., and Hafner A. **2015**. Industrial applications of nanoparticles, *Chemical Society Reviews*, DOI 10.1039/C4CS00362D
- [Su, 2003] Su C. H., Wu P. L., and Yeh C. S. **2003**. Sonochemical synthesis of well-dispersed gold nanoparticles at the ice temperature, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107: 51 14240-14243.

- [Tabata, 1991] Tabata Y. I., Y., and Tagawa S. **1991**. Handbook of Radiation Chemistry; CRC Press: Boca Raton, USA.
- [Thomas, 1966] Thomas J. K., Rabani J., Matheson M. S., Hart E. J., and Gordon S. **1966**. Absorption Spectrum of the Hydroxyl Radical, *The Journal of Physical Chemistry A*, 70: 7 2409-2410.
- [Thompson, 1992] Thompson D. W., and Collins I. R. **1992**. Electrical properties of the gold—aqueous solution interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 152: 1 197-204.
- [Tiwari, 2011] Tiwari P., Vig K., Dennis V., and Singh S. **2011**. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications, *Nanomaterials*, 1: 1 31-63.
- [Tomić, 2014] Tomić S., Dokić J., Vasilijić S., Ogrinc N., Rudolf R., Pelicon P., Vučević D., Milosavljević P., Janković S., and Anžel I. **2014**. Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro, *PLoS one*, 9: 5 e96584.
- [Tournebize, 2010] Tournebize J., Sapin-Minet A., Schneider R., Boudier A., Maincent P., and Leroy P. **2010**. Simple spectrophotometric method for quantitative determination of gold in nanoparticles, *Talanta*, 83: 5 1780-1783.
- [Turkevitch, 1985] Turkevitch J. **1985**. Colloidal gold. Part I : historical and preparative aspects, morphology and structure, *Gold Bulletin*, 1886-91.
- [Turkevitch, 1951] Turkevitch J., Stevenson P. C., and Hillier J. **1951**. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 1155-75.
- [Viñes, 2014] Viñes F., Gomes J. R., and Illas F. **2014**. Understanding the reactivity of metallic nanoparticles: beyond the extended surface model for catalysis, *Chemical Society Reviews*, 43: 14 4922-4939.
- [Von Sonntag, 2006] Von Sonntag C. **2006**. Free-radical-induced DNA damage and its repair. A chemical perspective (Springer: Berlin, Deutschland).
- [Walkey, 2011] Walkey C. D., Olsen J. B., Guo H., Emili A., and Chan W. C. W. **2011**. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake, *Journal of the American Chemical Society*, 134: 4 2139-2147.
- [Wang, 2013] Wang C., Li X., Wang Y., Liu Z., Fu L., and Hu L. **2013**. Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies, *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 5 1-12.
- [Wang, 2014] Wang Y., and Ni Y. **2014**. Combination of UV-vis spectroscopy and chemometrics to understand protein-nanomaterial conjugate: A case study on human serum albumin and gold nanoparticles, *Talanta*, 119: 0 320-330.
- [Wardman, 1989] Wardman P. **1989**. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 18: 4 1637-1755.
- [Weitz, 1985] Weitz D. A., Lin M. Y., and Sandroff C. J. **1985**. Colloidal aggregation revisited: New insights based on fractal structure and surface-enhanced Raman scattering, *Surface Science*, 158: 1-3 147-164.
- [Xia, 2010] Xia H. B., Bai S. O., Hartmann J., and Wang D. Y. **2010**. Synthesis of Monodisperse Quasi-Spherical Gold Nanoparticles in Water via Silver(I)-Assisted Citrate Reduction, *Langmuir*, 26: 5 3585-3589.
- [Xia, 2012] Xia X. H., Yang M. X., Wang Y. C., Zheng Y. Q., Li Q. G., Chen J. Y., and Xia Y. N. **2012**. Quantifying the Coverage Density of Poly(ethylene glycol) Chains on the Surface of Gold Nanostructures, *ACS nano*, 6: 1 512-522.
- [Yonezawa, 1999] Yonezawa T., and Kunitake T. **1999**. Practical preparation of anionic mercapto ligand-stabilized gold nanoparticles and their immobilization, *Colloids and Surfaces A -Physicochemical and Engineering Aspects*, 149: 1-3 193-199.
- [Zabetakis, 2012] Zabetakis K., Ghann W., Kumar S., and Daniel M.-C. **2012**. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method, *Gold Bulletin*, 45: 4 203-211.
- [Zeng, 2014] Zeng C., Shi X., Wu B., Zhang D., and Zhang W. **2014**. Colloids containing gadolinium-capped gold nanoparticles as high relaxivity dual-modality contrast agents for CT and MRI, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123: 0 130-135.

- [Zhang, 2009] Zhang G., Yang Z., Lu W., Zhang R., Huang Q., Tian M., Li L., Liang D., and Li C. **2009**. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice, *Biomaterials*, 30: 10 1928-1936.
- [Zhang, 2008] Zhang X., Xing J. Z., Chen J., Ko L., Amanie J., Gulavita S., Pervez N., Yee D., Moore R., and Roa W. **2008**. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold-nanoparticles, *Clinical and Investigative Medicine*, 31: 3 8.
- [Zheng, 2009] Zheng Y., Hunting D. J., Ayotte P., and Sanche L. **2009**. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons, *Radiation research*, 169: 4 481-482.
- [Zhou, 2010] Zhou H., Li X., Lemoff A., Zhang B., and Yan B. **2010**. Structural confirmation and quantification of individual ligands from the surface of multi-functionalized gold nanoparticles, *Analyst*, 135: 6 1210-1213.
- [Zinsli, 1974] Zinsli P. E. **1974**. Investigation of rate parameters in chemical reactions of excited hydroxycoumarins in different solvents, *Journal of Photochemistry*, 355-69.



# Liste des publications issues de ce travail

---

- Gilles M., Brun E., and Sicard-Roselli C. **2015**. Quantification of the radical species in solution when gold nanoparticles are submitted to ionizing radiation, *Submitted to Journal of American Chemical Society*.
- Polin C., Wardlow N., McQuaid H., Orr P. Villagomez-Bernabe B., Figuiera C., Alexander G., Srigengan S., Brun E., Gilles M., Sicard-Roselli C., and Currell F.J. **2015**. A novel experimental approach to investigate radiolysis processes in liquid samples using collimated radiation sources. *Review of Scientific Instruments*, 86 : 035106.
- Gilles M., Brun E., and Sicard-Roselli C. **2014**. Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123770-777.
- Sicard-Roselli C., Brun E., Gilles M., Baldacchino G., Kelsey C., McQuaid H., Polin C., Wardlow N., and Currell F. **2014**. A new mechanism for hydroxyl radical production in irradiated nanoparticle solutions, *Small*, 10: 16 3338-3346.
- Et Taouil A., Brun E., Duchambon P., Blouquit Y., Gilles M., Maisonhaute E., and Sicard-Roselli C. **2014**. How protein structure affects redox reactivity : example of Human centrin 2. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(44) : 24493-8.







## **Quantification des espèces radicalaires produites en présence de nanoparticules d'or soumises à un rayonnement ionisant**

Afin d'améliorer les traitements par radiothérapie, des radiosensibilisateurs tels que les nanoparticules d'or (NPO) sont étudiés. Mais leur translation en clinique nécessite une bonne compréhension des phénomènes en jeu. Si l'effet radiosensibilisateur a bien été confirmé sur des cibles biologiques (ADN, cellules et *in vivo*) et si les radicaux hydroxyle ont souvent été proposés comme intermédiaires, aucune preuve claire n'a encore été apportée. Ce travail avait pour premier objectif d'élaborer un protocole de « référence » afin de quantifier les radicaux hydroxyle et les électrons produits par les NPO en interaction avec un rayonnement ionisant. Cette étude a mis en évidence des productions massives de ces deux espèces pour des NPO non-fonctionnalisées. De plus, l'étude de différents paramètres, tels que la quantité de dioxygène en solution ou le rayonnement incident, nous a conduits à proposer un nouveau mécanisme permettant de rendre compte de nos résultats. Néanmoins, l'application biologique des NPO ne peut être envisagée que si ces nano-objets sont fonctionnalisés afin de les rendre furtifs et de les adresser spécifiquement à la tumeur. Après synthèse et caractérisation poussée de différents types de NPO fonctionnalisées, nous avons comparé la production de radicaux hydroxyle avec la dégradation d'une cible biologique, l'ADN, et mis en évidence l'impact significatif de la fonctionnalisation sur l'effet radiosensibilisateur. Ainsi, cette étude apporte des informations essentielles en vue de l'optimisation de la conception des NPO les plus efficaces pour la radiosensibilisation, une première étape vers leur application radiothérapeutique.

**Mots-clés:** *nanoparticules d'or, rayonnement ionisant, radiosensibilisation, radicaux hydroxyles, électrons, fonctionnalisation.*

## **Quantification of the radicals' species produced in the presence of gold nanoparticles submitted to ionizing radiation**

To improve radiotherapy efficiency, radiosensitizers such as gold nanoparticles (GNP) are developed. But to translate them to clinics, a good knowledge of the processes at stage is needed. GNP radiosensitizing effect was well-confirmed on biological targets (DNA, cells and *in vivo*) and hydroxyl radicals are often proposed to be key intermediates, but no clear evidence has been given yet. In this work, we first developed a 'reference' protocol to quantify hydroxyl radicals and electrons produced by GNP in their interaction with ionizing radiation. These investigations reveal a massive production of both species for non-functionalized GNP. Moreover the study of various parameters such as the concentration of dissolved dioxygen or the energy of the incident radiation leads us to propose a new mechanism on the origin of the radiosensitizing effect. Nevertheless, biological applications of GNP can only be considered if the nano-objects are functionalized to make them furtive, address them or deliver medicines to the tumor. After synthesis and characterization of different functionalized GNP, we compared hydroxyl radicals production with the damages induced on DNA and highlighted a significant impact of functionalization on the radiosensitizing effect. Finally, this work gives valuable information for the design of the most efficient GNP for radiotherapy which is a first step towards their medical application.

**Keywords:** *Gold nanoparticles, Ionizing radiation, radiosensitization, hydroxyl radicals, electrons, functionalization.*