



HAL
open science

Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie.

Gautier Laurent

► **To cite this version:**

Gautier Laurent. Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie.. Chimie organique. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA2025 . tel-01648750

HAL Id: tel-01648750

<https://theses.hal.science/tel-01648750>

Submitted on 27 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Chimie

Laboratoire UTINAM

Ecole doctorale Carnot-Pasteur

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2014

Par Monsieur Gautier LAURENT

**SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR MULTIFONCTIONNELLES POUR LA RADIOTHÉRAPIE
GUIDÉE PAR IMAGERIE**

Directeurs de thèse : Professeur Stéphane ROUX, Université de Franche-Comté
Professeur Franck DENAT, Université de Bourgogne

Après avis de : Professeur Muriel BARBERI-HEYOB Rapporteur
Docteur Jean-Olivier DURAND Rapporteur

Devant la Commission d'Examen formée de :

Professeur Muriel BARBERI-HEYOB	Rapporteur
Docteur Jean-Olivier DURAND	Rapporteur
Docteur Géraldine LE DUC, ESRF	Président
Professeur Stéphane ROUX, Université de Franche-Comté	Membre
Professeur Franck DENAT, Université de Bourgogne	Membre

« Savoir écouter, c'est posséder, outre le sien, le cerveau des autres »

Léonard de Vinci

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse pluridisciplinaire m'a permis de côtoyer et de travailler avec de nombreuses personnes qui m'ont beaucoup apporté tant sur le plan humain que scientifique par leurs conseils et leur soutien pour la réalisation de ce travail.

Je souhaite remercier Sylvain Picaud, Directeur du laboratoire UTINAM, et Patrick Fievet, directeur de l'équipe NCM, pour m'avoir accueilli au laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à Muriel BARBERI-HEYOB et Jean-Olivier DURAND pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit ainsi que Géraldine Le Duc pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier Stéphane Roux pour sa compétence, sa disponibilité que ce soit pour une discussion ou simplement pour répondre à mes interrogations, pour son enthousiasme, ses encouragements, et pour m'avoir fait confiance. Un grand merci pour m'avoir guidé tout au long de ce travail ainsi que pour son engagement lors des manips d'imagerie/thérapie, et pour la rédaction de ce manuscrit. Je remercie également Rana Bazzi pour ses conseils et sa disponibilité au laboratoire.

J'adresse mes remerciements à mon co-encadrant Franck Denat (université de bourgogne) ainsi qu'à Frédéric Boschetti (Chematech) et Claire Bernhard pour la synthèse des ligands.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré durant ces trois années pour leur expérience enrichissante. Je remercie notamment Nadine Millot et Julien Boudon (Université de Dijon) pour les analyses ATG dans leur équipe et pour leurs explications et conseils. Je tiens aussi à remercier Alexandra Oudot, Bertrand Collin et Mathieu Moreau (Université de Dijon et CGFL) pour le radiomarquage et l'imagerie. Merci à Pascal Perriat du laboratoire MATEIS pour les séances de TEM. Un grand merci à Fabien et Charles (laboratoire LPCML) pour leur aide et conseils lors des manips ICP, HPLC et de lyophilisation.

Je remercie Marie Dutreix pour m'avoir accueilli quelques jours dans son équipe à Orsay pour les manips *in vitro* et particulièrement Nim pour son aide et sa formation durant les longues manips sur cellules.

Merci également à Sophie Laurent et Luce Vander Elst (université de Mons) pour leur accueil en Belgique. Merci de m'avoir formé sur les minispecs, pour les manips de profil NMRD et pour votre expertise. Je remercie également Robert Muller pour m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire.

Je me souviendrai très longtemps des expériences à l'ESRF. Malgré des manips le week-end jusqu'à parfois 3h du matin et les contretemps de dernières minutes, il y régnait toujours une bonne ambiance. Les personnes avec qui j'y ai travaillé y sont pour beaucoup. Merci à Géraldine Le Duc pour son expertise, pour l'implantation des tumeurs et pour l'injection des particules. Je tiens aussi à remercier Sandrine Dufort, pour son efficacité lors des anesthésies et pour ces super tableaux récapitulatifs. Un grand merci, Sandrine, pour toutes les manips sur souris (IT, ICP, fluo). Je tiens également à remercier Elke Bräuer-Krisch et Herwig Requardt pour les manips MRT.

Je remercie Akim, Ali et Gloria qui ont partagé mon bureau dans la bonne humeur. Merci Akim pour tes conseils très utiles dès le début de ma thèse, merci Ali pour avoir été mon « binôme » de thèse durant ces trois ans (jusqu'à Poitiers et Porquerolles) et merci Gloria pour ton aide durant les manips d'imagerie et de thérapie.

Je tiens à remercier mes amis de fac avec qui j'ai partagé certaines années de Licence ou de Master pour avoir contribué à rendre agréable cette expérience universitaire.

Merci à vous les NNG pour votre soutien et pour avoir contribué d'une certaine manière à cet aboutissement.

Je remercie chaleureusement mes parents pour m'avoir donné toutes les chances pour en arriver jusqu'ici et pour leur soutien sans faille. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma gratitude.

Merci à ma sœur et à mon frère pour leur soutien et pour la relecture du manuscrit et correction des dernières fautes. Merci Quentin, pour tes éclaircissements sur certaines questions « bio » grâce à tes connaissances.

Enfin, un remerciement très spécial à toi, Justine, qui a fortement contribué dans l'accomplissement de cette thèse par tes encouragements et ton soutien de tous les jours qui m'ont permis de m'épanouir pleinement.

Résumé

Afin d'améliorer la sélectivité de la radiothérapie dans le cadre du traitement de certains cancers, nous proposons l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes fonctionnalisées pour le suivi par imagerie médicale. Ces objets dont la composition permet de combiner imagerie multimodale et activité thérapeutique télécommandée ouvrent la voie vers la thérapie guidée par imagerie. L'effet radiosensibilisant pourra être généré au moment le plus opportun, déterminé à partir des données fournies par l'imagerie. Ce travail de thèse consistait à concevoir, synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques, connus pour leur fort pouvoir complexant d'ions d'intérêt pour l'imagerie (Gd^{3+} pour l'IRM, $^{111}In^{3+}$ pour la TEMP et $^{64}Cu^{2+}$ pour la TEP). Le potentiel des différentes nanoparticules, à jouer le rôle d'agent de contraste multimodal (IRM, imagerie nucléaire) et d'agent radiosensibilisant a été évalué.

L'étude de biodistribution par imagerie TEMP/CT chez des souris a montré une libre circulation des nanoparticules et une élimination rénale avec une présence modérée des nanoparticules dans le foie qui n'est, cependant, pas due à un phénomène d'opsonisation. L'étude par IRM du cerveau de rats portant un gliosarcome a indiqué une accumulation significative des nanoparticules $Au@TADOTAGA-Gd^{3+}$ au sein de la tumeur. Enfin le marquage des nanoparticules d'or par Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$ (complexées par les ligands macrocycliques) a permis de suivre ces objets, chez le même animal, après injection intraveineuse, à la fois par TEP et IRM dont la combinaison bien que très recherchée est rarement mise en œuvre. Cette étude a confirmé la libre circulation, l'élimination rénale, la légère capture hépatique et l'accumulation au sein de la tumeur (carcinome mammaire).

Le caractère radiosensibilisant de la suspension de nanoparticule $Au@TADOTAGA$ a été confirmé par le suivi de croissance tumorale après traitement par irradiation MRT (microfaisceaux) 15 minutes après l'injection des nanoparticules par voie intratumorale. Le gain thérapeutique de la mise en œuvre de ce traitement a ensuite été validé par une irradiation MRT 24 heures après l'injection intraveineuse des nanoparticules à des rats portant un gliosarcome (tumeur radiorésistante dans un organe radiosensible).

Ce travail a montré que les nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques de type DOTA présentent un fort potentiel pour la radiothérapie guidée par imagerie.

Abstract

The original properties of nanoparticles make them extremely attractive in the field of oncology. In fact, nanoparticles can be designed for combining imaging and therapy with only one object. Therefore, multifunctional platforms are very promising for image-guided therapy, which constitutes an important step towards personalization of treatment. This consists of stimulating the therapeutic activity of the nanoparticles when their accumulation is high within the tumor zone and low in healthy tissues. A higher selectivity of the treatment is therefore expected. The aim of this PhD work was to synthesize gold nanoparticles coated by macrocyclic ligands, known for their high complexing aptitude of ions widely used for imaging (Gd^{3+} for MRI, $^{111}\text{In}^{3+}$ for SPECT and $^{64}\text{Cu}^{2+}$ for PET). The potential of those nanoparticles to combining imaging multimodalities and radiosensitization was evaluated.

Biodistribution study by SPECT/CT has shown free circulation, renal elimination and a moderate retention by the liver of the nanoparticles. However, this retention is not due to the opsonisation process. The MRI study of rats' brain carrying a gliosarcoma has shown an accumulation of nanoparticles $\text{Au@TADOTAGA-Gd}^{3+}$ in the tumor. Moreover, the co-labeling of these nanoparticles by Gd^{3+} and $^{64}\text{Cu}^{2+}$ was successfully performed. As a result, PET/MRI images, a much researched combination but rarely achieved, were acquired on the same animal after intravenous injection of the co-labeled nanoparticles. This study has confirmed the free circulation, renal elimination, low hepatic capture and tumor accumulation (carcinoma).

The radiosensitizing character of nanoparticles Au@TADOTAGA was confirmed by the follow up of tumor growth after a treatment by MRT (microbeam irradiation) 15 minutes after intratumoral injection of nanoparticles. The therapeutic gain of this treatment has been validated by MRT 24 hours after intravenous injection of nanoparticles to rats carrying gliosarcoma (radioresistant tumor in radiosensitive organ).

Owing to their composition, these gold nanoparticles coated by macrocyclic ligand (DOTA-like) exhibit therefore a high potential for image-guided radiotherapy.

Table des matières

Glossaire.....	12
Introduction générale.....	16
1. Chapitre 1 : Nanoparticules d'or pour le traitement du cancer.....	22
1.1. Introduction.....	24
1.2. Les nanoparticules.....	25
1.2.1. Généralités sur les nanoparticules.....	25
1.2.2. Synthèse des différents types de nanoparticules.....	27
1.2.2.1. Propriétés inédites des nanoparticules d'or	27
1.2.2.2. Les « nanosphères »	29
1.2.2.3. Les nanoparticules de type cœur-coquille	30
1.2.2.4. Les nanobâtonnets	31
1.2.2.5. Les nanostructures de forme complexe	32
1.3. Oncologie.....	34
1.3.1. Les tumeurs.....	34
1.3.1.1. Généralités.....	34
1.3.1.2. Naissance d'une tumeur.....	35
1.3.1.3. Développement : l'angiogenèse.....	36
1.3.1.4. Physiologie des tumeurs.....	37
1.3.2. Formulation des nanoparticules pour la thérapie	39
1.3.2.1. Voie d'administration	39
1.3.2.2. Toxicité.....	40
1.3.2.3. Biodistribution et élimination.....	41
1.4. Les propriétés intrinsèques de l'or au service de l'imagerie et de la radiothérapie	43

1.4.1.	Les particules d'or : agents de contraste pour l'imagerie X	43
1.4.2.	La radiosensibilisation.....	45
1.5.	Les nanoparticules d'or : agent de contraste radiosensibilisant	47
1.5.1.	Principe et propriétés de l'IRM	48
1.5.2.	Principe de l'imagerie nucléaire	50
1.5.3.	Agent de contraste multimodal	52
1.6.	La thérapie guidée par imagerie	53
1.7.	Présentation du travail de thèse	57
	Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation.....	66
2.1.	Introduction.....	67
2.2.	Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques	69
2.2.1.	Ligands macrocycliques	69
2.2.2.	Préparation des différentes nanoparticules	71
2.2.2.1.	Synthèse des nanoparticules Au@DTDOTA, Au@TADOTA et Au@TADOTAGA 71	
2.2.2.2.	Purification.....	72
2.2.2.3.	Solution injectable	73
2.2.3.	Complexation du gadolinium	73
2.2.4.	Radiomarquage des nanoparticules	74
2.2.4.1.	Complexation de l'indium 111	74
2.2.4.2.	Complexation du cuivre 64.....	75
2.3.	Caractérisation	75
2.3.1.	Spectrophotométrie UV visible.....	76
2.3.2.	Microscope électronique à transmission.....	76
2.3.3.	Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta.....	76

2.3.4.	Etude de la complexation de Gd ³⁺	76
2.3.5.	Lyophilisation	77
2.3.6.	ATG.....	77
2.3.7.	Evaluation de stabilité en milieu biologique simulé	77
2.3.8.	Profils NMRD et relaxivité.....	78
2.4.	Résultats et discussions.....	79
2.5.	Bilan.....	95
Chapitre 3 : Nanoparticules pour l'imagerie médicale.....		100
3.1.	Introduction.....	101
3.2.	Agent de contraste pour l'imagerie nucléaire TEMP	102
3.2.1.	Protocole.....	102
3.2.1.1.	Animaux.....	102
3.2.1.2.	TEMP/CT	102
3.2.1.3.	Biodistribution ex vivo	103
3.2.1.4.	Analyse ICP-EOS.....	103
3.2.2.	Résultats et discussion	104
3.3.	Agent de contraste pour l'IRM	110
3.3.1.	Protocole.....	110
3.3.1.1.	Animaux.....	110
3.3.1.2.	IRM.....	110
3.3.2.	Résultats et discussion	111
3.4.	Agent de contraste bimodal TEP/IRM.....	115
3.4.1.	Protocole.....	115
3.4.1.1.	Animaux.....	115
3.4.1.2.	TEP/IRM.....	116

3.4.1.3.	Analyse ICP	116
3.4.2.	Résultats et discussion	116
3.5.	Bilan	122
Chapitre 4 : Nanoparticules comme agent radiosensibilisant.....		126
4.1.	Introduction.....	127
4.1.1.	Etudes in vitro	130
4.1.2.	Protocole	130
4.1.3.	Résultats et discussion	131
4.2.	Etude in vivo par MRT	133
4.2.1.	Etude de la dégradation des nanoparticules après MRT	134
4.2.2.	Injection intratumorale	135
4.2.2.1.	Protocole	135
4.2.2.2.	Résultats et discussion.....	137
4.2.3.	Injection intraveineuse.....	142
4.2.3.1.	Protocole	142
4.2.3.2.	Résultats et discussion.....	144
4.3.	Bilan	147
Conclusion générale.....		150

Glossaire

Abréviation	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
Au	Or
RGD	Pentapeptide cyclique composé du motif « arginine-glycine-acide aspartique »
d	Densité
Da	Dalton
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMEM	Milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DTDTPA	Dérivé dithiolé du DTPA
DTPA	Acide diéthylènetriamine pentaacétique
DOTA	Acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tetraacétique
EDC	<i>N</i> -[3-(diméthylamino)propyl]- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
Effet EPR	Effet d'augmentation de la rétention par perméabilité (enhanced permeability and retention effect)
ESRF	Installation européenne de rayonnement synchrotron (European Synchrotron Radiation Facility)
Gd	Gadolinium
Gy	Gray
In	Indium
ICP-MS	Spectrométrie de masse par torche à plasma
ICP-OES	Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma

ILS	Augmentation de la durée de vie (Increase of LifeSpan)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
keV	Kilo-électronvolt
kg	Kilogramme
M	Mole par litre
mosmol	Milliosmoles
MRT	Radiothérapie par microfaisceaux (Microbeam Radiation Therapy)
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
PBS	Tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution)
PEG	Polyéthylène glycol
TEP (PET)	Tomographie par émission de positons (Positron Emission Tomography)
pH	Potentiel Hydrogène
TEMP(SPECT)	Tomographie par émission monophotonique (Single-Photon Emission computed tomography)
T	Tesla
UV	Ultraviolet
Z	Numéro atomique

Remarque

Certaines parties du Chapitre 1 et de l'introduction générale sont extraites d'une revue qui sera publiée prochainement par les Techniques de l'Ingénieur et d'une revue déjà publiée dans l'ACS Books.

Introduction générale

Le traitement des tumeurs cancéreuses constitue un réel enjeu de santé publique qui, depuis de nombreuses années, mobilise la communauté scientifique. Différentes voies et stratégies ont été explorées. Si, dans certaines formes de cancer, des avancées significatives ont été observées, d'autres formes résistent à l'arsenal thérapeutique développé jusqu'à présent (chirurgie, chimiothérapies et/ou radiothérapie). Le cas des glioblastomes (tumeur du cerveau la plus fréquente) est emblématique car la survie des patients actuellement soignés n'est pas meilleure que celle observée il y a déjà trente ans. La réussite du traitement nécessite de préférence l'éradication totale et exclusive de la tumeur. Or, l'ablation totale d'une tumeur requiert une localisation très précise difficile à obtenir. La connaissance de sa position exacte s'avère également indispensable dans le cadre de sa destruction par radiothérapie classique afin d'épargner les tissus sains (le rayonnement étant focalisé sur la position supposée de la tumeur). Malgré l'efficacité de la radiothérapie, des effets secondaires importants demeurent en raison de la non-sélectivité du rayonnement. Les tissus sains environnants sont donc détruits au même titre que les tissus cancéreux.

Afin de contourner ces difficultés, des protocoles thérapeutiques basés sur un système binaire ont été proposés. Leur principe réside dans l'accumulation sélective d'agents thérapeutiques inoffensifs dans les zones à traiter et la mise en œuvre d'un stimulus physique. La conjonction spatiale et temporelle de ces deux composantes va induire une cascade de réactions physiques très énergétiques et toxiques conduisant à la destruction des tumeurs. La radiothérapie[1–3] (avec la thérapie photothermique [4–6] et la thérapie photodynamique [7–9]) fait probablement partie de la stratégie la plus étudiée s'inscrivant dans ce cadre. Cependant le développement de cette stratégie bute sur la difficulté à la fois à cibler spécifiquement les zones à traiter et à accumuler une quantité suffisante d'agents thérapeutiques. En raison de leur caractère moléculaire, ces agents ne permettent pas de remplir ces conditions car ils ne sont pas assez sélectifs (du fait de leur diffusion dans l'ensemble de l'organisme facilitée par leur faible taille) et sont trop facilement éliminés de l'organisme. Une solution pourrait venir de l'intense activité de recherche consacrée au domaine des nanoparticules [10] [11].

Le vif engouement au sujet des structures nanométriques, c'est-à-dire d'objets aux formes variables dont une des trois dimensions est comprise entre 1 et 100 nm, provient de leurs propriétés originales qui peuvent être exploitées pour des applications biomédicales. En prenant le matériau massif de même composition comme référence, la réduction de la taille jusque dans le domaine nanométrique s'accompagne de l'apparition de nouvelles propriétés intrinsèques (fluorescence dépendante de la taille, propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or reposant sur la résonance de plasmon). La réduction de la taille se traduit, en raison de la frustration des atomes de surface, par une très forte sensibilité (réactivité chimique) des nanoparticules à leur environnement qui est supposée être à l'origine de la toxicité de certaines nanostructures. D'autre part, le coût énergétique de la création de surface inhérente à l'élaboration de nanoparticules se paye au détriment de la stabilité colloïdale. Cette propension spontanée des nanoparticules à s'oxyder, se dissoudre ou encore s'agglomérer, qui limite leur champ d'application, peut être contrée par une fonctionnalisation appropriée de la surface. Dès lors que la toxicité et l'agglomération associées à la réduction de la taille sont minimisées, la taille des nanoparticules constitue un précieux atout pour les applications *in vivo*. Les nano-objets les plus petits (1-2 nm) sont suffisamment volumineux pour ne pas franchir les barrières biologiques des tissus sains (contrairement à la plupart des molécules) et suffisamment petits pour franchir l'épithélium poreux des vaisseaux sanguins des tumeurs solides. Les nanoparticules semblent donc parfaitement adaptées pour le ciblage des tumeurs solides.

Les objets nanométriques ont également attiré l'attention par leur faculté à rassembler dans un si petit volume plusieurs propriétés complémentaires par un choix approprié des constituants. Cette caractéristique permet l'élaboration de nanoparticules multifonctionnelles dont le comportement peut être finement contrôlé par la taille, la forme et la composition. La variété qui en découle a permis d'envisager un large éventail d'applications dans le domaine de la nanomédecine.

Parmi le grand nombre de nanoparticules développées pour des applications biomédicales, les nanoparticules d'or paraissent extrêmement attrayantes [11]. Tout d'abord, l'élément or est un métal noble par excellence, très peu sensible aux agressions chimiques extérieures. Ensuite, il est connu pour présenter une biocompatibilité adaptée aux applications biomédicales bien que la question de la toxicité liée à la taille nanométrique

peut se poser dans certains cas [12]. Ensuite, les nanoparticules d'or possèdent des propriétés optiques modulables dépendant de la taille, de la forme et de l'environnement diélectrique. Cette propriété est beaucoup utilisée dans le cadre de la thérapie photothermique et de l'imagerie [4]. De plus, l'or, en raison d'un numéro atomique élevé ($Z(\text{Au}) = 79$), est caractérisé par une densité et une section efficace d'absorption des photons X et γ très élevées. Cette propriété, indépendante de la taille, confère aux nanoparticules d'or un comportement d'agent de contraste pour la tomodensitométrie X et un effet radiosensibilisant exploitable pour la radiothérapie [13][14]. Enfin, les deux méthodes de synthèse principales décrites par Brust et Frens, sont relativement simples à mettre en œuvre. La première consiste en une réduction d'un sel d'or par un réducteur fort en présence de ligands thiolés alors que la méthode de Frens mène à la formation de nanoparticules stabilisées par des ions citrates en utilisant le réducteur citrate de sodium sur le sel d'or [15][16]. La fonctionnalisation de ces nanoparticules d'or, qui peut être réalisée relativement aisément pendant ou après la synthèse, permet d'enrichir la palette de propriétés. Par un choix approprié des constituants utilisés pour la synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles, il est alors possible, malgré la taille réduite, d'intégrer au sein d'un même objet une activité thérapeutique et des fonctions d'imagerie. La conception de tels objets ouvre la voie à la thérapie guidée par imagerie qui devrait permettre une médecine personnalisée par une adaptation du traitement à chaque cas particulier [10].

Dans cet objectif de réaliser la radiothérapie guidée par imagerie, les nanoparticules Au@DTDTPA composées d'un cœur d'or et d'une couche organique de DTDTPA permettant la complexation de gadolinium ou de radionucléides pour l'imagerie médicale ont été mises au point au sein de l'équipe. Ces nano-objets innovants, une fois injectés par voie intraveineuse, ont présenté un effet thérapeutique significatif suite à leur activation par un rayonnement X. De plus, le suivi de la biodistribution de ces nanoparticules a pu être réalisé par IRM, SPECT et tomodensitométrie X.

Ce travail de thèse consistait à modifier ces objets très prometteurs pour la radiothérapie guidée par imagerie en remplaçant la couche organique, constitué du ligand linéaire DTDTPA, par un ligand macrocyclique. En effet, depuis peu, l'utilisation du complexe de gadolinium DTPA-Gd (utilisé en tant qu'agent de contraste IRM en clinique) fait l'objet de

restriction. Pour cause, la possibilité d'un relargage du gadolinium a été montrée lors de récentes études, ce qui pose problème en raison de la toxicité de cet élément sous forme libre. L'utilisation de différents macrocycles (dérivé du DOTA) a donc pour objectif d'améliorer la complexation des différents éléments pour l'imagerie et notamment le gadolinium. Les nouvelles nanoparticules ainsi synthétisées ont été caractérisées et leur aptitude à être employée pour la radiothérapie guidée par imagerie a été évaluée.

Ce manuscrit qui rassemble les principaux résultats de mon travail de thèse consacré au développement de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie se présente de la manière suivante :

- Suite à une introduction générale, le chapitre 1 résume les principales données bibliographiques décrivant le contexte de cette étude. Ce chapitre décrit les différents types de nanoparticules d'or existant ainsi que les paramètres des tumeurs nécessaires à connaître pour leur traitement. Enfin, les propriétés propres aux nanoparticules d'or et leur fonctionnalisation pour l'imagerie sont expliquées en détaillant les principales techniques d'imagerie médicale.
- Le chapitre 2 présente la synthèse et la caractérisation des nouvelles nanoparticules obtenues en se basant sur les nanoparticules Au@DTDTPA.
- Le chapitre 3 décrit les différents résultats d'imagerie *in vivo* rendant compte de la biodistribution des nanoparticules et de leur aptitude à être utilisées comme agent de contraste multimodal.
- Le chapitre 4 présente les résultats de radiosensibilisation *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules pour évaluer l'effet thérapeutique (par combinaison avec la radiothérapie par microfaisceaux MRT) chez des rats portant un gliosarcome 9L.
- Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui ouvre sur de nouvelles perspectives à explorer.

Références

- [1] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys. Med. Biol.*, 49 (2004) N309–315.
- [2] P. Wardman, Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy, *Clin. Oncol.*, 19 (2007) 397–417.
- [3] G. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Bräuer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles, *ACS Nano*, 5 (2011) 9566–9574.
- [4] A.M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas, W.D. James, R.A. Drezek, J.L. West, Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1929–1934.
- [5] X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles, *Lasers Med. Sci.*, 23 (2008) 217–228.
- [6] S. Shen, H. Tang, X. Zhang, J. Ren, Z. Pang, D. Wang, H. Gao, Y. Qian, X. Jiang, W. Yang, Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemo-photothermal therapy with near-infrared radiation, *Biomaterials*, 34 (2013) 3150–3158.
- [7] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, Photodynamic Therapy in Oncology, *The Oncologist*, 11 (2006) 1034–1044.
- [8] P. Couleaud, V. Morosini, C. Frochot, S. Richeter, L. Raehm, J.-O. Durand, Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications, *Nanoscale*, 2 (2010) 1083.
- [9] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends Biotechnol.*, 26 (2008) 612–621.
- [10] T. Lammers, S. Aime, W.E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, Theranostic Nanomedicine, *Acc Chem Res*, 44 (2011) 1029–1038.
- [11] A.J. Mieszawska, W.J.M. Mulder, Z.A. Fayad, D.P. Cormode, Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease, *Mol. Pharm.*, 10 (2013) 831–847.
- [12] E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 1 (2005) 325–327.
- [13] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, T.M. Focella, H.M. Smilowitz, Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *Br. J. Radiol.*, 79 (2006) 248–253.
- [14] K.T. Butterworth, S.J. McMahon, F.J. Currell, K.M. Prise, Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization, *Nanoscale*, 4 (2012) 4830–4838.
- [15] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1995) 1655.
- [16] P.C.S. John Turkevich, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss Faraday Soc*, 11 (n.d.) 55–75.

Chapitre 1. Nanoparticules d'or pour le traitement du cancer

1.1.	Introduction.....	24
1.2.	Les nanoparticules.....	25
1.2.1.	Généralités sur les nanoparticules.....	25
1.2.2.	Synthèse des différents types de nanoparticules.....	27
1.2.2.1.	Propriétés inédites des nanoparticules d'or	27
1.2.2.2.	Les « nanosphères »	29
1.2.2.3.	Les nanoparticules de type cœur-coquille	30
1.2.2.4.	Les nanobâtonnets	31
1.2.2.5.	Les nanostructures de forme complexe.....	32
1.3.	Oncologie.....	34
1.3.1.	Les tumeurs.....	34
1.3.1.1.	Généralités.....	34
1.3.1.2.	Naissance d'une tumeur.....	35
1.3.1.3.	Développement : l'angiogenèse.....	36
1.3.1.4.	Physiologie des tumeurs.....	37
1.3.2.	Formulation des nanoparticules pour la thérapie	39
1.3.2.1.	Voie d'administration	39
1.3.2.2.	Toxicité.....	40
1.3.2.3.	Biodistribution et élimination.....	41
1.4.	Les propriétés intrinsèques de l'or au service de l'imagerie et de la radiothérapie	43
1.4.1.	Les particules d'or : agents de contraste pour l'imagerie X	43

1.4.2.	La radiosensibilisation.....	45
1.5.	Les nanoparticules d'or : agent de contraste radiosensibilisant	47
1.5.1.	Principe et propriétés de l'IRM	48
1.5.2.	Principe de l'imagerie nucléaire	50
1.5.3.	Agent de contraste multimodal	52
1.6.	La thérapie guidée par imagerie	53
1.7.	Présentation du travail de thèse	57

1.1. Introduction

Même si elle est restée longtemps inconsciente, l'utilisation des nanoparticules remonte à fort longtemps. En effet, nous pouvons recenser la première application des nanoparticules sur la coupe romaine de Lycurgue au 4^{ème} siècle. Au fil du temps, les nanoparticules ont continué d'être utilisées uniquement à des fins décoratives. Puis, c'est en 1857 que Michael Faraday publie la première synthèse scientifique de colloïdes d'or [1].

Un fort engouement concernant la recherche sur les nanoparticules a lieu depuis ces deux dernières décennies. En effet, en raison de leurs dimensions extrêmement faibles, ces nano-objets possèdent de nouvelles propriétés pouvant être exploitées dans de nombreux domaines tels que la catalyse, l'électronique et surtout le domaine biomédical.

L'utilisation de la nanotechnologie pour des applications médicales, la nanomédecine, est extrêmement prometteuse en raison de la taille réduite des nano-objets qui permet une exploration du vivant jusqu'au niveau cellulaire. Cela rend les nanoparticules particulièrement intéressantes pour une utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie médicale ou bien comme agent thérapeutique. Le deuxième atout majeur des nanoparticules, notamment pour le domaine biomédical, est d'apporter plusieurs fonctionnalités en un seul objet en jouant sur l'assemblage de différents éléments de manière à obtenir un nano-objet multifonctionnel. Le choix de l'or comme constituant du nano-objet est très intéressant en raison de nombreux paramètres comme la biocompatibilité, la propension à absorber un rayonnement X ou encore les nombreuses propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or. Cette étude sera donc limitée aux nanoparticules constituées d'or.

Cependant, la petite taille des nanoparticules constitue aussi un inconvénient. En effet, il existe des problèmes liés à l'inhalation non désirée des nano-objets qui peuvent franchir les barrières biologiques. De plus, lors d'une utilisation biomédicale, la taille réduite et les nouvelles propriétés qui en découlent peuvent induire une toxicité rendant nécessaire un contrôle minutieux de nombreux facteurs comme la taille, la charge, la chimie de surface qui vont exercer un impact sur la stabilité colloïdale et la biodistribution.

Le caractère multifonctionnel concentré dans un objet de taille réduite ouvre de nouvelles voies, notamment dans le domaine de l'oncologie. En effet, une fois les caractéristiques spécifiques de la tumeur bien connues, il est possible de synthétiser des nanoparticules qui vont exploiter les paramètres physiologiques de celle-ci pour s'y accumuler de manière passive. En outre, en adaptant la composition complexe de ce type de nanoparticules, celles-ci peuvent à la fois jouer le rôle d'agent de contraste et permettre d'améliorer l'effet de la radiothérapie afin d'accéder à un guidage de la radiothérapie par l'imagerie. Cela constitue une étape extrêmement importante pour la personnalisation du traitement et s'avère extrêmement prometteur pour la radiothérapie dans des zones radiosensibles tel que le cerveau.

Ce chapitre a pour objectif de décrire le contexte de cette étude en analysant les différentes stratégies explorées pour la conception d'agents d'imagerie et/ou de thérapie à partir de nanoparticules d'or. Pour cela, un état des lieux sur les différents types de nanoparticules d'or ainsi que leur méthode de synthèse est réalisé. Vient ensuite une description des paramètres et contraintes physico-bio-chimiques des tumeurs solides. Puis, les principales propriétés des nanoparticules d'or sont décrites avant et après fonctionnalisation, pour finir sur la thérapie guidée par imagerie afin d'apporter une nouvelle solution pour la thérapie de tumeurs difficiles à traiter.

1.2. Les nanoparticules

1.2.1. Généralités sur les nanoparticules

Le terme « nanoparticule » englobe une multitude d'objets de formes et de tailles extrêmement variées. Il convient donc de définir précisément ce terme. Juridiquement une nanoparticule est un objet, peu importe la forme, dont au moins une de ses dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres [2].

C'est cette taille extrêmement faible, qui fait des nano-objets, des outils très intéressants pour le domaine biomédical. En effet par comparaison, ces objets sont du même ordre de grandeur que les biomolécules et plus petits que les cellules (Figure 1.1).

Cette taille réduite leur permet de circuler librement dans le corps humain sans risque de provoquer une embolie (les capillaires des poumons, les plus fins, présentent un diamètre minimal de 5 μm). De plus, les nanoparticules peuvent s'échapper du système sanguin au niveau de certains épithéliums comportant une perméabilité accrue, comme ceux localisés au niveau des tumeurs. Enfin, certaines nanoparticules peuvent pénétrer dans les cellules.

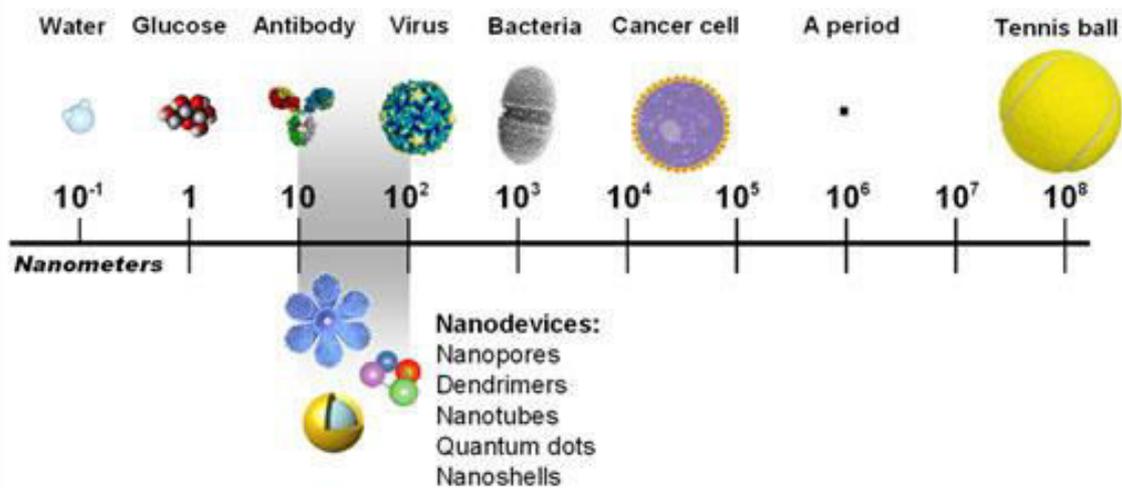


Figure 1.1 Comparaison de l'ordre de grandeur des nanoparticules et des constituants biologiques [3]

Il existe deux approches pour produire ces nouveaux outils : l'approche top-down et l'approche bottom-up. La première consiste à « sculpter » un échantillon macroscopique pour arriver à une dimension nanométrique. C'est le cas par exemple, de la synthèse de nanoparticules métalliques par ablation laser (LASis). La deuxième approche consiste à organiser des structures originales à partir d'éléments nanoscopiques (atomes ou groupements d'atomes) par des procédés physico-chimiques comme la synthèse par réduction. L'approche bottom-up semble donc la plus intéressante d'un point de vue chimique [4].

La recherche active sur les nano-objets a mené à une importante diversité de nanoparticules. Nous pouvons citer les liposomes, les nanoparticules d'oxyde de fer, les quantum dots, les nanoparticules de type cœur coquille, les dendrimères, les nanotubes de

carbone, les nanoparticules métalliques, les nanoparticules polymères et des combinaisons des différentes compositions précitées (figure 1.2).

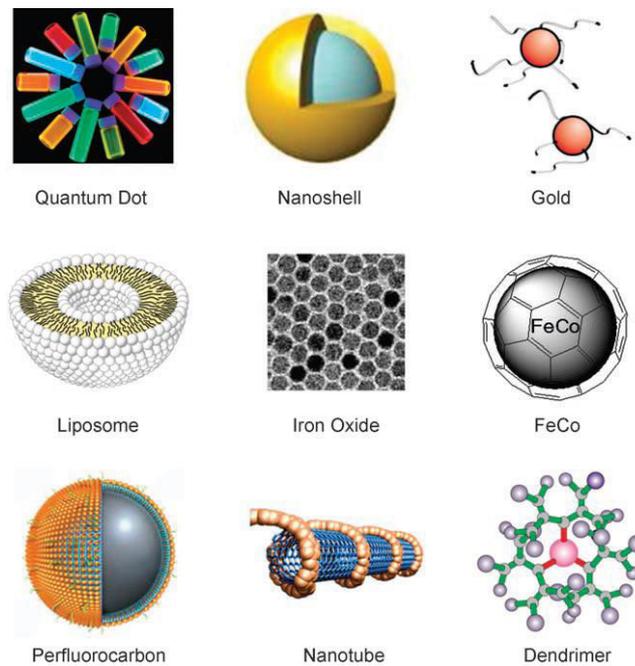


Figure 1.2 Représentation des principaux types de nanoparticules [5]

Cependant, cette étude traitera uniquement des nanoparticules constituées d'or, en raison des caractéristiques intéressantes apportées par cet élément qui seront décrites par la suite.

1.2.2. Synthèse des différents types de nanoparticules

En se limitant à l'élément or, il n'en demeure pas moins une grande diversité de nanoparticules d'or sur le plan de la forme. Nous pouvons citer les sphères, les nanoshells (cœur-coquille), les nanobâtonnets et enfin les nanoparticules de formes complexes.

1.2.2.1. Propriétés inédites des nanoparticules d'or

L'or sous forme de nanoparticules présente des propriétés nouvelles extrêmement intéressantes pour de nombreuses applications. C'est le cas notamment du pouvoir

catalytique qui a été découvert pour les nanoparticules d'or de faible taille [6][7]. En outre, les nanoparticules d'or ont suscité un fort engouement en raison de leurs propriétés optiques modulables inédites.

La modularité des propriétés optiques des nanoparticules d'or est reflétée par la large palette de couleurs offerte par les suspensions de ces objets. En effet, l'or métallique est jaune à l'échelle macroscopique alors qu'une suspension de nanoparticules d'or d'une dizaine de nanomètres de diamètre est rouge et une suspension de nanobâtonnets d'or de 30 nm de longueur et 5 nm de diamètre est bleue. Cette modification de la couleur avec la taille et la forme est attribuée au phénomène de résonance de plasmons de surface localisés qui est observé dans les particules métalliques dont la taille est inférieure à la longueur d'onde du rayonnement incident. L'oscillation collective des électrons libres de la bande de conduction induite par le champ électromagnétique incident est alors fortement confinée dans la particule. La séparation des charges qui en résulte crée un dipôle oscillant. Lorsque la fréquence d'oscillation de ce dipôle est identique à celle du rayonnement incident, il se produit une forte absorption du rayonnement. Il s'agit de la résonance de plasmon de surface localisée dont la fréquence (et donc celle du rayonnement absorbé) dépend de la taille, de la forme et de l'environnement diélectrique des nanoparticules et de la distance interparticulaire. Le contrôle de ces paramètres est à l'origine de l'engouement pour les nanoparticules à base d'or car il permet de moduler la résonance de plasmon et donc d'adapter la longueur d'onde d'absorption (et de diffusion) à l'application visée, par exemple, par un décalage vers le proche infrarouge [8].

Ce décalage spectral est particulièrement intéressant pour les applications *in vivo* car les photons du proche infrarouge pénètrent plus profondément les tissus biologiques (2 cm) que ceux du visible (quelques millimètres). D'autre part, l'autofluorescence des tissus biologiques est nettement moins intense dans le domaine spectral du proche infrarouge. Ces propriétés ont ouvert la voie à de nouvelles techniques de thérapie (thérapie photothermique) ou d'imagerie (imagerie photoacoustique).

Ces deux techniques (figure 1.3) nécessitent l'utilisation d'agents photothermiques qui sont généralement des chromophores, ou des molécules fluorescentes. Après excitation des électrons provoquée par l'absorption d'un faisceau proche infrarouge, le retour à un

état stable passe par une décroissance non radiative qui s'accompagne d'une augmentation de l'énergie cinétique. Il en résulte un échauffement local qui permet, selon les paramètres d'excitation, de réaliser soit de la thérapie soit de l'imagerie (irradiation plus courte induisant un train d'ondes ultrasonores par des phénomènes d'expansion et de compression des tissus tout en évitant un échauffement cytotoxique).

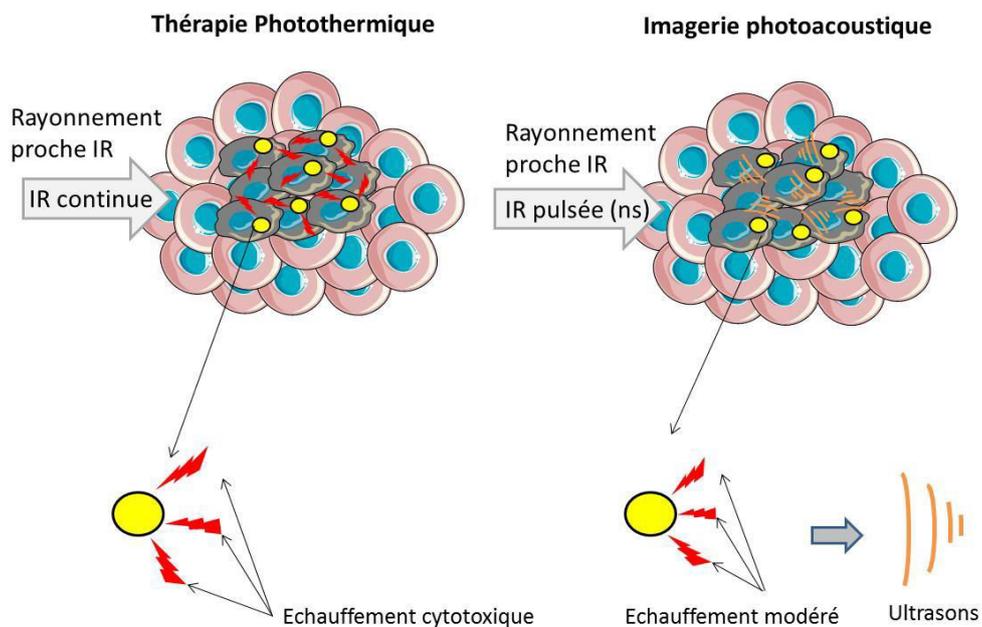


Figure 1.3 Principe de la thérapie photothermique et imagerie photoacoustique

L'efficacité de ces nouvelles techniques d'imagerie et de thérapie a été montrée en utilisant différentes formes de nanoparticules composées d'or comme les nanoparticules cœur-coquille [9][10][11], les nanobâtonnets [12][13][14] ou encore les nanoparticules de formes complexes [15] décrites par la suite.

1.2.2.2. Les « nanosphères »

La forme la plus simple à laquelle nous pensons immédiatement en parlant de nanoparticules est la sphère. Cependant, cette forme sphérique constitue uniquement une approximation. En effet, l'or cristallise dans un réseau cubique à faces centrées et forme ainsi un objet polyédrique pouvant être assimilé à une sphère. La synthèse des « nanosphères » d'or consiste à réduire en milieu mono ou biphasique un sel d'or par des

agents chimiques ou par d'autres techniques (photochimique, électrochimique). Cette réduction a lieu en présence de molécules qui ont pour rôle de contrôler la croissance et assurer la stabilité colloïdale.

Deux méthodes sont principalement utilisées dans la littérature. L'approche décrite par Brust consiste à réduire l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) par un réducteur fort, le tétrahydruoborate de sodium (NaBH_4) en présence de ligands thiolés. Ceux-ci vont jouer le rôle d'agent stabilisant tout en contrôlant la croissance des nanoparticules d'or [16][17]. L'autre méthode, développée par Frens (suite aux travaux de Turkevitch), consiste à réduire HAuCl_4 par un réducteur doux, le citrate de sodium, à chaud. Celui-ci joue également le rôle d'agent stabilisant dont l'efficacité est limitée par la propension des ions citrates à se désorber. En effet, une couche d'ion citrate va assurer la stabilité colloïdale en s'adsorbant à la surface des particules en croissance [18]. Ces deux méthodes mènent à des nanoparticules différentes. La méthode de Frens produit des particules citratées d'un diamètre allant de 10 à 150 nm en modifiant le rapport réducteur/sel d'or, alors que la méthode de Brust aboutit à une suspension de nanoparticules plus stable, plus concentrée et de taille réduite allant de 2 à 10 nm. De plus cette technique permet l'obtention de nanoparticules déjà fonctionnalisées en choisissant le ligand thiolé adapté à l'application souhaitée lors de la synthèse.

Ces deux stratégies sont à la base de la synthèse de la plupart des nanoparticules d'or. En les adaptant, il est possible d'obtenir d'autres types de nano-objets d'or.

1.2.2.3. Les nanoparticules de type cœur-coquille

Nous pouvons mentionner un autre type de nanoparticules d'or de forme sphérique, les nanoparticules de type cœur-coquille. Elles sont composées d'une fine couche d'or entourant un cœur de composition diverse. Le cœur de silice, formant ainsi les particules $\text{SiO}_2@Au$, est le plus répandu [11]. Mais nous pouvons aussi citer des cœurs de cuivre [19] ou d'argent [20]. Cependant, le cœur diélectrique des nanoparticules $\text{SiO}_2@Au$ confère à ces objets des propriétés complètement différentes des objets composés d'un cœur métallique.

L'une des premières équipes à avoir synthétisé les nanoparticules cœur-coquille est celle de Halas. Cette équipe a fonctionnalisé des nanoparticules sphériques de silice avec des organosilanes (3-Aminopropyltriéthoxysilane) créant ainsi une surface aminée permettant le greffage des nanoparticules d'or. La coquille d'or d'épaisseur uniforme a été produite grâce à une réduction de l'acide tétrachloroaurique par NaBH_4 dans une solution aqueuse de carbonate de calcium. Les nanoparticules d'or en surface servent alors de site de nucléation [21]. Certains paramètres peuvent être modifiés comme le type de nanoparticules formant le cœur ainsi que le type de fonctionnalisation pour greffer les nanoparticules d'or, mais le principe de base en quatre étapes reste le même : synthèse du cœur et des nanoparticules d'or, fonctionnalisation, greffage des nanoparticules d'or sur le cœur et enfin réduction pour obtenir une couche uniforme (figure 1.4).

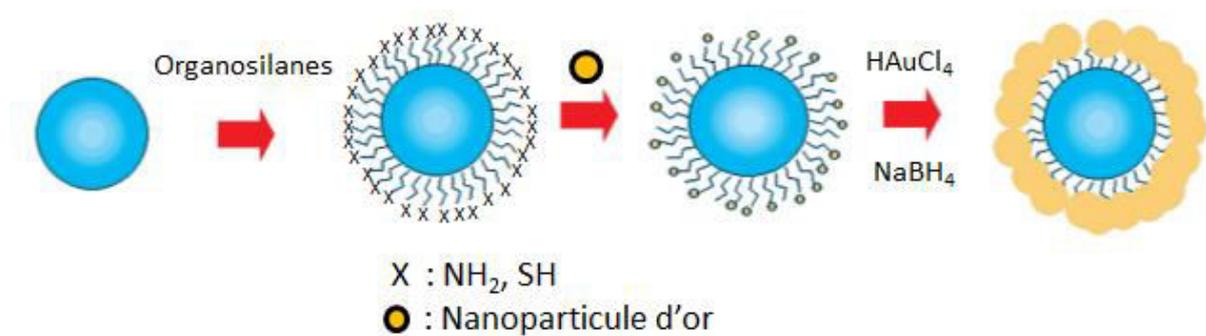


Figure 1.4 Synthèse des nanoparticules d'or de type cœur-coquille [22]

1.2.2.4. Les nanobâtonnets

Il est possible d'obtenir d'autres types de nanoparticules en modifiant la forme. C'est le cas des nanobâtonnets (figure 1.5). Il existe deux approches pour synthétiser ces nano-objets, soit en utilisant un moule rigide soit en présence de surfactants.

Dans le premier cas, les nanoparticules sont synthétisées à l'intérieur des pores de matériaux à base d'oxydes [23] ou de membranes à pores cylindriques (diamètre de pores de quelques nanomètres à 100 nanomètres) [24]. Cette méthode possède l'avantage de réaliser des nanobâtonnets de diamètre très faible (3 nm). De plus, en raison de la monodispersité des pores d'une membrane, les nanoparticules obtenues présentent toutes la même taille. Cependant, cette technique reste complexe. En effet, le contrôle de la

longueur des nanobâtonnets n'est pas aisée. De plus une dissolution du support est nécessaire pour obtenir les nano-objets. Le rendement de ce type de synthèse, est en outre, très faible [25].

La seconde méthode repose sur l'utilisation de surfactants pour contrôler la croissance anisotrope des particules durant la réduction. En milieu aqueux, le tensioactif le plus fréquemment utilisé est le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) [26].

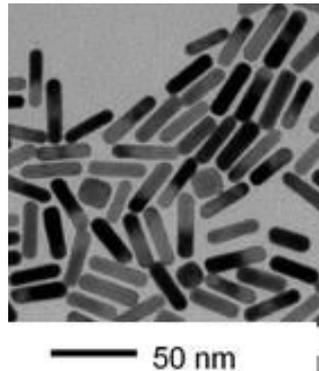


Figure 1.5 Image TEM de nanobâtonnets [15]

1.2.2.5. Les nanostructures de forme complexe

Des formes moins conventionnelles que la sphère et le cylindre ont pu être obtenues en jouant sur les conditions de croissance ou en utilisant un moule préformé (figure 1.6). Parmi ces formes complexes, nous pouvons citer les nanostars qui présentent un cœur possédant des bras à la manière d'une étoile, les nanohexapodes constitués d'un noyau octaédrique dont les sommets sont prolongés par des excroissances allongées et les nanocages d'or.

La synthèse des nanostars et des nanohexapodes repose sur le même principe que les nanobâtonnets : elle requiert l'utilisation de surfactants pour contrôler la croissance anisotrope. Les particules utilisées comme site de nucléation sont sphériques pour les nanostars et octaédriques pour les nanohexapodes. D'autres méthodes permettent de contrôler la cinétique de croissance afin de synthétiser ces nanoparticules de formes complexes telles que l'adsorption de molécules sur des facettes spécifiques (de la même manière que lors de la synthèse des nanobâtonnets) ou la modification de la valeur du pH [27][28].

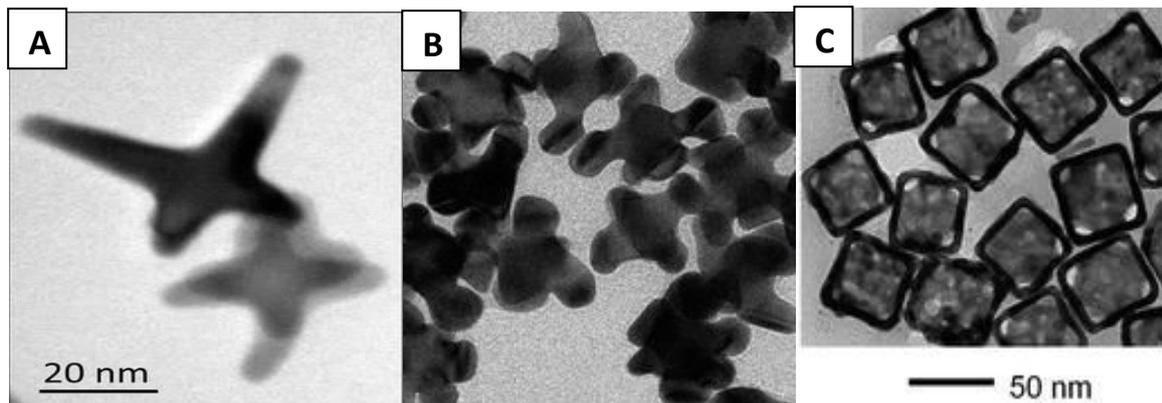


Figure 1.6 Image TEM de nanostars (A), nanohexapodes (B) et nanocages d'or (C) [15] [29]

Les nanocages d'or sont des structures cubiques synthétisées à partir de cubes d'argent. Au contact de Au^{3+} (oxydant puissant), l'argent métallique s'oxyde et passe en solution sous forme d'ions Ag^+ . Dans le même temps, l'or métallique se dépose sur les nanocubes d'argent qui après dissolution totale donneront naissance aux nanocages d'or.

Nous venons de voir qu'il est possible de réaliser une grande diversité de nanoparticules d'or en maîtrisant la synthèse de manière à obtenir des formes différentes. De plus la taille des nano-objets peut être modulée en modifiant la quantité de réducteur et/ou de ligand par rapport à la quantité d'or ou en jouant sur la taille des pores lorsqu'une membrane est utilisée pour la synthèse de nanobâtonnets. Ces objets présentent un fort intérêt pour une utilisation dans le domaine de l'oncologie, en raison de leurs propriétés optiques modulables qui peuvent être exploitées pour l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique.

S'il est possible de modifier les caractéristiques des nanoparticules pour les adapter au traitement d'une tumeur solide, les moyens de contrôler la physiologie de la tumeur pour favoriser sa destruction sont très limités. Elle se présente comme une contrainte imposée et variable pour chaque cas de tumeur. Il s'avère donc indispensable de posséder une connaissance précise de la physiologie des tumeurs afin de rendre leur traitement plus efficace en adaptant le comportement des nanoparticules (biodistribution, mode d'imagerie, efficacité thérapeutique).

1.3. Oncologie

1.3.1. Les tumeurs

1.3.1.1. Généralités

Le terme cancer regroupe plusieurs maladies résultant d'une prolifération cellulaire excessive et anormale qui entraîne, par conséquent, une surpopulation de cellules pouvant se disséminer dans l'organisme.

Le cancer est une des préoccupations de santé publique majeures de ces dernières années. Bien que la mortalité par cancer ait diminué ces vingt dernières années, il demeure en France la première cause de mortalité (plus d'un décès sur 4) chez les hommes et la deuxième chez les femmes après les maladies cardio-vasculaires. La survie relative (survie nette que l'on observerait si le cancer était l'unique cause de décès possible) est de 5 ans avec une variation allant de 6 à 95 % en fonction du type de cancer et le stade au moment du diagnostic [30].

En effet, nous pouvons dénombrer pas moins de 200 types de cancers différents, pouvant être classés différemment, notamment en quatre catégories :

- Les cancers « solides », les plus fréquents (90% des cancers humains), qui se développent dans les tissus autres que le sang.
- Les cancers « liquides » (hémopathies malignes) qui se développent dans le sang (p.e. leucémie) ou dans le système lymphatique (p.e. lymphome)
- Les cancers « métastatiques » qui se développent dans un ou plusieurs autres tissus éloignés de la tumeur primaire d'origine
- Les cancers secondaires consécutifs à un traitement [31]

Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont par ordre croissant ceux du poumon, de la prostate et colorectaux alors que, pour la femme, ce sont les cancers du sein, puis colorectaux et du col de l'utérus (figure 1.7) [32] [33]. En raison d'une prédominance des cancers solides, nous nous limiterons à ceux-ci.

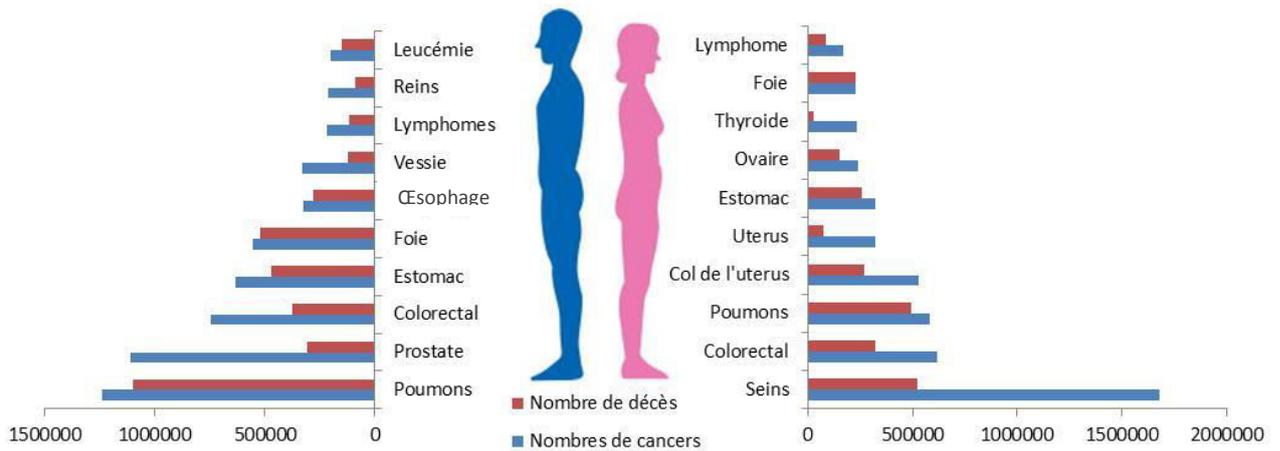


Figure 1.7 Diagramme statistiques des types de cancers et leur mortalité en 2012

Les facteurs favorisant les cancers sont multiples comme l'alimentation et les habitudes. Nous pouvons citer le tabac et l'alcool qui favorisent respectivement les cancers du poumon et du foie. Mais aussi les infections causées par certains virus, bactéries ou parasites comme le papillome à l'origine du cancer des organes sexuels. Ou encore, l'environnement professionnel pouvant exposer les personnes à des solvants ou des rayonnements (UV, X ou gamma) [34].

Au vu du nombre croissant de cancers, de la mortalité élevée et des nombreux facteurs le favorisant, l'amélioration de la thérapie demeure un enjeu capital. Pour cela, une bonne compréhension du processus de développement, de croissance ainsi que la physiologie des tumeurs est nécessaire.

1.3.1.2. Naissance d'une tumeur

Les tumeurs malignes sont décrites comme étant monoclonales, c'est-à-dire que chaque tumeur naît à partir d'une seule cellule exposée à des agents cancérogènes. Suite à cette étape d'initiation la cellule, va se diviser et va entraîner la création d'une tumeur.

Cela est possible du fait qu'il existe trois différences majeures entre les cellules cancéreuses et les cellules saines :

- Les cellules saines ont pour caractéristique de se diviser mais pas indéfiniment, c'est la mort programmée. L'une des premières étapes de la création d'un cancer, que l'on appelle l'immortalisation, est la levée de ce phénomène. La cellule acquiert une capacité de prolifération infinie.
- La deuxième différence est l'autonomisation. Une cellule saine ne peut se multiplier seulement si elle en reçoit l'ordre par le biais de substance inhibitrice ou stimulante. La cellule cancéreuse, quant à elle, est autonome.
- Et enfin, le développement de cellules saines est influencé par les cellules voisines. En effet, les cellules saines cessent de se développer lorsqu'elles entrent en contact avec leurs voisines contrairement aux cellules cancéreuses qui possèdent une capacité d'infiltration.

Les cellules cancéreuses se multiplient donc, sans prendre en considération les « instructions » de l'organisme et des cellules voisines, alors que le nombre de cellules saines restent constant (homéostasie). Il en résulte la formation d'une tumeur primitive représentant environ 1 milligramme de tissu qui va, par la suite, se développer [34] [35].

1.3.1.3. Développement : l'angiogenèse

De la même manière que l'organisme, la tumeur a besoin d'apports spécifiques pour se développer. Pour croître jusqu'à 1 à 2 mm³, les cellules tumorales reçoivent l'oxygène par diffusion passive. Au-delà de cette taille, cet apport devient insuffisant, provoquant alors un manque d'oxygénation. Cette hypoxie demeure un puissant activateur du phénomène d'angiogenèse qui consiste à la mise en place, par le biais de nombreux facteurs de croissance (notamment le facteur de croissance vasculaire endothéliale, VEGF), d'un réseau vasculaire. Ces nouveaux vaisseaux (néovaisseaux) permettent un apport en oxygène et nutriment, entretenant ainsi la croissance tumorale [34]. Ce réseau vasculaire étant chaotique, les tumeurs ne sont pas correctement perfusées. En effet il subsiste des zones insuffisamment vascularisées qui présentent une hypoxie. Cette hétérogénéité entretient alors en permanence la formation de nouveaux vaisseaux (figure 1.8).

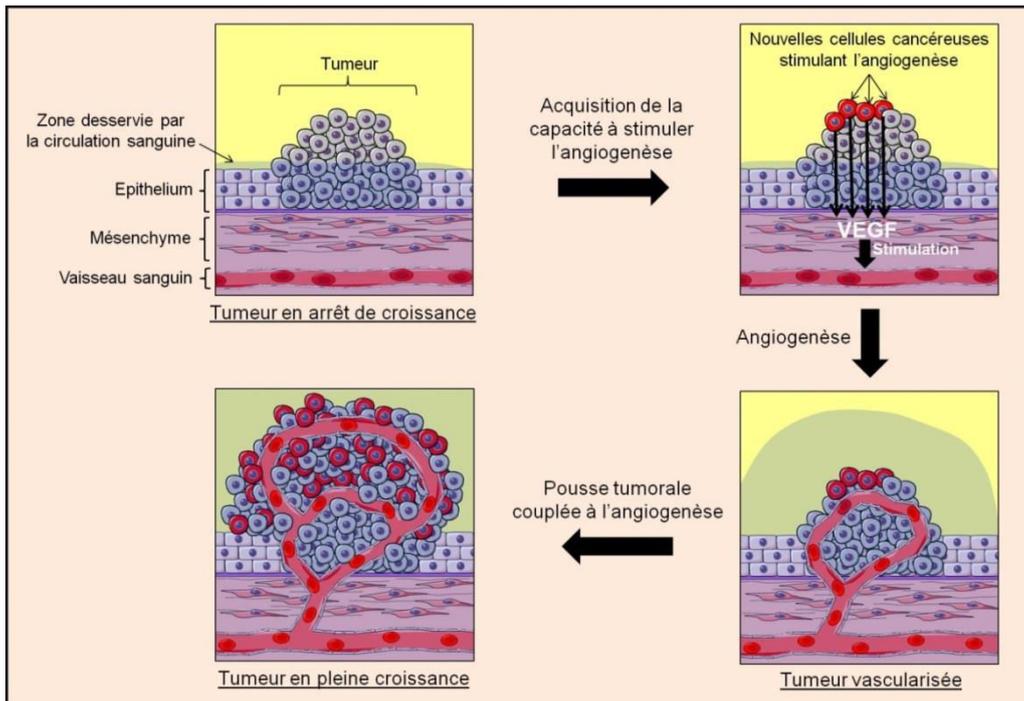


Figure 1.8 Mécanisme de l'angiogénèse tumorale [36]

Ce phénomène est primordial pour la croissance et la survie de la tumeur. De ce fait, les médiateurs de l'angiogénèse constituent une cible importante dans le cas de certaines stratégies de thérapie anticancéreuse [37–39].

1.3.1.4. Physiologie des tumeurs

La physiologie des zones tumorales est différente de celle des tissus sains. Comme nous venons de le voir, le phénomène d'angiogénèse permet la création de néovaisseaux. Par comparaison aux vaisseaux irriguant les tissus sains, la structure de ces néovaisseaux comporte des différences notables qui peuvent être exploitées pour la thérapie. En effet, la vascularisation est désorganisée, les vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs se caractérisent par une distribution en diamètre et une répartition spatiale hétérogènes. De plus, ils sont poreux et perméables. En effet, une fenestration différente (atteignant plusieurs centaines de nanomètres) par rapport aux tissus sains les caractérise.

Le flux sanguin est aussi différent de celui des vaisseaux sains. Ces propriétés structurales ajoutées au faible drainage lymphatique, caractéristique de nombreuses tumeurs, peuvent favoriser une accumulation préférentielle des nanoparticules dans la zone tumorale. Contrairement aux molécules, les nanoparticules sont en effet suffisamment grosses pour éviter leur extravasation des vaisseaux sains caractérisés par un espace entre les cellules épithéliales très réduit et suffisamment petites pour s'échapper des néovaisseaux qui irriguent les tumeurs. Ce phénomène, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect), rend les nanoparticules très intéressantes par rapport aux molécules dans le traitement des cancers car il permet un ciblage passif des tumeurs solides alors que les molécules ont tendance à diffuser dans l'ensemble de l'organisme.

En outre, les tumeurs ont pour particularité d'être constituées de cellules caractérisées par une surexpression anormale de certains récepteurs en raison d'un métabolisme accru. Cette surexpression engendre la possibilité de cibler de manière active ces cellules à l'aide de molécules spécifiques (protéines, anticorps, peptides, aptamères...) qui ont une affinité particulière pour ces récepteurs. Il est important de souligner que ce ciblage, dit actif, ne peut jouer que sur les mécanismes de rétention des nanoparticules au sein de la tumeur et se trouve être efficace uniquement si les nanoparticules possèdent les paramètres adaptés permettant une accumulation significative par effet EPR dans un premier temps.

La physiologie des tumeurs solides peut donc être exploitée pour accumuler préférentiellement des nanoparticules par ciblage passif (effet EPR) et ciblage actif (figure 1.9). La formulation des nanoparticules nécessite en plus de cette considération, la prise en compte d'autres paramètres telles que la voie d'administration, la toxicité ou encore l'élimination.

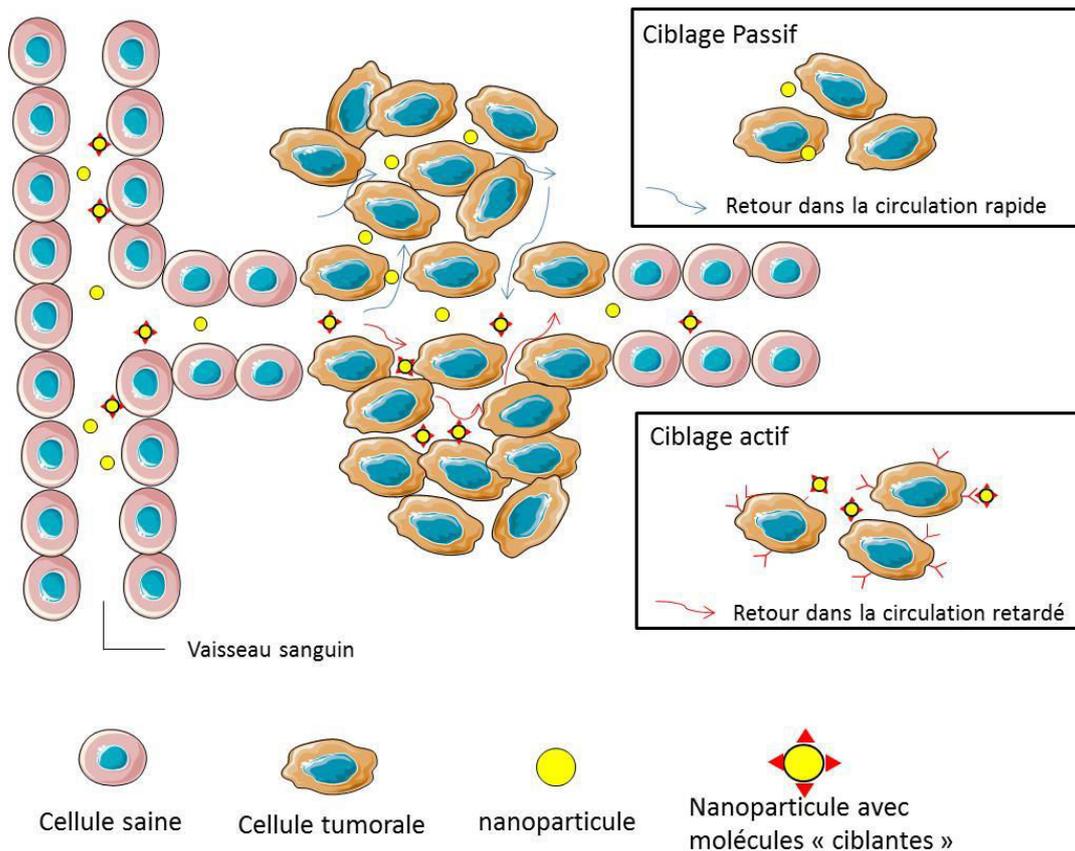


Figure 1.9 Principe du ciblage actif et passif d'une tumeur par des nanoparticules

1.3.2. Formulation des nanoparticules pour la thérapie

1.3.2.1. Voie d'administration

L'administration d'agents thérapeutiques, dans notre cas les nanoparticules, peut être réalisée par voie orale, transmuqueuse, percutanée, pulmonaire ainsi que par voie parentérale. Chacune de ces voies d'administration présente des atouts et des inconvénients et doit être adaptée au composé ainsi qu'au type et à la localisation de la tumeur.

La voie intraveineuse semble la mieux adaptée car elle garantit une biodisponibilité totale en permettant l'accès des agents d'imagerie et de thérapie à l'ensemble de l'organisme. Le risque de modification des agents est limité contrairement à la voie orale, ce qui rend la posologie plus précise. Dans le cas d'injection de nanoparticules d'or recouvertes de citrate, il a été démontré que la voie intraveineuse est la voie qui présente le moins de toxicité par rapport à la voie orale et intrapéritonéale [40].

Cependant cette conclusion n'est pas généralisable et doit être nuancée car les résultats observés dépendent non seulement du cœur de la nanoparticule (or, argent, semi-conducteurs, oxydes métalliques...) mais également de la forme (sphères, bâtonnets, cubes, prismes de formes diverses) et de la nature des ligands (organique, inorganique, polymère, anionique, cationique, neutre...) présents à la surface pour assurer la stabilité colloïdale et l'apport de propriétés complémentaires.

La voie parentérale intratumorale semble la plus pratique pour acheminer les agents au sein d'une tumeur solide. En effet, la question de la biodistribution des nanoparticules ne se pose plus. Cela limite cependant le type de tumeurs accessibles car seules les tumeurs cutanées ou peu profondes peuvent être traitées par ce moyen d'injection à moins d'avoir recours à des procédés encore plus invasifs. D'autre part, ce mode d'administration peut conduire à la dissémination préjudiciable de cellules cancéreuses.

La connaissance de la structure des tumeurs solides et le choix de la voie d'administration sont donc indispensables pour la conception de nano-objets. Cependant, il reste un point capital à prendre en compte qui est la toxicité des nanoparticules.

1.3.2.2. Toxicité

Plusieurs facteurs sont à considérer en ce qui concerne la toxicité des nanoparticules. L'aspect le plus évident est la toxicité intrinsèque de l'objet qui est liée aux constituants de la particule. Même si la protection par une couche de polymère stable et résistante d'un cœur renfermant des éléments toxiques (cas des quantum dots) a été proposée afin d'exploiter les propriétés de ces objets dans le cadre d'applications biomédicales [41], il semble plus prudent de proscrire les éléments identifiés comme toxiques et de préférer les éléments connus pour être biocompatibles. La biocompatibilité et la formidable stabilité chimique de l'or métallique en font un excellent candidat. La chimie de surface (c'est-à-dire le comportement chimique de la surface, « nue » ou fonctionnalisée) doit également être prise en compte. En effet, la charge de surface joue un rôle très important sur la toxicité de l'objet. Les particules chargées positivement sont en général toxiques [42]. Dans le cas de nanoparticules de charge apparente nulle, le fort risque d'agrégation résultant de cette absence de charge constitue un réel danger d'embolie.

Le second aspect à prendre en compte est l'influence de la réduction de la taille sur l'effet de la toxicité. Si la taille des nanoparticules constitue un atout pour les applications biomédicales, elle peut également représenter un obstacle car elle est le principal facteur susceptible de rendre ces objets toxiques. Les nanoparticules sont en effet caractérisées par une réactivité et une interactivité avec l'environnement accrues par rapport à une particule macroscopique qui peuvent être à l'origine de modifications délétères [43].

Enfin, le troisième aspect qu'il ne faut pas négliger est la forme. Une étude a par exemple montré que la morphologie des nanoparticules d'oxyde de cuivre (sphérique, bâtonnet, fuseau) induit des effets significatifs sur la toxicité *in vitro*. Il en ressort que la forme sphérique est, dans le cas de ce type de nanoparticules, celle qui semble montrer le moins de cytotoxicité [44].

La toxicité dépend donc certainement de la nature, de la taille, de la fonctionnalisation et de la forme des nanoparticules. Les connaissances en matière de nanotoxicologie restant actuellement limitées et au vu de la très grande diversité des nanoparticules existantes, nous ne pouvons pas généraliser les conclusions. L'étude de la toxicité au cas par cas, et avec des outils appropriés aux spécificités de la chimie colloïdale, semble alors plus appropriée.

1.3.2.3. Biodistribution et élimination

L'élimination des nano-objets constitue également un point essentiel à prendre en compte. Celle-ci nécessite d'être complète et rapide. Dans le cas d'objets dont la dégradation libérerait des sous-produits toxiques, le processus d'élimination devra préserver l'intégrité des nanoparticules. Comme elle repose sur un passage passif des nanoparticules à travers les tissus poreux spécialisés des reins (filtration sans dégradation), l'élimination rénale s'impose donc comme la seule voie d'élimination à exploiter pour les nanoparticules non-biodégradables (cas de l'or) ou libérant des sous-produits toxiques (cas des QD). En revanche, la voie d'élimination hépatobiliaire peut conduire à une libération de produits secondaires toxiques dans le foie [45] [46] [47]. En effet, elle implique la capture des nanoparticules par les hépatocytes dont le métabolisme peut engendrer la dégradation des nanoparticules.

La conception des nanoparticules doit donc prendre en compte les paramètres favorisant un ciblage passif via l'effet EPR, tout en assurant une élimination rénale. Ces différents paramètres sont la taille, la chimie et la charge de surface. De manière générale, nous pouvons noter qu'une charge positive est souvent suivie d'une capture hépatique causée par le phénomène d'opsonisation alors qu'une charge neutre ou négative assure une élimination rénale si la taille est adaptée [48]. Ce sont les protéines plasmatiques ou opsonines (chargées négativement) qui sont responsables du processus d'opsonisation. En adhérant à la surface des nanoparticules, elles favorisent la capture et la phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) qu'on trouve en très grand nombre dans le foie et la rate. Le diamètre hydrodynamique joue un rôle important en même temps pour la voie d'élimination et pour la biodistribution. Un diamètre supérieur à 10 nm conduit à une capture hépatique par les cellules de Küpffer [46] alors qu'un diamètre hydrodynamique inférieur à environ 6 nm conduit en général à une élimination rénale qui diminue obligatoirement le temps de demi-vie plasmatique quelle que soit la charge [49]. La charge joue en revanche un rôle sur la voie d'élimination lorsque la taille des nanoparticules est comprise entre 6 et 10 nm. L'élimination de ces nanoparticules par voie rénale semble être favorisée si elles sont chargées négativement.

L'élimination rénale impose une taille limite pour les nanoparticules qui ne peut pas excéder 10 nm. Cette contrainte de taille compromet donc l'utilisation des nanoparticules de type cœur-coquilles, nanobâtonnets ou de formes complexes. Bien que ces nanostructures possèdent toutes un réel potentiel pour la thérapie guidée par imagerie, une telle application risque d'être entravée en raison de leurs dimensions excessives favorisant l'opsonisation qui conduit à la capture de ces particules par les tissus riches en cellules phagocytiques (foie, rate). Afin de privilégier l'élimination par voie rénale et d'éviter la capture par les tissus sains du système réticulo-endothélial, la réduction de la taille semble inévitable. Cependant, elle se fera au détriment des propriétés optiques car le phénomène de résonance de plasmon sur lequel reposent l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique sera alors observé à des longueurs d'onde plus faibles qui ne traversent pas les tissus biologiques contrairement au rayonnement proche infrarouge. L'utilisation de nanoparticules plus petites nécessitera donc de mettre en œuvre d'autres modes d'imagerie et de thérapie.

1.4. Les propriétés intrinsèques de l'or au service de l'imagerie et de la radiothérapie

L'or métallique, en plus de montrer une stabilité chimique importante et une biocompatibilité même à l'échelle nanométrique, possède des propriétés très intéressantes [50][51]. En effet, en raison d'une densité importante ($d = 19,3$) et du numéro atomique élevé de l'élément Au ($Z = 79$), il possède une section efficace d'absorption du rayonnement X très importante. Cela fait de l'or un matériau très prometteur pour des applications impliquant l'imagerie X et la radiothérapie. C'est ce qu'a montré Hainfeld et son équipe, pionniers dans l'utilisation des nanoparticules d'or pour l'imagerie X et/ou la radiothérapie [50,52].

1.4.1. Les particules d'or : agents de contraste pour l'imagerie X

L'imagerie X est une technique incontournable de l'imagerie médicale. Elle fut découverte en 1895 et jusqu'au milieu du XXème siècle, elle est restée la seule technique d'imagerie médicale disponible. Le principe se fonde sur l'atténuation différentielle d'un faisceau de rayon X (25-150keV) par les tissus de l'organisme. Le faisceau, après avoir traversé le patient, est recueilli sur une plaque photographique ou un détecteur de photons avant d'être révélé ou converti en signaux numériques. La tomodensitométrie X (scanner ou CT) a révolutionné l'imagerie X car, par reconstruction d'une série d'images 2D obtenues à partir de la rotation du tube à rayons X, cette technique fournit des images tridimensionnelles (figure 1.10). Le principal avantage du scanner repose sur sa résolution spatiale extrêmement précise de l'ordre de 50 micromètres. De plus, cette technique permet de visualiser le squelette et d'imager rapidement l'organisme entier. Par contre, cette méthode d'imagerie est pénalisée par un faible contraste et présente le défaut d'être ionisante.



Figure 1.10 Appareil de tomographie assistée par ordinateur X [53]

Pour réaliser ce type d'imagerie, l'utilisation d'un agent de contraste est parfois nécessaire. Les agents de contraste utilisés lors des examens cliniques renferment un ou plusieurs motifs tri-iodobenzène. Comme l'élément iode possède un numéro atomique élevé ($Z = 53$), qui lui confère une propension à absorber les rayons X, les molécules iodées se comportent comme des agents de contraste pour l'imagerie X. Il est intéressant de noter que l'élément or possède un numéro atomique plus élevé que celui de l'iode (79 versus 53), et donc un pouvoir absorbant supérieur à celui de l'iode ($5,16 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ contre $1,94 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ à 100 KeV). En outre, les nanoparticules d'or contiennent un nombre d'éléments lourds plus élevé que dans le cas des agents de contraste moléculaires (supérieur à quelques centaines (environ 410 atomes d'or pour des particules de 2,4 nm) contre moins de dix atomes d'iode dans un agent de contraste moléculaire iodé). Enfin, contrairement aux agents de contraste moléculaires, les nanoparticules permettent un contrôle de la biodistribution, un temps d'imagerie prolongé et un ciblage passif des tumeurs [50]. Les nanoparticules d'or possèdent donc un potentiel supérieur à celui des agents de contraste iodés pour rehausser le contraste en imagerie comme l'ont montré de nombreuses études *in vivo* réalisées à partir de nanoparticules d'or de tailles différentes (1,9 nm, 2 nm, 5 nm, 10 nm...), PEGylées ou non, avec une chimie de surface différente. Elles se présentent donc comme une alternative aux composés à base d'iode utilisés en clinique [50] [54–57]. Comme cette technique d'imagerie permet de visualiser le squelette, elle facilite la localisation des tumeurs [58]. Cependant, l'imagerie X n'est pas forcément la technique la plus adaptée dans le domaine de l'oncologie, et notamment de la radiothérapie, en raison de son caractère ionisant. Il ne faut donc pas voir dans les nanoparticules d'or un nouvel agent de contraste pour le diagnostic

par l'imagerie X mais plutôt un agent thérapeutique dont l'accumulation dans la tumeur peut être visualisée par imagerie X dans le but d'améliorer la thérapie.

1.4.2. La radiosensibilisation

Le traitement d'une tumeur par radiothérapie consiste à détruire les cellules cancéreuses à l'aide d'un rayonnement ionisant (X, gamma). Malheureusement, le manque de sélectivité de ce rayonnement provoquera également la destruction des tissus sains environnants. Une des réponses à ce problème peut être apportée par la radiosensibilisation dont le principe consiste à utiliser un agent à haut numéro atomique pour absorber le rayonnement X. Cette stratégie revient à focaliser le dépôt de doses dans les tissus tumoraux et à épargner les tissus sains environnants à condition d'accumuler les agents radiosensibilisants dans la tumeur (Figure 1.11). Le principe physique repose sur le fait que l'absorption du rayonnement par les nanoparticules produit une émission en cascade d'électrons secondaires (électrons Auger et photoélectrons) pouvant causer de manière directe ou indirecte des dégâts importants aux cellules cancéreuses.

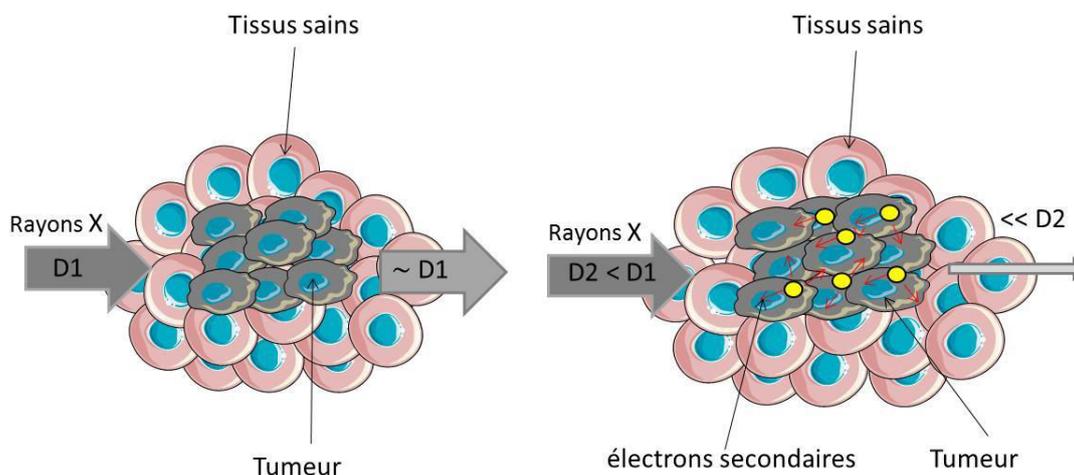


Figure 1.11 Principe de l'utilisation d'agents radiosensibilisants pour la radiothérapie.

Les dégâts directs proviendraient de l'interaction du rayonnement secondaire directement avec les brins d'ADN, provoquant ainsi des cassures. Cependant, l'accès au noyau cellulaire par les nanoparticules est difficile à envisager en raison de la très faible taille

des pores nucléaires. Comme le libre parcours moyen des électrons secondaires est extrêmement faible, ce mode de destruction cellulaire est contestable car il semble plus crédible que ces électrons créent des dégâts en interagissant avec divers constituants cellulaires indispensables à la survie des cellules comme les phospholipides de la membrane plasmique, les protéines...

Les dégâts indirects proviennent d'espèces extrêmement réactives, les radicaux, qui sont créés suite à l'interaction du rayonnement secondaire et des nanoparticules ionisées avec l'eau (qui est le constituant cellulaire principal). Les espèces formées sont principalement le radical hydroxyle HO^\bullet , qui est un oxydant puissant, et le radical hydrogène (H^\bullet) qui est un réducteur puissant. Ces radicaux peuvent réagir entre eux ou avec le dioxygène, donnant ainsi l'ion radicalaire superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, ou encore le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces très agressives interagissent ensuite avec les biomolécules pour causer des dégâts importants, souvent irréversibles [59].

Les nanoparticules d'or sont donc intéressantes en raison de leur propension à interagir avec les rayonnements ionisants (primaires ou secondaires) et des phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui en découlent, de leur biocompatibilité et de leur capacité à s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux. Il a été montré que les nanoparticules d'or (1,9 nm de diamètre) injectées par voie intraveineuse (2,7 g d'or par kg) à des souris portant un carcinome EMT-6 exercent un effet radiosensibilisant sous un rayonnement X (250 kVp). La survie des souris a augmenté de manière significative suite à ce traitement. En effet, après un an, celle-ci est passée de 20% (radiothérapie classique) à 86% dans le cas d'une radiothérapie réalisée après injection des nanoparticules [52]. Ces nouveaux agents radiosensibilisants se sont également montrés efficaces pour traiter des tumeurs radorésistantes et très agressives comme le carcinome squameux de la tête et de la nuque chez des souris [60]. Ces premiers résultats très prometteurs ont suscité un fort engouement pour la conception de nanoparticules d'or en tant qu'agent radiosensibilisant à des fins thérapeutiques. De nombreuses équipes travaillent actuellement sur ce sujet. Et désormais, ce développement peut s'appuyer sur des études de modélisation qui permettent d'expliquer pourquoi l'efficacité expérimentale des nanoparticules d'or pour la radiosensibilisation est bien meilleure que l'efficacité déduite de modèles se basant sur les effets macroscopiques de l'interaction rayonnement-matière [61]. Les nanoparticules d'or

soumises à un rayonnement ionisant génèrent un accroissement de dose très localisé autour des nanoparticules qui est d'autant plus important que le diamètre du cœur d'or est petit. Ces études de modélisation montrent l'intérêt d'utiliser des nanoparticules d'or de taille très réduite pour augmenter l'effet de la radiothérapie.

Les nanoparticules d'or de taille inférieure à 2-3 nm sont donc extrêmement prometteuses pour la radiothérapie et l'imagerie X. En effet, contrairement aux propriétés optiques inédites (des nanobâtonnets, des structures cœur-coquille, nanohexapodes), les propriétés des nanoparticules d'or permettant une utilisation comme agent de contraste pour l'imagerie X et comme agent radiosensibilisant ne nécessitent pas une taille importante ou une forme spécifique. Au contraire, une taille réduite est avantageuse pour la capacité radiosensibilisante. Il est alors possible de concevoir des nanoparticules d'or éliminables par la voie rénale sans impacter l'efficacité pour la radiosensibilisation et l'augmentation du contraste en imagerie X.

1.5. Les nanoparticules d'or : agent de contraste radiosensibilisant

L'efficacité de la thérapie par l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or réside avant tout dans l'accumulation de celles-ci au sein de la tumeur (ratio quantité dans la tumeur/quantité dans les tissus sains très important). Ce point crucial nécessite un suivi de la biodistribution pour déterminer le moment opportun d'activation des nano-objets par le rayonnement X. C'est pourquoi, l'aptitude de ces objets à être visualisée par imagerie est primordiale. Nous avons vu précédemment que les nanoparticules d'or peuvent être suivies par imagerie X grâce aux propriétés intrinsèques de l'or. Mais cette modalité d'imagerie est pénalisée par le caractère ionisant des rayons X et un faible contraste. Le recours à l'imagerie de résonance magnétique (IRM) [57] [62–65] ou aux techniques d'imagerie nucléaire [66][67] paraît très utile pour étudier le comportement des nanoparticules d'or après administration. Cependant le suivi des nanoparticules d'or par ces techniques exigent d'apporter quelques modifications par une fonctionnalisation adaptée.

La fonctionnalisation des nanoparticules d'or peut être réalisée au cours de la synthèse (méthode de Brust) ou après la synthèse (post-fonctionnalisation) par remplacement des ions citrate (nanoparticules d'or obtenues par la méthode de Turkevitch ou Frens) ou d'une partie des ligands apportée lors de la synthèse.

1.5.1. Principe et propriétés de l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie qui permet une visualisation tridimensionnelle des tissus biologiques en se basant sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN). L'IRM exploite les propriétés magnétiques des protons de l'eau (constituant majeur des tissus biologiques, environ 80%) qui dépendent de l'environnement et donc du tissu.

Dans un tissu biologique, les noyaux des atomes d'hydrogène possèdent des moments magnétiques individuels μ orientés de manière aléatoire. Pour éviter d'obtenir une aimantation totale (la somme des moments magnétiques notée M) nulle, le patient est placé dans un champ magnétique intense et uniforme B_0 variant de 0,02 à 7 Tesla. B_0 induit la rotation des moments magnétiques sur deux cônes (cône de précession) autour de l'axe de ce champ. Il se forme alors deux groupes, les moments dont les spins sont parallèles (sens de B_0) et ceux dont les spins sont antiparallèles (sens contraire à B_0). L'aimantation totale M devient non nulle et peut être décrite par deux composantes : l'aimantation longitudinale notée M_L et l'aimantation transversale M_T . La première correspond à la projection de M suivant un axe parallèle à B_0 et la deuxième suivant un axe perpendiculaire à B_0 . Il est nécessaire de placer le système hors de sa position d'équilibre pour détecter M_T et M_L via une bobine de détection. Pour cela, le patient est soumis à un rayonnement électromagnétique, une onde radio à la fréquence de résonance (fréquence de Larmor) des noyaux d'hydrogène. A la fin de cette excitation, M retourne à sa position d'équilibre (parallèle à B_0), c'est la relaxation. L'évolution de la relaxation au cours du temps est caractérisée par deux temps T_1 et T_2 . T_1 correspondant au temps de relaxation longitudinale qui caractérise la repousse de l'aimantation M_L . Et T_2 , le temps de relaxation transversale, correspondant à la décroissance de l'aimantation M_T . Ces temps de relaxation sont propres à chaque type de tissu, ce qui ajouté à la densité des protons, permet d'obtenir des contrastes différents sur une image acquise par IRM.

L'IRM permet donc la différenciation des différents types de tissus et une visualisation tridimensionnelle avec une excellente résolution spatiale. De plus cette technique permet d'imager les tissus mous et présente l'avantage de ne pas être ionisante. Cependant, le temps d'acquisition est long, ce qui empêche d'utiliser cette méthode d'imagerie pour étudier la biodistribution sur un corps entier. D'autre part, cette technique offre un faible contraste qui nécessite l'injection aux patients d'agents de contraste caractérisés par des propriétés magnétiques adaptées [68].

Ces agents de contraste permettent d'augmenter le contraste entre les tissus sains et les tissus tumoraux en diminuant les temps de relaxation T_1 et T_2 (avec une prédominance sur l'un ou l'autre). Le paramètre rendant compte de l'efficacité d'un agent de contraste est représenté par la relaxivité longitudinale et transversale (respectivement r_1 et r_2). Ces paramètres représentent l'évolution du taux de relaxation ($R_1=1/T_1$ et $R_2=1/T_2$) normalisé par rapport à la concentration en agent de contraste. La relaxivité, s'exprimant en $s^{-1}.mM^{-1}$, varie linéairement avec la concentration en agent de contraste.

Il existe deux types d'agents de contraste. Les agents de contraste super paramagnétiques, principalement composés de fer, qui montrent un moment dipolaire très important en présence d'un champ magnétique. Ils agissent essentiellement sur le temps de relaxation transversale T_2 , assombrissant ainsi les tissus qui les contiennent. Le deuxième type, les agents de contraste paramagnétiques, concerne notamment les complexes de gadolinium. Effectivement, l'ion gadolinium Gd^{3+} (terre rare) possède un fort effet paramagnétique en raison du grand nombre d'électrons non appariés (7) sur la dernière couche électronique. Celui-ci étant toxique sous forme libre, les agents de contraste paramagnétiques sont composés de l'ion Gd^{3+} complexé par des ligands tels que le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) pour le Magevist® ou du DOTA (l'acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétra-acétique) pour le Dotarem® (figure 1.12). Ces agents paramagnétiques en agissant principalement sur le temps de relaxation longitudinale T_1 , induisent un éclaircissement de la zone où ils sont accumulés [69].

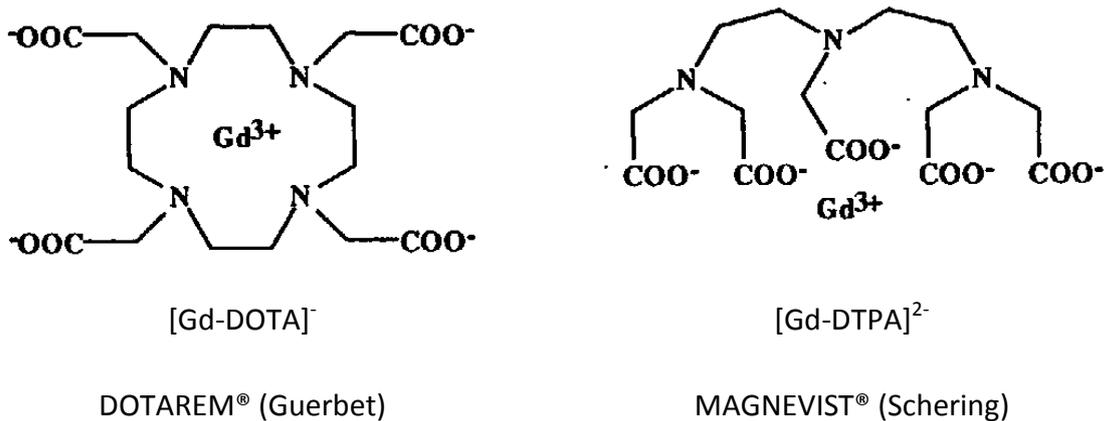


Figure 1.12 Principaux agents de contrastes moléculaires paramagnétiques

Ces agents de contraste rehaussent de manière significative le contraste. Cependant, l'élimination de ces agents est très rapide limitant ainsi leur performance. Le développement de nouveaux agents de contraste en combinant l'élément gadolinium aux nanoparticules est donc prometteur.

1.5.2. Principe de l'imagerie nucléaire

Malgré les contraintes liées à la préparation, à la manipulation, au stockage et aux retraitements des matériaux radioactifs, l'imagerie nucléaire est de plus en plus fréquemment employée pour étudier la biodistribution des nanoparticules en raison de l'exceptionnelle sensibilité de cette technique [66][67][70]. Les techniques d'imagerie nucléaire nécessitent l'injection d'isotopes radioactifs pour réaliser une imagerie fonctionnelle de l'organisme. Nous pouvons distinguer deux techniques : la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) qui utilise des émetteurs de photons γ et la tomographie par émission de positons (TEP) qui repose sur l'usage d'émetteurs de positons (β^+).

- La TEP permet de réaliser une imagerie tridimensionnelle de la biodistribution d'un traceur radioactif (émetteur β^+) après injection. Ces traceurs sont caractérisés par un excès de charges positives au sein du noyau. La désintégration vers un état stable conduit à l'émission d'un positon. Après avoir parcouru quelques millimètres dans les tissus, l'interaction avec un électron du milieu provoque une réaction d'annihilation, engendrant alors deux photons gamma de même énergie (511 KeV), de même direction mais de sens opposés (figure 1.13). Ceux-ci sont alors détectés à l'aide d'une gamma caméra permettant, suite à l'utilisation d'algorithmes, une imagerie fonctionnelle.

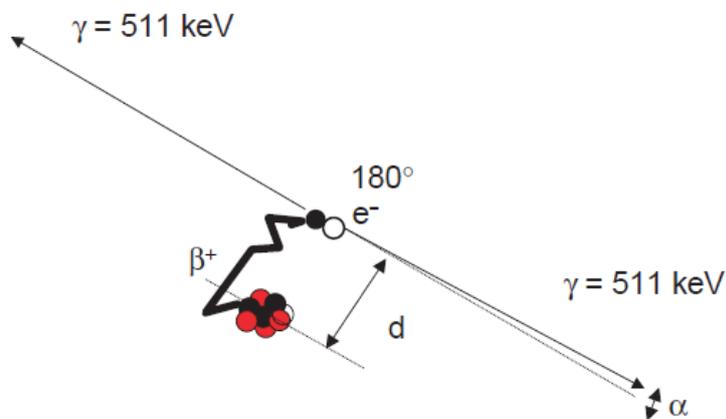


Figure 1.13 Annihilation d'un positon [71]

Les radiotraceurs sont constitués d'un isotope radioactif et d'un vecteur. Le plus utilisé est le ^{18}F FDG qui est composé de glucose (le vecteur) et de fluor 18 (émetteur β^+). Les tumeurs ayant un besoin en glucose important, le ^{18}F FDG va donc être capté par les cellules tumorales. D'autres radioisotopes sont utilisés pour l'imagerie TEP (tableau 1.1). Ceux-ci sont produits à l'aide d'un cyclotron et possèdent une durée de demi-vie extrêmement faible.

Tableau 1.1 Périodes des principaux isotopes utilisés pour la TEP

Isotopes	^{11}C	^{13}N	^{64}Cu	^{18}F	^{76}Br
Période (min)	20,4	10,0	762	109,8	972

- A l’instar de la TEP, la TEMP est une imagerie fonctionnelle. Elle permet, en réalisant une imagerie tridimensionnelle, de visualiser la distribution d’un traceur à l’aide de gamma caméras. Cependant, les radiotraceurs sont différents de ceux utilisés pour la TEP. Ils sont composés d’isotopes émetteurs de photons gamma (tableau 1.2) couplés à des vecteurs. En outre, cette technique est moins précise que la TEP en raison de l’émission d’un seul photon rendant la localisation du traceur plus difficile.

Tableau 1.2 Période des principaux isotopes utilisés pour la TEMP

Isotopes	^{99m}Tc	^{111}In	^{123}I
Période (h)	6,03	67,32	13,22

La TEMP et la TEP présentent l’avantage de posséder une sensibilité très importante (supérieure pour la TEP) et de pouvoir réaliser une imagerie fonctionnelle. Cependant, ces techniques sont ionisantes et la résolution spatiale s’avère très faible.

1.5.3. Agent de contraste multimodal

Il paraît donc tout à fait intéressant d’associer ces techniques (TEP ou TEMP) à l’IRM afin de bénéficier de la sensibilité et des possibilités de quantification de l’imagerie nucléaire et de la résolution de l’IRM. En raison du bénéfice espéré, l’association de l’IRM et des techniques d’imagerie nucléaire (TEMP ou TEP) constitue un thème de recherche très actif, aussi bien au niveau du développement d’agents bimodaux que sur le plan de la conception d’imageurs intégrant l’IRM et la TEMP ou la TEP [72].

Le suivi des nanoparticules d’or par ces techniques d’imagerie complémentaires peut être envisagé en fonctionnalisant la surface par des chélates de gadolinium (IRM), des radioisotopes (^{111}In , $^{99\text{M}}\text{Tc}$ (TEMP) ; ^{64}Cu , ^{89}Zr (TEP)) ou encore par des molécules radioactives marquées par ^{18}F ou ^{125}I (TEP). La combinaison de ces différentes techniques d’imagerie médicale, qui reposent à la fois sur les propriétés du cœur d’or (tomodensitométrie X) et sur la composition de la surface des particules (IRM, TEMP, TEP), est très précieuse pour étudier

la biodistribution des nanoparticules car elle permet de profiter des avantages des différentes techniques tout en s'affranchissant de certaines de leurs contraintes. Cette multimodalité donne la possibilité d'améliorer la fiabilité des interprétations des images en croisant les différentes données. L'espoir repose sur une meilleure connaissance de la localisation des agents thérapeutiques devrait rendre les traitements plus précis et mieux contrôlables, et déboucher enfin sur une efficacité accrue de ces derniers.

Dans l'optique de combiner différentes techniques d'imagerie médicale, des molécules capables de complexer certaines espèces chimiques nécessaires pour l'imagerie ont été conçues (comme le DTPA). Il est possible de synthétiser des nanoparticules d'or avec une couche organique de DTDTPA (DTPA modifié par deux fonctions thiol pour le greffage sur la surface des nanoparticules) permettant la complexation d'ions Gd^{3+} et/ou de radioisotopes d'intérêt pour l'imagerie nucléaire ($^{99m}Tc, ^{111}In$). Ces nanoparticules $Au@DTDTPA-M$ (avec $M = Gd^{3+}, ^{99m}Tc$ (ou ^{111}In)) peuvent donc être suivies par IRM (Gd^{3+}), TEMP (indium ou technétium) et par imagerie X (or). L'imagerie multimodale a permis de confirmer que l'élimination de ces nanoparticules se fait par voie rénale sans que soit empêchée une accumulation des nano-objets dans la tumeur due à l'effet EPR [57][66][73].

Le radiomarquage de nanobâtonnets d'or par l'iode 125 (fixation de ^{125}I sur la tyrosine greffée en surface des nanobâtonnets) a permis de réaliser une imagerie bimodale TEMP/CT grâce aux propriétés de l'or (imagerie X) et du radionucléide (TEMP) [74].

1.6. La thérapie guidée par imagerie

La thérapie guidée par imagerie constitue une étape essentielle vers la thérapie personnalisée, c'est-à-dire vers l'adaptation du traitement à chaque patient. De nombreux exemples décrits dans la littérature montrent que le contrôle de la taille, de la morphologie et de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or permet de concevoir des nanostructures combinant imagerie et thérapie [9][12][75]. De telles nanoparticules sont donc des candidats prometteurs pour la thérapie guidée par imagerie si elles montrent un comportement adapté après injection intraveineuse (accumulation dans la zone à traiter, absence de particules dans les tissus sains environnants, élimination rénale privilégiée (par rapport à la

voie hépatobiliaire)). Dans un certain nombre de cas (et en particulier pour les systèmes de délivrance de principes actifs (DDS, drug delivery systems)), le guidage de la thérapie par l'imagerie se résume à une vérification *a posteriori* de l'effet thérapeutique [76][77][78]. L'imagerie permet en effet de vérifier si le principe actif a été libéré à l'endroit visé. L'imagerie est également utile pour guider la mise en place et vérifier la localisation d'implants. Les nanoparticules d'or Au@DTDTPA-Gd³⁺ ont été utilisées avec succès pour le marquage d'implants conçus pour produire de l'insuline. Ces implants obtenus par encapsulation de cellules β (productrice d'insuline) dans des microbilles d'alginate poreuses (diamètre d'environ 500 μm) étaient difficiles à localiser après mise en place chez des souris diabétiques. La co-encapsulation des cellules β et des nanoparticules Au@DTDTPA-Gd a débouché sur la mise au point d'implants qui, tout en restant efficaces pour diminuer la glycémie des souris diabétiques, peuvent être localisés en combinant l'IRM, le scanner et l'échographie. Cette co-localisation par trois techniques d'imagerie a été rendue possible par la nature des nanoparticules Au@DTDTPA-Gd dont le cœur d'or permet la détection par imagerie X et échographie alors que la couche de chélates de gadolinium (DTDTPA-Gd) exerce un effet important sur le rehaussement du contraste positif des images acquises par IRM. Grâce à ce marquage, le déplacement de ces implants au sein de l'organisme peut être suivi dans le temps [63].

Cette stratégie de marquage est intéressante pour optimiser le dispositif de délivrance par retour d'expérience, mais elle ne permet pas d'activer l'effet thérapeutique au moment le plus opportun défini par l'analyse des images acquises en temps réel. Pour une véritable personnalisation du traitement qui s'adapterait à chaque situation rencontrée, le développement de nanoparticules dont l'activité thérapeutique peut être induite à distance par un stimulus physique semble être une voie prometteuse qui présente l'avantage d'administrer des particules inoffensives en l'absence d'activation extérieure. Dès que les conditions deviennent favorables (accumulation dans la tumeur, absence dans les tissus sains), la cytotoxicité des nanoparticules peut alors être commandée et contrôlée à distance par une interaction avec un stimulus aux caractéristiques physiques connues et maîtrisées (Figure 1.14).

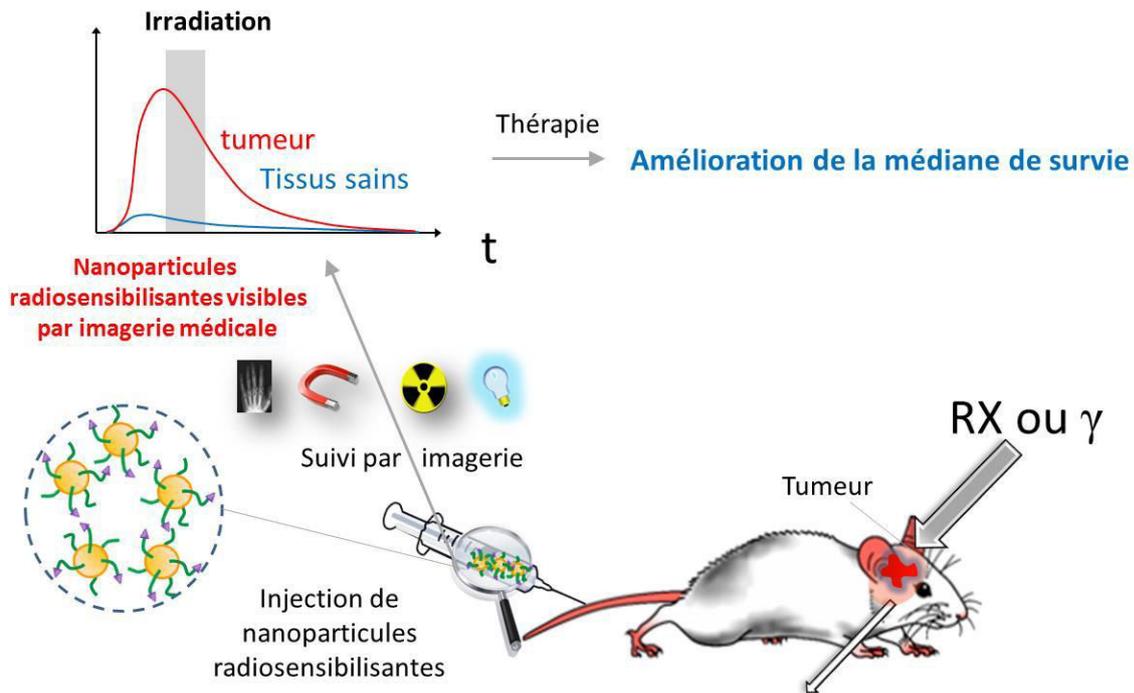


Figure 1.14 Utilisation de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie.

Parmi les différents stimuli possibles, le rayonnement proche infrarouge (imagerie photoacoustique et thérapie photothermique) et le rayonnement X et γ (radiothérapie) sont probablement les mieux adaptés pour activer l'effet thérapeutique des particules d'or. Le rayonnement proche infrarouge présente l'avantage d'être inoffensif pour les tissus sains. Il est cependant handicapé par une faible profondeur de pénétration qui limite son application aux tumeurs superficielles et peu profondes, ou atteignables par une fibre optique. Les dimensions des nanoparticules développées pour la thérapie photothermique constituent une limitation supplémentaire car elles sont incompatibles avec une élimination rénale et favorisent en outre la capture par le système réticuloendothélial [11] [79] [80] [81]. Xia a montré que la PEGylation des nanocages d'or pouvait pour les plus petits d'entre eux favoriser l'élimination rénale et l'accumulation dans la tumeur tout en minimisant l'accumulation dans le foie et la rate (sans toutefois l'empêcher) [70].

En revanche, la taille ne sera pas le facteur limitant de la radiothérapie guidée par imagerie car l'effet radiosensibilisant est très important pour des nanoparticules d'or dont les dimensions sont compatibles avec l'élimination rénale [50] [51]. Comme ces particules peuvent être suivies par imagerie X, l'irradiation peut alors être réalisée au moment le plus opportun pour une efficacité optimale [82]. Des améliorations ont été proposées pour éviter le recours à l'imagerie X. Elles consistent à fonctionnaliser les nanoparticules d'or par des chélates de gadolinium (Au@DTDTPA-Gd^{3+}) pour permettre leur suivi par l'IRM qui est inoffensive [57][63]. Le suivi des nanoparticules radiosensibilisantes par IRM constitue un véritable atout car il permet de déterminer le moment adéquat pour déclencher l'effet radiosensibilisant grâce à l'excellente résolution de cette technique d'imagerie. Les données acquises grâce à l'IRM conduisent à une exploitation optimale de l'effet radiosensibilisant de l'élément or contenu dans les nanoparticules Au@DTDTPA-Gd qui se traduit par une augmentation d'un facteur cinq de la durée de survie d'animaux atteints d'une tumeur au cerveau (gliosarcome 9L murin, tumeur radiorésistante dans un organe radiosensible) [73]. Comme cette capacité à interagir avec les photons X et γ ne dépend que du numéro atomique et de la densité, il est possible d'activer l'effet radiosensibilisant (et donc d'améliorer la sélectivité thérapeutique du rayonnement) avec des nanoparticules d'or Au@DTDTPA . Ces nanoparticules sont prometteuses car, en plus d'être éliminées par voie rénale et d'être retenues dans les tumeurs (conditions nécessaires pour un traitement sélectif à base de nanoparticules), elles possèdent des dimensions (2-3 nm) qui favorisent l'accentuation du dépôt de dose localisée décrite par Curell *et al* [51][61].

1.7. Présentation du travail de thèse

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec de nombreux laboratoires (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Institut Curie, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA MATEIS), Université Claude Bernard – Lyon 1 (LPCML), le Centre Georges-François Leclerc de Dijon (CGFL) et les entreprises nano-H et CheMatech, dans le cadre du projet ANR TheraGulma et le projet Equipex IMAPPI.

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de la thèse de Christophe Alric qui a caractérisé et étudié la capacité de nanoparticules Au@DTDTPA, composées d'un cœur d'or recouvert de ligands linéaires (DTDTPA), à être employée en tant qu'agent de contraste et agent radiosensibilisant pour la radiothérapie guidée par imagerie [83].

L'objectif de ce travail consiste à réaliser le même type d'objet en remplaçant le ligand linéaire par différents ligands macrocycliques et à caractériser ces nouveaux nano-objets pour vérifier si les capacités des nanoparticules Au@DTDTPA (agent de contraste et agent radiosensibilisant) sont conservées voire améliorées. Le remplacement du ligand linéaire s'avère nécessaire en raison de récentes études qui ont montré un relargage possible des ions gadolinium par le DTPA. La dissémination des ions gadolinium dans l'organisme se révèle être problématique en raison de la toxicité du gadolinium libre. D'autre part, bien que les nanoparticules Au@DTDTPA aient montré des résultats très prometteurs, le temps de vie plasmatique demeure très faible freinant alors l'accumulation des nanoparticules dans les zones d'intérêt. L'utilisation de ligands macrocycliques dérivés du DOTA a donc été proposée.

L'objet est censé combiner le rôle d'agent radiosensibilisant et d'agent de contraste pour l'IRM et/ou de radiotraceurs. La couche organique entourant le cœur d'or doit permettre la complexation de différents éléments afin de réaliser une imagerie multimodale (imagerie nucléaire/IRM) tout en assurant la stabilité colloïdale. Pour réaliser la radiothérapie guidée par imagerie, ces nanoparticules doivent comporter une biodistribution adaptée, c'est-à-dire une accumulation dans les tissus cancéreux et une élimination par voie rénale (figure 1.15).

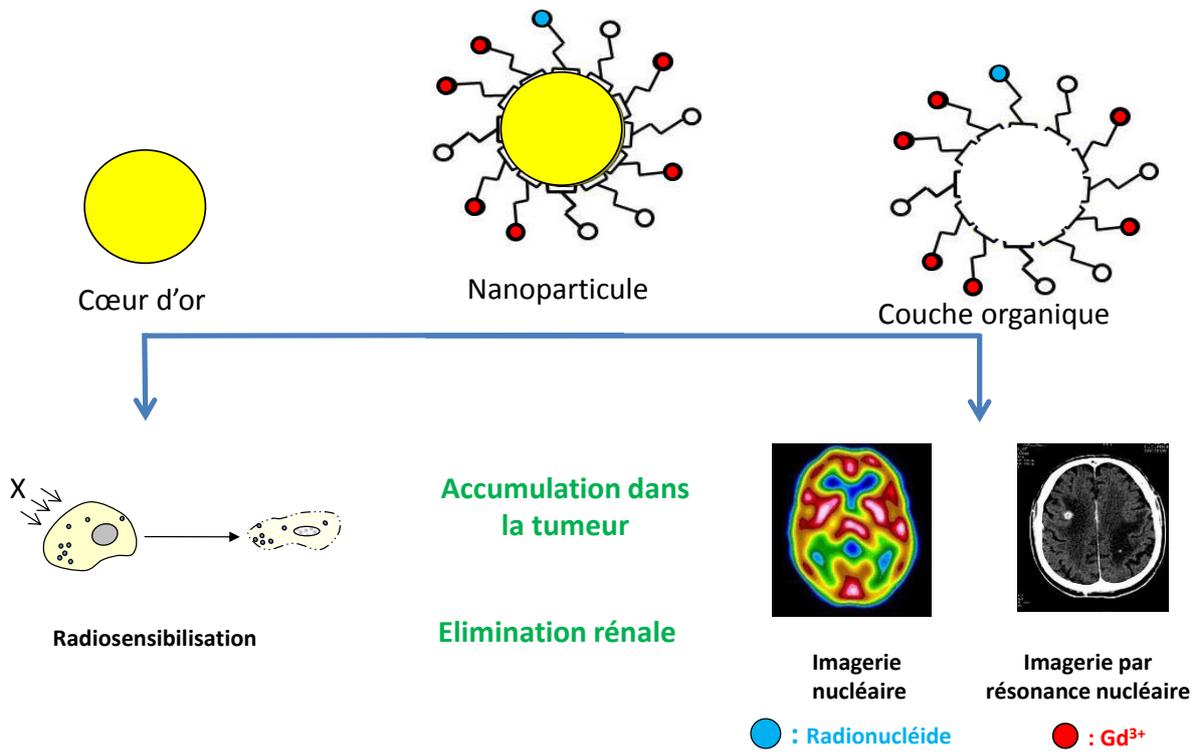


Figure 1.15 Représentation schématique des fonctions de l'objet visé

Références

- [1] Or-nano groupement de recherche Les nanoparticules d'or [en ligne] <http://www.insp.upmc.fr/webornano/index.html> (consulté le 12/05/2014), (n.d.).
- [2] RECOMMANDATION DE LA COMMISSION du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux Journal officiel de l'union européenne L 275/38 2011, (n.d.).
- [3] Nathalie ROSS, Infrastructure, <http://www.infrastructures.com/0510/nano.htm> consulté le 28/07/2014, (n.d.).
- [4] P. Houdy, P. Boisseau, M. Lahmani, Les nanosciences Nanobiotechnologies et nanobiologie, Belin, Paris, 2007.
- [5] W. Cai, X. Chen, Nanoplatfroms for targeted molecular imaging in living subjects, *Small* Weinh. Bergstr. Ger., 3 (2007) 1840–1854.
- [6] M. Haruta, Catalysis: Gold rush, *Nature*, 437 (2005) 1098–1099.
- [7] G.J. Hutchings, M. Haruta, A golden age of catalysis: A perspective, *Appl. Catal. Gen.*, 291 (2005) 2–5.
- [8] O. Pluchery, M. Carriere, Nanoparticules d'or, *Tech. Ing.*, (2011).
- [9] L.R. Hirsch, R.J. Stafford, J.A. Bankson, S.R. Sershen, B. Rivera, R.E. Price, J.D. Hazle, N.J. Halas, J.L. West, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (2003) 13549–13554.
- [10] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy, *Nano Lett.*, 5 (2005) 709–711.
- [11] R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N.J. Halas, Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer, *Acc Chem Res*, 44 (2011) 936–946.
- [12] P. Huang, L. Bao, C. Zhang, J. Lin, T. Luo, D. Yang, M. He, Z. Li, G. Gao, B. Gao, S. Fu, D. Cui, Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy, *Biomaterials*, 32 (2011) 9796–9809.
- [13] S. Shen, H. Tang, X. Zhang, J. Ren, Z. Pang, D. Wang, H. Gao, Y. Qian, X. Jiang, W. Yang, Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemo-photothermal therapy with near-infrared radiation, *Biomaterials*, 34 (2013) 3150–3158.
- [14] M.P. Melancon, W. Lu, M. Zhong, M. Zhou, G. Liang, A.M. Elliott, J.D. Hazle, J.N. Myers, C. Li, R. Jason Stafford, Targeted multifunctional gold-based nanoshells for magnetic resonance-guided laser ablation of head and neck cancer, *Biomaterials*, 32 (2011) 7600–7608.
- [15] Y. Wang, K.C.L. Black, H. Luehmann, W. Li, Y. Zhang, X. Cai, D. Wan, S.-Y. Liu, M. Li, P. Kim, Z.-Y. Li, L.V. Wang, Y. Liu, Y. Xia, Comparison Study of Gold Nanoheptapods, Nanorods, and Nanocages for Photothermal Cancer Treatment, *ACS Nano*, 7 (2013) 2068–2077.
- [16] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1995) 1655.

- [17] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 801–802.
- [18] P.C.S. John Turkevich, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss Faraday Soc*, 11 (n.d.) 55–75.
- [19] C.-H. Su, H.-S. Sheu, C.-Y. Lin, C.-C. Huang, Y.-W. Lo, Y.-C. Pu, J.-C. Weng, D.-B. Shieh, J.-H. Chen, C.-S. Yeh, Nanoshell Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 2139–2146.
- [20] A.M. Goodman, Y. Cao, C. Urban, O. Neumann, C. Ayala-Orozco, M.W. Knight, A. Joshi, P. Nordlander, N.J. Halas, The Surprising in Vivo Instability of Near-IR-Absorbing Hollow Au–Ag Nanoshells, *ACS Nano*, 8 (2014) 3222–3231.
- [21] S.J. Oldenburg, R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, Nanoengineering of optical resonances, *Chem. Phys. Lett.*, 288 (1998) 243–247.
- [22] Naomi J Halas, “The Optical Properties of Nanoshells,” *Optics & Photonics News*, Aug 2002, p 26-30, (n.d.).
- [23] T. Thurn-Albrecht, J. Schotter, G.A. Kästle, N. Emley, T. Shibauchi, L. Krusin-Elbaum, K. Guarini, C.T. Black, M.T. Tuominen, T.P. Russell, Ultrahigh-Density Nanowire Arrays Grown in Self-Assembled Diblock Copolymer Templates, *Science*, 290 (2000) 2126–2129.
- [24] C.R. Martin, Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials, *Chem. Mater.*, 8 (1996) 1739–1746.
- [25] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.*, 249 (2005) 1870–1901.
- [26] B. Nikoobakht, M.A. El-Sayed, Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 1957–1962.
- [27] T.K. Sau, A.L. Rogach, M. Döblinger, J. Feldmann, One-step high-yield aqueous synthesis of size-tunable multispiked gold nanoparticles, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 7 (2011) 2188–2194.
- [28] Controlled reshaping and plasmon tuning mechanism of gold nanostars - *Journal of Materials Chemistry C (RSC Publishing)*, *J. Mater. Chem. C*, (n.d.).
- [29] X.-L. Liu, J.-H. Wang, S. Liang, D.-J. Yang, F. Nan, S.-J. Ding, L. Zhou, Z.-H. Hao, Q.-Q. Wang, Tuning Plasmon Resonance of Gold Nanostars for Enhancements of Nonlinear Optical Response and Raman Scattering, *J. Phys. Chem. C*, (2014).
- [30] ©La situation du cancer en France en 2011 Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l’INCa, Boulogne-Billancourt, octobre 2011, (n.d.).
- [31] Fondation contre le cancer Les types de cancers [en ligne], <http://www.cancer.be> (consulté le 05 mai 2014), (n.d.).
- [32] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA. Cancer J. Clin.*, 61 (2011) 69–90.
- [33] Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, site Internet du Projet GloboCan de l’Agence Internationale de Recherche contre le Cancer (IARC) [http://- globocan.iarc.fr/](http://-globocan.iarc.fr/), consulté le 05 mai 2014, (n.d.).

- [34] M. Delehedde, *Que sait-on du cancer ?*, EDP Sciences, 2006.
- [35] IARC Mécanisme du développement tumoral <http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcrf-3.pdf> Consulté le 28/07/2014, (n.d.).
- [36] Dossier > L'angiogenèse du tissu tumoral, Futura-Sci., (n.d.).
- [37] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science*, 307 (2005) 58–62.
- [38] L. Tirand, N. Thomas, M. Dodeller, D. Dumas, C. Frochot, B. Maunit, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An in Vivo and in Vitro Study, *Drug Metab. Dispos.*, 35 (2007) 806–813.
- [39] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, *J. Controlled Release*, 111 (2006) 153–164.
- [40] X.-D. Zhang, H.-Y. Wu, D. Wu, Y.-Y. Wang, J.-H. Chang, Z.-B. Zhai, A.-M. Meng, P.-X. Liu, L.-A. Zhang, F.-Y. Fan, Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes, *Int. J. Nanomedicine*, 5 (2010) 771–781.
- [41] A. Wolcott, D. Gerion, M. Visconte, J. Sun, A. Schwartzberg, S. Chen, J.Z. Zhang, Silica-coated CdTe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins, *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 5779–5789.
- [42] S.E. McNeil, Nanoparticle therapeutics: a personal perspective, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 1 (2009) 264–271.
- [43] A. El-Ansary, S. Al-Daihan, On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview, *J. Toxicol.*, 2009 (2009) 754810.
- [44] S.K. Misra, S. Nuseibeh, A. Dybowska, D. Berhanu, T.D. Tetley, E. Valsami-Jones, Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials, *Nanotoxicology*, 8 (2014) 422–432.
- [45] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.*, 5 (2008) 505–515.
- [46] M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats, *Nanomed.*, 3 (2008) 703–717.
- [47] H.S. Choi, J.V. Frangioni, Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation, *Mol. Imaging*, 9 (2010) 291–310.
- [48] J. Liu, M. Yu, C. Zhou, J. Zheng, Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology, *Mater. Today*, 16 (2013) 477–486.
- [49] H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B. Itty Ipe, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.*, 25 (2007) 1165–1170.
- [50] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, T.M. Focella, H.M. Smilowitz, Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *Br. J. Radiol.*, 79 (2006) 248–253.

- [51] K.T. Butterworth, S.J. McMahon, F.J. Currell, K.M. Prise, Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization, *Nanoscale*, 4 (2012) 4830–4838.
- [52] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys. Med. Biol.*, 49 (2004) N309–315.
- [53] IMPRESSION CRÂNIENNE (Partie 1), *Crime Expert.*, (n.d.).
- [54] W. Eck, A.I. Nicholson, H. Zentgraf, W. Semmler, S. Bartling, Anti-CD4-targeted Gold Nanoparticles Induce Specific Contrast Enhancement of Peripheral Lymph Nodes in X-ray Computed Tomography of Live Mice, *Nano Lett.*, 10 (2010) 2318–2322.
- [55] B. Aydogan, J. Li, T. Rajh, A. Chaudhary, S.J. Chmura, C. Pelizzari, C. Wietholt, M. Kurtoglu, P. Redmond, AuNP-DG: deoxyglucose-labeled gold nanoparticles as X-ray computed tomography contrast agents for cancer imaging, *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging*, 12 (2010) 463–467.
- [56] V. Kattumuri, K. Katti, S. Bhaskaran, E.J. Boote, S.W. Casteel, G.M. Fent, D.J. Robertson, M. Chandrasekhar, R. Kannan, K.V. Katti, Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 3 (2007) 333–341.
- [57] C. Alric, J. Taleb, G.L. Duc, C. Mandon, C. Billotey, A.L. Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging, *J Am Chem Soc*, 130 (2008) 5908–5915.
- [58] D. Kim, S. Park, J.H. Lee, Y.Y. Jeong, S. Jon, Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 7661–7665.
- [59] M. Tubiana, *Radiobiologie - Radiothérapie et radioprotection Base fondamentales*, Hermann, 2008.
- [60] J.F. Hainfeld, F.A. Dilmanian, Z. Zhong, D.N. Slatkin, J.A. Kalef-Ezra, H.M. Smilowitz, Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma, *Phys. Med. Biol.*, 55 (2010) 3045–3059.
- [61] S.J. McMahon, W.B. Hyland, M.F. Muir, J.A. Coulter, S. Jain, K.T. Butterworth, G. Schettino, G.R. Dickson, A.R. Hounsell, J.M. O’Sullivan, K.M. Prise, D.G. Hirst, F.J. Currell, Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles, *Sci Rep*, 1 (2011).
- [62] P.-J. Debouttière, S. Roux, F. Vocanson, C. Billotey, O. Beuf, A. Favre-Réguillon, Y. Lin, S. Pellet-Rostaing, R. Lamartine, P. Perriat, O. Tillement, Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, 16 (2006) 2330–2339.
- [63] D.R. Arifin, C.M. Long, A.A. Gilad, C. Alric, S. Roux, O. Tillement, T.W. Link, A. Arepally, J.W.M. Bulte, Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging, *Radiology*, 260 (2011) 790–798.
- [64] Y. Song, X. Xu, K.W. MacRenaris, X.-Q. Zhang, C.A. Mirkin, T.J. Meade, Multimodal gadolinium-enriched DNA-gold nanoparticle conjugates for cellular imaging, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 48 (2009) 9143–9147.

- [65] M. Marradi, D. Alcántara, J.M. de la Fuente, M.L. García-Martín, S. Cerdán, S. Penadés, Paramagnetic Gd-based gold glyconanoparticles as probes for MRI: tuning relaxivities with sugars, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, (2009) 3922–3924.
- [66] C. Alric, I. Miladi, D. Kryza, J. Taleb, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance, *Nanoscale*, 5 (2013) 5930–5939.
- [67] S. Guerrero, J.R. Herance, S. Rojas, J.F. Mena, J.D. Gispert, G.A. Acosta, F. Albericio, M.J. Kogan, Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a ¹⁸F-labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application, *Bioconjug. Chem.*, 23 (2012) 399–408.
- [68] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2293–2352.
- [69] D. Doyon, E.A. Cabanis, M.T. Iba-Zizen, B. Roger, J. Frija, D. Pariente, I. Idy-Peretti, *Imagerie par résonance magnétique*, Masson, Paris, 2001.
- [70] Y. Wang, Y. Liu, H. Luehmann, X. Xia, P. Brown, C. Jarreau, M. Welch, Y. Xia, Evaluating the Pharmacokinetics and In Vivo Cancer Targeting Capability of Au Nanocages by Positron Emission Tomography Imaging, *ACS Nano*, 6 (2012) 5880–5888.
- [71] O. de Dreuille, P. Maszelin, H. Foehrenbach, G. Bonardel, J.-F. Gaillard, Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP), *EMC - Radiol.*, 1 (2004) 2–35.
- [72] A. Louie, Multimodality imaging probes: design and challenges, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 3146–3195.
- [73] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 10 (2014) 1116–1124.
- [74] B. Jang, S. Park, S.H. Kang, J.K. Kim, S.-K. Kim, I.-H. Kim, Y. Choi, Gold nanorods for target selective SPECT/CT imaging and photothermal therapy in vivo, *Quant. Imaging Med. Surg.*, 2 (2012) 1–11.
- [75] A.M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas, W.D. James, R.A. Drezek, J.L. West, Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1929–1934.
- [76] E.-K. Lim, Y.-M. Huh, J. Yang, K. Lee, J.-S. Suh, S. Haam, pH-triggered drug-releasing magnetic nanoparticles for cancer therapy guided by molecular imaging by MRI, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, 23 (2011) 2436–2442.
- [77] A. Gianella, P.A. Jarzyna, V. Mani, S. Ramachandran, C. Calcagno, J. Tang, B. Kann, W.J.R. Dijk, V.L. Thijssen, A.W. Griffioen, G. Storm, Z.A. Fayad, W.J.M. Mulder, Multifunctional nanoemulsion platform for imaging guided therapy evaluated in experimental cancer, *ACS Nano*, 5 (2011) 4422–4433.
- [78] S.J. Lee, M. Muthiah, H.J. Lee, H.-J. Lee, M.-J. Moon, H.-L. Che, S.U. Heo, H.-C. Lee, Y.Y. Jeong, I.-K. Park, Synthesis and characterization of magnetic nanoparticle-embedded multi-functional polymeric micelles for MRI-guided gene delivery, *Macromol. Res.*, 20 (2012) 188–196.

- [79] X. Huang, I.H. El-Sayed, W. Qian, M.A. El-Sayed, Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 2115–2120.
- [80] J. Choi, J. Yang, D. Bang, J. Park, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haam, Targetable gold nanorods for epithelial cancer therapy guided by near-IR absorption imaging, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 8 (2012) 746–753.
- [81] J. Chen, D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z.-Y. Li, H. Zhang, Y. Xia, X. Li, Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1318–1322.
- [82] Y. Liu, K. Ai, L. Lu, Nanoparticulate X-ray Computed Tomography Contrast Agents: From Design Validation to in Vivo Applications, *Acc. Chem. Res.*, 45 (2012) 1817–1827.
- [83] C. Alric, Synthèse et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie LPCML Lyon 1, (2012).

Chapitre 2. Synthèse et caractérisations

2.1.	Introduction.....	67
2.2.	Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques	69
2.2.1.	Ligands macrocycliques	69
2.2.2.	Préparation des différentes nanoparticules.....	71
2.2.2.1.	Synthèse des nanoparticules Au@DTDOTA, Au@TADOTA et Au@TADOTAGA 71	
2.2.2.2.	Purification.....	72
2.2.2.3.	Solution injectable	73
2.2.3.	Complexation du gadolinium.....	73
2.2.4.	Radiomarquage des nanoparticules	74
2.2.4.1.	Complexation de l'indium 111	74
2.2.4.2.	Complexation du cuivre 64.....	75
2.3.	Caractérisation	75
2.3.1.	Spectrophotométrie UV visible.....	76
2.3.2.	Microscope électronique à transmission.....	76
2.3.3.	Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta.....	76
2.3.4.	Etude de la complexation de Gd ³⁺	76
2.3.5.	Lyophilisation	77
2.3.6.	ATG.....	77
2.3.7.	Evaluation de stabilité en milieu biologique simulé	77
2.3.8.	Profils NMRD et relaxivité.....	78
2.4.	Résultats et discussions.....	79
2.5.	Bilan.....	95

2.1. Introduction

La thérapie guidée par imagerie constitue un enjeu majeur, car en personnalisant le traitement, elle devrait déboucher à une amélioration de la thérapie de pathologies diverses et notamment des cancers. Comme décrit dans la partie bibliographique, de nombreux exemples de nanoparticules de formes, constitutions et tailles variées sont étudiées dans la littérature pour réaliser de la thérapie et de l'imagerie [1][2][3].

La stratégie choisie par l'équipe pour la thérapie guidée par imagerie repose sur l'utilisation d'une nanoparticule sphérique composée d'un cœur d'or, en raison de ces propriétés (biocompatibilité et forte propension à absorber le rayonnement X) [4][5]. Ce cœur est entouré d'une couche organique permettant entre autres choses de complexer différents éléments pour l'imagerie. Au final, cette nanoparticule d'or devrait améliorer l'efficacité de la radiothérapie en augmentant la cytotoxicité du rayonnement tout en réduisant ses effets secondaires. Effectivement, lors d'un traitement par radiothérapie, le rayonnement non sélectif va détruire les tissus sains sur sa trajectoire. Les tissus au-delà de la tumeur seront également affectés étant donnée la faible absorption du rayonnement par les tissus en général (cancéreux et sains). Cette absorption modérée rend nécessaire l'utilisation d'une dose relativement importante pour permettre la destruction des cellules cancéreuses. Les nanoparticules d'or, en s'accumulant au sein de la tumeur par effet EPR, permettrait alors d'absorber le rayonnement X dans la zone d'intérêt. Il en découlerait une augmentation de l'effet cytotoxique au niveau de la tumeur tout en préservant les tissus sains au-delà des tissus cancéreux. Si cet accroissement de l'effet thérapeutique est avéré, il est alors envisagé de réduire la dose du rayonnement et ainsi préserver les tissus sains en amont de la tumeur. L'activation de l'effet radiosensibilisant de ces nano-objets par l'irradiation X doit donc être réalisée au moment le plus opportun, c'est-à-dire lorsque la différence entre la quantité d'or dans les tissus cancéreux par rapport à celle présente dans les tissus sains est très importante. La capacité de ces nanoparticules à être suivies par imagerie jouera donc un rôle majeur car l'interprétation des images en temps réel devrait conduire à la détermination du délai, entre injection et irradiation, le plus adapté pour la réussite du traitement.

Comme l'amélioration de la radiothérapie repose sur l'effet radiosensibilisant des nanoparticules mais également sur l'accumulation préférentielle dans la tumeur, il s'avère alors nécessaire de contrôler certains paramètres des nanoparticules afin d'assurer une biodistribution adaptée, c'est-à-dire une accumulation uniquement dans la tumeur et une élimination rapide par voie rénale. Afin d'y parvenir la taille, la composition et la charge de surface sont des paramètres primordiaux à moduler. Notre équipe a montré la faisabilité et le fort potentiel d'un tel objet pour la radiothérapie guidée par imagerie avec les suspensions de nanoparticules Au@DTDTPA. Elles ont permis le suivi de leur biodistribution par IRM, imagerie X et imagerie nucléaire tout en confirmant une élimination rénale et une accumulation significative dans différentes tumeurs [6][7]. D'autre part, ces objets ont montré un effet radiosensibilisant important qui a permis un gain de survie de l'ordre de 473,3 % chez des rats portant un gliosarcome à la suite d'un traitement par MRT effectué après l'injection de la suspension de nanoparticules par voie intraveineuse [8]. Malgré le potentiel prometteur des nanoparticules Au@DTDTPA pour la radiothérapie guidée par imagerie, la modification de la composition de ces nanoparticules nous semblait indispensable suite aux récentes découvertes de cas suspects de fibrose systémique néphrogénique. L'apparition de cette fibrose pourrait résulter de la décomposition du complexe Gd-DTPA (Magnevist®) [9][10], nous avons engagé une réflexion afin d'éviter ce risque.

Les mécanismes entraînant cette pathologie en raison de l'utilisation d'agents de contraste à base de gadolinium ne sont pas encore bien compris mais une relation entre les deux est certaine [11][12]. En outre, il est avéré qu'un patient atteint d'insuffisance rénale présente un risque accru de libération du gadolinium en raison d'un temps de circulation plus long du complexe dû à sa pathologie [13]. Malgré une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique élevée des complexes DTDTPA-Gd lorsqu'ils sont greffés sur les nanoparticules (contrairement au DTDTPA seul)[14], nous avons pris la décision de modifier cet objet prometteur afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de libération du gadolinium dans le cas où le ligand se désorberait du cœur d'or. Nous avons alors remplacé le ligand linéaire DTDTPA par un ligand macrocyclique (dérivé du DOTA) afin d'améliorer la stabilité du complexe à base de gadolinium [15][16].

2.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques

2.2.1. Ligands macrocycliques

Le principal objectif de cette thèse consiste à remplacer le ligand linéaire DTDTPA par un ligand macrocyclique tout en conservant les caractéristiques des nanoparticules Au@DTDTPA. Après réflexions et discussions avec l'entreprise Chematech et l'équipe PD2A de l'ICMUB, plusieurs structures intéressantes ont été définies. Dans un premier temps, nous avons travaillé avec trois ligands différents (figure 2.1). Le rôle essentiel de la couche organique, outre la stabilité colloïdale, est de permettre la complexation de différents éléments afin de suivre les nanoparticules par imagerie. Comme nous souhaitons réaliser de l'IRM et de l'imagerie nucléaire, le macrocycle doit permettre de complexer des éléments tels que Gd^{3+} (IRM), ^{111}In (TEMP), ^{64}Cu (TEP). Nous avons donc choisi comme site de complexation (en rouge sur la figure 2.1) pour ces trois ligands, un macrocycle de type DOTA (l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7,10-tétraacétique). Afin d'assurer un accrochage durable sur le cœur d'or, nous avons choisi d'incorporer deux atomes de soufre dans chacun des ligands. En effet, le soufre est connu pour son excellente affinité avec l'or. De plus notre équipe, avec d'autres, a montré que la présence de deux atomes de soufre au lieu d'un seul retardait la désorption du ligand [17][18][19][20]. Deux types de fonctions pour l'accrochage sont testés; elles comportent chacune une liaison disulfure endocyclique mais se distinguent par la taille du cycle et la nature du bras espaceur (en bleu sur la figure 2.1).

Le premier ligand, le DTDOTA (figure 2.1A), est constitué d'une fonction disulfure endocyclique en bout de chaîne pour l'accrochage sur le cœur d'or. La synthèse consiste à faire réagir un équivalent d'un dérivé du DOTA ($DO3A^tBu-N-(2\text{-aminoethyl})\text{ethanamide}$) comportant une fonction amine, avec quatre équivalents 2-bromoéthyl(trityl)sulfane. Le ligand bi-fonctionnel ainsi obtenu va former après déprotection le DTDOTA par cyclisation. Une étape de purification est nécessaire pour éliminer le ligand mono-fonctionnel. Les deux autres ligands utilisés, le TADOTA (figure 2.1B) et le TADOTAGA (figure 2.1C), sont synthétisés en faisant réagir le dérivé du DOTA, comportant une fonction amine, avec 1,5 équivalents d'acide thioctique (TA) après activation de la fonction acide carboxylique de TA. La fonction d'accrochage est également un disulfure endocyclique

(constituant de l'acide thioctique). La différence entre ces deux ligands consiste en la présence d'une fonction acide carboxylique supplémentaire sur le cycle DOTA, pour le ligand TADOTAGA, dans l'optique d'améliorer la complexation des différents éléments ainsi que la stabilité colloïdale des nanoparticules.

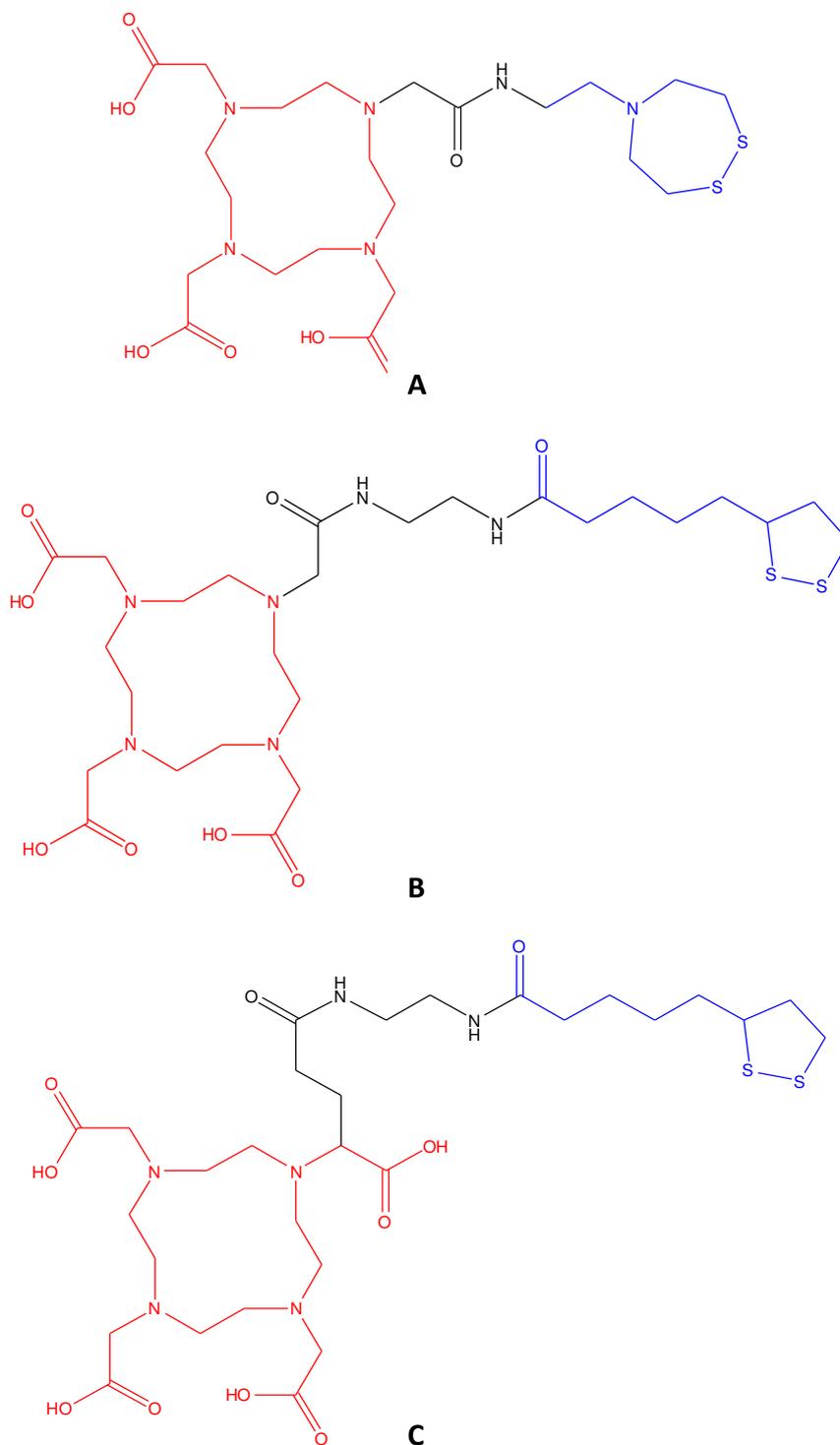


Figure 2.1 Formule semi-développée des ligands DTDOTA (A), TADOTA (B) et TADOTAGA (C)

2.2.2. Préparation des différentes nanoparticules

2.2.2.1. Synthèse des nanoparticules Au@DTDOTA, Au@TADOTA et Au@TADOTAGA

La synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec les différents ligands (TADOTA, DTDOTA et TADOTAGA) est réalisée d'après la méthode de Brust en réduisant un sel d'or par un réducteur fort en présence de ligands [21]. Ces derniers assureront le contrôle de la nucléation durant la croissance et donc le contrôle de la taille des particules tout en assurant la stabilité colloïdale. Les nanoparticules, ainsi obtenues seront composées d'un cœur d'or recouvert d'une couche organique. Elles seront désignées et distinguées par le logo Au@X (X étant le nom du ligand utilisé).

Pour synthétiser les nanoparticules Au@X (figure 2.2), l'acide tétrachloroaurique $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($4,9 \cdot 10^{-4}$ mol, 192 mg) est dissous dans le méthanol (60 mL) dans un ballon monocol de 250 mL. Pendant l'agitation magnétique de cette solution de couleur jaune, le ligand ($4,9 \cdot 10^{-4}$ mol soit 310 mg pour le TADOTA, 346 mg pour le TADOTAGA et 277 mg pour le DTDOTA) est dissous dans l'eau distillée (38 mL). Cette solution aqueuse est ensuite ajoutée dans le ballon monocol sous agitation. Il en résulte un changement de couleur, du jaune à l'orangé. Enfin, le réducteur NaBH_4 ($4,9 \cdot 10^{-3}$ mol, 182 mg) est dissous dans 13 mL d'eau distillée. La moitié de cette solution est ajoutée dans le ballon sous forte agitation et l'autre portion est ajoutée de manière fractionnée (environ 1 mL). La solution se colore instantanément en noir. L'apparition de cette coloration est le signe caractéristique de la réduction d' $\text{Au}^{(\text{III})}$ en Au^0 sous forme de nanoparticules. De plus, un dégagement de dihydrogène se produit. La solution est laissée sous agitation pendant environ une heure dans le ballon recouvert d'un bouchon permettant l'évacuation du dihydrogène. La teneur en or de la suspension Au@X ainsi obtenue est de l'ordre de 1 g/L en or.

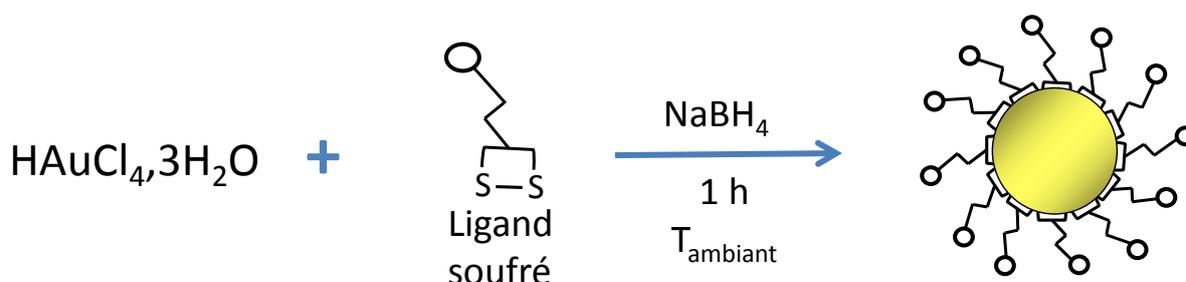


Figure 2.2 Schéma de synthèse des nanoparticules Au@X

2.2.2.2. Purification

Les nanoparticules ainsi obtenues nécessitent une purification de manière à éliminer dans un premier temps les ligands non accrochés ainsi que le méthanol, ces objets ayant pour but une utilisation *in vivo*. Pour cela, une dialyse est effectuée après la synthèse.

La technique consiste à purifier une solution, appelée dialysat, en utilisant une membrane semi-perméable sous forme de boudin. Le dialysat est introduit dans le boudin de dialyse qui est immergé dans une solution, le contre dialysat. La différence de concentration entre le dialysat et le contre-dialysat va provoquer un échange de molécules par diffusion afin de parvenir à l'équilibre (figure 2.3). En choisissant des membranes dont la taille des pores est adaptée, c'est-à-dire assez large pour éliminer les ligands libres et suffisamment petite pour empêcher le passage des nanoparticules, le méthanol et les ligands libres pourront être éliminés.

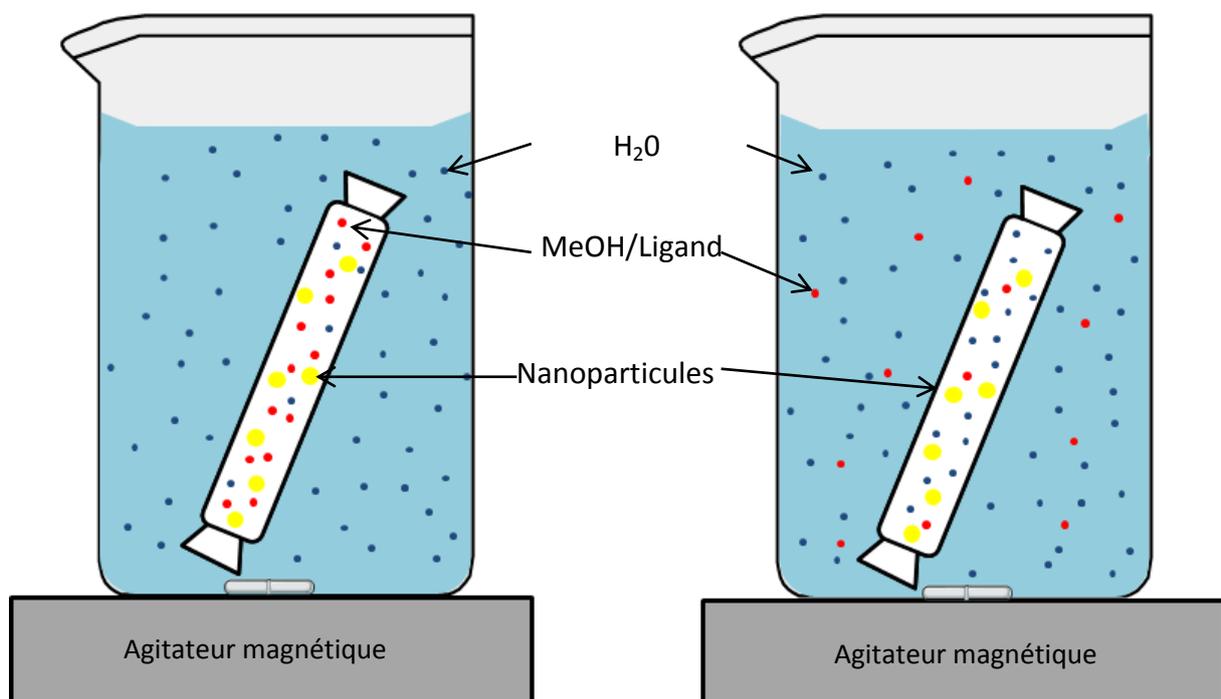


Figure 2.3 Principe de la dialyse

La purification est réalisée en utilisant des boudins de dialyse constitués d'une membrane perméable de pores présentant un seuil de coupure compris entre 6 et 8 kDa. Le boudin contenant environ 100 mL de la suspension de nanoparticules est immergé dans deux litres d'eau distillée ($V_{\text{contre-dialysat}}/V_{\text{dialysat}} = 20$) sous agitation pendant 48 heures. Le contre-dialysat est changé 6, 12 et 24 heures après le début de la dialyse afin de conserver une différence de concentration importante et ainsi maintenir l'échange tout en l'accéléralant.

2.2.2.3. Solution injectable

La suspension de nanoparticules, une fois purifiée, nécessite un ajustement de la concentration en or. Pour cela, une ultrafiltration (centrifugation et filtration sur membrane (seuil de coupure de 10 kDa)) est mise en œuvre à l'aide d'un tube concentrateur Vivaspin®.

Une fois la suspension à la concentration souhaitée, un ajustement du pH et de la force ionique doit être réalisé afin de permettre son injection dans un organisme vivant. En effet, le pH physiologique de 7,4 et l'osmolarité de 300 mOsm/L doivent être respectés.

Dans un premier temps une solution composée du tampon Hepes (0,253 M) et de NaCl (3,673M) est ajoutée de manière à obtenir une concentration de 145 mM de NaCl et 10 mM d'Hepes (correspondant au total à 300 mOsm/L). Suite à cet ajout, le pH de la solution est ajusté à environ 7,4 par ajout de petites quantités d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.

Pour finir, la solution est filtrée à l'aide d'une seringue et d'une membrane stérile en PES constitué de pores de 0,2 μm afin de stériliser la suspension. Celle-ci est stockée dans un flacon scellé par une capsule avec septum.

2.2.3. Complexation du gadolinium

Pour permettre le suivi de ces nanoparticules par IRM, le marquage par des ions métalliques paramagnétiques ou superparamagnétiques est nécessaire. En raison de son moment magnétique très élevé, le gadolinium semble être le plus adapté. Sous forme de complexes, il est d'ailleurs utilisé quotidiennement en clinique en tant qu'agents de

contraste moléculaires pour l'IRM. Les ligands macrocycliques adsorbés sur les cœurs d'or ont été choisis pour leur capacité à former des complexes stables avec le gadolinium. La stabilité du complexe doit être la plus élevée possible pour éviter la libération et la dissémination des ions gadolinium qui sont toxiques à l'état libre. Pour complexer l'ion Gd^{3+} , une solution de chlorure de gadolinium (III) ($GdCl_3$) de 135 mM est ajoutée à la suspension de manière à obtenir la concentration souhaitée. Le pH est ensuite ajusté à 7,4 par ajout de quelques microlitres d'une solution d'hydroxyde de sodium.

2.2.4. Radiomarquage des nanoparticules

Pour localiser précisément les nanoparticules dans l'organisme et ainsi étudier la biodistribution, l'utilisation de l'imagerie nucléaire (TEMP ou TEP), une technique plus sensible que l'IRM, paraît mieux adaptée malgré les contraintes liées à la radioactivité. Les nanoparticules ont alors été marquées par des radionucléides émetteurs β^+ (cuivre-64) pour la TEP ou émetteurs γ (Indium-111) pour la TEMP.

Le procédé de radiomarquage des différentes nanoparticules et le contrôle de la pureté radiochimique ont été réalisés dans un laboratoire de radiopharmacie au sein du centre George François Leclerc (CGFL) à Dijon par le docteur Bertrand Collin pour la TEMP et par les docteurs Mathieu Moreau et Claire Bernhard pour la TEP.

2.2.4.1. Complexation de l'indium 111

Le marquage des nanoparticules par l'indium-111 est réalisé directement par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (0,05 M) contenant de $^{111}InCl_3$ à la suspension colloïdale de nanoparticules. Typiquement, 1 mL de suspension colloïdale Au@X à environ 10 g/L en or (dans un tampon hepes 5 mM/NaCl 145 mM) est marqué par environ 150 MBq de ^{111}In et la suspension est agitée au vortex pendant vingt minutes. Les nanoparticules marquées Au@X- ^{111}In sont séparées de l'indium-111 libre par chromatographie d'exclusion stérique (colonne PD-10 Sephadex G-25, GE Healthcare). Pour cela, la colonne est préalablement rincée avec 15 mL de tampon citrate de sodium (50 mM, pH ~5), puis la suspension colloïdale marquée est introduite dans la colonne et éluée avec le tampon

citrate. Des fractions de 0,5 mL sont recueillies et leur activité est comptée à l'aide d'un compteur approprié (chambre d'ionisation, Capintec CRC-15). La pureté radiochimique des fractions contenant les nanoparticules Au@DTDTPA-¹¹¹In est évaluée par chromatographie sur couche mince (CCM) (supports ITLC-SG, Gelman Science) en utilisant comme éluant un tampon citrate de sodium (50 mM, pH ~5). La répartition et la quantification de la radioactivité présente sur les plaques CCM est réalisée à l'aide d'un radiochromatographe (miniGita, Raytest). Une solution d'indium-111 libre (¹¹¹InCl₃) est utilisée comme référence ; l'indium-111 complexé par les nanoparticules Au@DTDTPA reste sur la ligne de dépôt (Rf = 0) tandis que l'indium libre migre au front (Rf = 0,8–1,0).

2.2.4.2. Complexation du cuivre 64

Le marquage des nanoparticules par le cuivre 64 est réalisé directement par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (0,1 M) contenant CuCl₂, diluée dans un tampon acétate d'ammonium (1M, pH 7,07), à la suspension colloïdale de nanoparticules tamponnée à pH 5,8 (tampon acétate d'ammonium 0,1M). Typiquement, 1 mL de suspension colloïdale Au@X à environ 10 g/L en or (dans un tampon hepes 5 mM/NaCl 145 mM) est marqué par environ 60 MBq de ⁶⁴Cu et la suspension est agitée au vortex pendant quarante-cinq minutes. Suite à l'ajout d'une solution d'EDTA dans un tampon acétate d'ammonium (0,1M, pH 5,8), la suspension est à nouveau agitée pendant 15 minutes. Les nanoparticules marquées Au@X-⁶⁴Cu sont séparées des complexes ⁶⁴Cu-EDTA par ultrafiltration (filtre Nanosep 30 kDa pendant 12 minute à 4°C). La suspension est enfin diluée avec du PBS avant injection. La pureté radiochimique des fractions contenant les nanoparticules Au@DTDTPA-⁶⁴Cu est évaluée par chromatographie ITLC en utilisant comme éluant un tampon citrate de sodium (0,1M, pH ~5). La répartition et la quantification de la radioactivité est réalisée à l'aide d'un radiochromatographe (Bioscan AR-2000).

2.3. Caractérisation

Les nanoparticules Au@TADOTA, Au@TADOTAGA et Au@DTDOTA ont été caractérisées par différentes techniques avant leur utilisation en milieu biologique.

2.3.1. Spectrophotométrie UV visible

Les spectres UV visibles ont été réalisés en utilisant un spectrophotomètre UV SPECORD 250 sur la gamme 400-800 nm. Les échantillons sont dilués de manière à obtenir une concentration d'environ 0,25 g/L afin d'être comparés.

2.3.2. Microscope électronique à transmission

Les mesures du diamètre du cœur d'or ont été réalisées à partir de clichés obtenus à l'aide d'un microscope électronique en transmission (TEM) JEOL 2010 FEG à 200 kV. Les échantillons ont été préparés en déposant une goutte de la suspension à analyser sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Les séances de microscopie ont été réalisées par Pascal Perriat (Professeur au laboratoire MATEIS, INSA Lyon).

2.3.3. Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta

Les mesures du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta ont été réalisées avec le Nanosizer ZS de Malvern comprenant un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm. La mesure du potentiel Zêta a été effectuée sur les suspensions de nanoparticules à 5 mM en or (1 g/L) et 10^{-2} M en NaCl. Le pH des différentes suspensions a été ajusté par ajout de NaOH ou HCl à 1M. Les mesures du diamètre hydrodynamique, par DLS, ont été effectuées à pH~ 7.

2.3.4. Etude de la complexation de Gd^{3+}

La capacité de complexation des ions gadolinium par les ligands autour du cœur d'or des nanoparticules a été évaluée par un dosage complexométrique en utilisant le xylénol orange. Celui-ci est un complexant plus faible que les ligands macrocycliques de type DOTA (constituants de la couche organique des nanoparticules). Lorsque ce colorant complexe des ions gadolinium, son spectre UV visible se trouve modifié. Le principe de ce dosage consiste à ajouter une quantité connue d'ions gadolinium à la suspension de nanoparticules puis de

la centrifuger dans un tube Vivaspin® constitué d'une membrane avec un seuil de coupure de 5 kDa afin de recueillir le filtrat comprenant les ions Gd^{3+} non complexés. 100 μ L de filtrat sont alors mélangés avec 3 mL d'une solution de xylénol orange (3 mg dans 250 mL de tampon acétate à pH 5,8). Une courbe UV visible est ensuite tracée et le rapport d'absorbance des deux pics d'absorption A_{573}/A_{433} est calculé. Ce rapport couplé à la courbe de calibration réalisée en amont permet de déterminer la quantité d'ions gadolinium libres et donc de remonter à la quantité d'ions Gd^{3+} complexée par la couche organique des nanoparticules. Cela permet en outre, de déduire le nombre de ligands par nanoparticule.

2.3.5. Lyophilisation

La lyophilisation consiste à extraire l'eau d'un échantillon par sublimation. L'échantillon à lyophiliser est alors congelé de manière à obtenir l'eau de l'échantillon sous forme solide (glace). Puis l'eau solide est éliminée par sublimation à basse pression.

La transformation de la suspension colloïdale de nanoparticules sous forme de poudre a été réalisée grâce à un lyophilisateur Christ 2-4 LSC à $-80^{\circ}C$ et 0,00041 mbar à l'ILM dans l'équipe du Professeur Olivier Tillement.

2.3.6. ATG

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur un appareil Discovery au sein du laboratoire MaNaPI de Dijon avec le docteur Julien BOUDON. Les différentes poudres de nanoparticules lyophilisées (1 mg) ont été déposées dans une nacelle en platine puis ont été soumises à une montée en température de $25^{\circ}C$ à $700^{\circ}C$ ($5^{\circ}C$ /minutes) sous oxygène.

2.3.7. Evaluation de stabilité en milieu biologique simulé

Pour se mettre dans des conditions proches du milieu biologique, 145 mM de NaCl et 5 mM d'hepes ont été ajoutés aux différentes suspensions de nanoparticules à 10 g/L en or et pH 7,4. De plus, une solution de $GdCl_3$ a été ajoutée en se basant sur 40% de la capacité

maximale de complexation. Ce pourcentage, déterminé dans la thèse de Christophe Alric, propose un bon compromis entre la stabilité colloïdale et le potentiel en imagerie IRM. En effet, en plus d'assurer une bonne stabilité colloïdale en ne saturant pas tous les groupements COOH ionisables et donc en conservant un potentiel Zêta important, cette concentration a été évaluée comme optimale pour le signal IRM avec les nanoparticules Au@DTDTPA [6] [17].

2.3.8. Profils NMRD et relaxivité

Les profils NMRD, rendant compte du comportement des nanoparticules en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, ont été réalisés avec un relaxomètre à champ cyclique rapide Stela de 0,25 mT à 0,94 T (0,01 – 40 MHz) à 37 °C. L'ajustement théorique des profils NMRD a été réalisé à partir du modèle de relaxation classique [22][23][24].

La mesure des temps de relaxation longitudinale et transversale a été effectuée à 37°C sur un Minispec MQ60 de Bruker à 60 et 20 MHz.

Les différents échantillons consistent en des suspensions de nanoparticules à 10 g/L en or auxquelles sont ajoutées des quantités croissantes de gadolinium (tableau 2.1). Le pH est ensuite ajusté à 7,4 par l'ajout de faibles quantités de NaOH ou HCl.

Tableau 2.1 Composition des différents échantillons pour mesurer la relaxivité des suspensions Au@X

Echantillon	V _{Au} (mL)	n _{Au} (μmol)	V _{Gd} (μL)	n _{Gd} (μmol)	[Gd ³⁺] (mM)	V _{H2O} (μL)	V _{tot} (mL)
A	0,5	25	7,4	1	1,7	92,6	0,6
B	0,5	25	11,1	1,5	2,5	88,9	0,6
C	0,5	25	19	2,56	4,26	81	0,6
D	0,5	25	25,9	3,5	5,83	74,1	0,6
E	0,5	25	33,3	4,5	7,5	66,7	0,6

2.4. Résultats et discussions

Comme la bande plasmon caractéristique des nanoparticules d'or est observée dans le domaine visible du spectre électromagnétique, la spectrophotométrie constitue un très bon moyen de caractériser ces objets. A partir d'un spectre UV, il est possible de calculer par des modèles complexes le diamètre des nanoparticules [25]. Et de manière plus simple, le spectre UV permet de donner un ordre d'idée sur la taille des objets qui dépend de la position de la bande plasmon et de la distribution en taille qui est reflétée par la forme et la largeur de cette bande [26]. Le comportement de cette bande plasmon permet de vérifier la stabilité colloïdale au cours du temps et/ou en fonction des variations de pH. C'est pourquoi, dans un premier temps, les spectres UV visibles des trois types de nanoparticules ont été tracés (figure 2.4). Les différentes suspensions montrent bien une bande plasmon autour de 520 nm, caractéristiques des nanoparticules d'or. Cependant, nous pouvons noter deux tendances au niveau de l'allure de celle-ci. Pour les suspensions de nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA, la bande plasmon peu visible est similaire à celle des nanoparticules Au@DTDTPA qui nous servent de modèle. La faible absorbance autour de 520 nm est caractéristique des nanoparticules possédant un diamètre du cœur d'or inférieur à 3 nm. En revanche, le spectre des nanoparticules Au@DTDOTA présente une bande plasmon nettement plus marquée. Nous pouvons en déduire que le cœur des nanoparticules Au@DTDOTA est plus gros malgré la similitude du protocole de synthèse des différentes suspensions de particules d'or. Il semble donc que le ligand joue un rôle sur cette augmentation de taille. Il est possible que la fonction disulfure endocyclique du DTDOTA, comportant plus d'atomes et étant donc plus souple, favorise des désorptions des thiols. De plus la chaîne entre le DOTA et la fonction disulfure endocyclique étant plus courte pour le DTDOTA, les ligands se greffent potentiellement moins facilement sur les cœurs d'or en raison de l'encombrement stérique. La nucléation se trouverait alors moins bien contrôlée lors de l'ajout du réducteur. Ces résultats semblent cohérents au vu de la couleur des différentes suspensions. En effet, les suspensions AU@TADOTA et Au@TADOTAGA sont marron/noir à des concentrations importantes (10 g/L) et marron clair pour des concentrations plus faibles (1 g/L), alors que la suspension Au@DTDOTA arbore une couleur rouge foncé qui est caractéristique des suspensions contenant des nanoparticules possédant un diamètre supérieur à 5 nm.

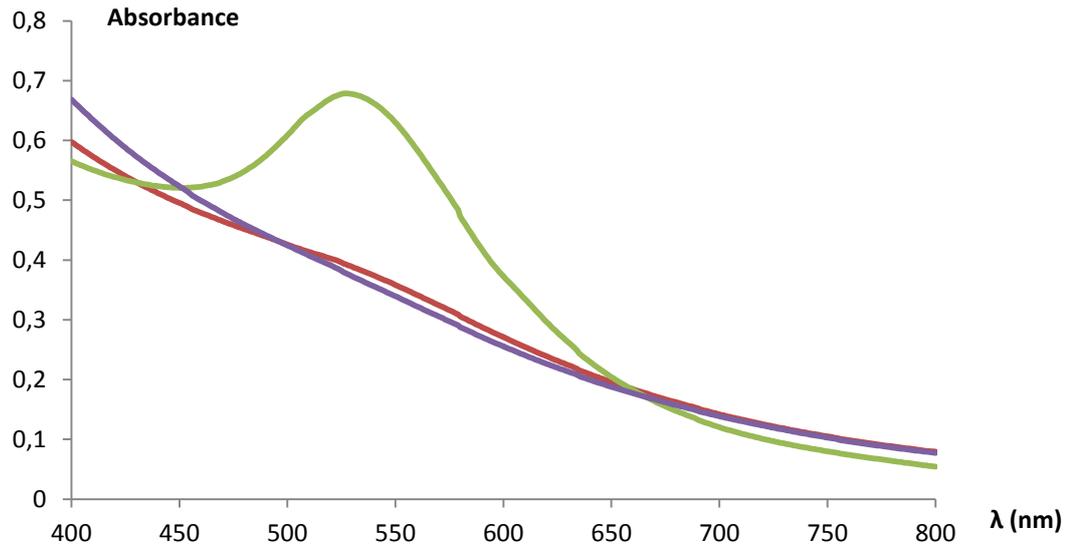


Figure 2.4 Spectres UV entre 400 et 800 nm des nanoparticules, Au@TADOTA (en rouge), Au@DTDOTA (en vert) et Au@TADOTAGA (en violet)

Les analyses par TEM (transmission electron microscopy) permettent de connaître précisément le diamètre du cœur d'or des différentes nanoparticules et ainsi vérifier les interprétations précédentes. Les clichés TEM (figure 2.5) indiquent que les nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA, qui étaient caractérisées par une faible bande plasmon, possèdent effectivement un cœur dont le diamètre est inférieur à 3 nm ($2,2 \pm 0,5$ nm pour Au@TADOTA et $2,3 \pm 0,5$ nm pour Au@TADOTAGA). Ces dimensions sont similaires à celle du cœur d'or des nanoparticules Au@DTDTPA. Confirmant les données recueillies par la spectroscopie UV, les nanoparticules Au@DTDOTA possèdent un diamètre plus important (environ 6,6 nm). La distribution en taille indique une faible dispersion pour Au@TADOTA et Au@TADOTAGA contrairement à Au@DTDOTA pour laquelle nous pouvons distinguer deux populations bien distinctes, la première d'environ 4 nm et la deuxième de 9 nm.

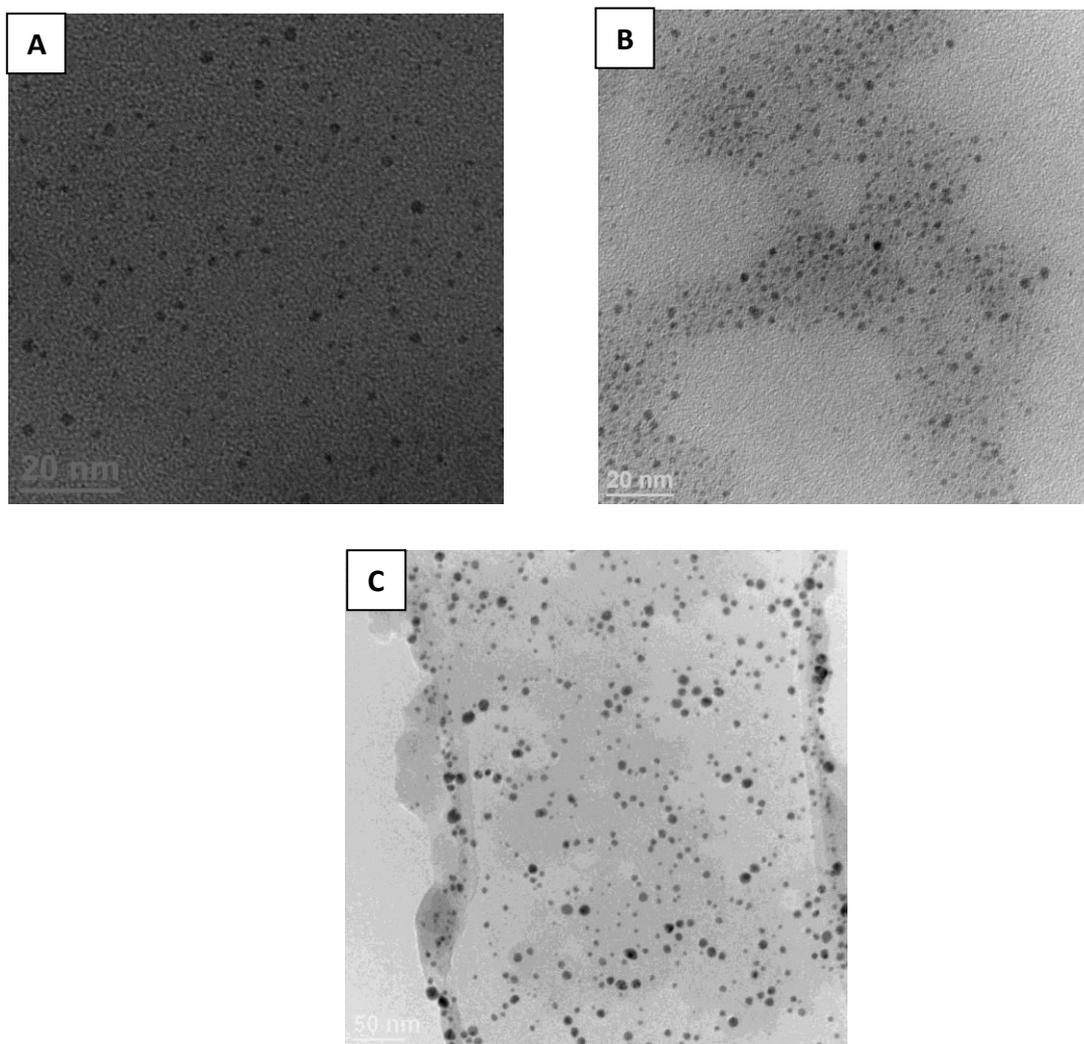


Figure 2.5 Clichés TEM des nanoparticules Au@TADOTA (A), Au@TADOTAGA (B) et Au@DTDOTA (C)

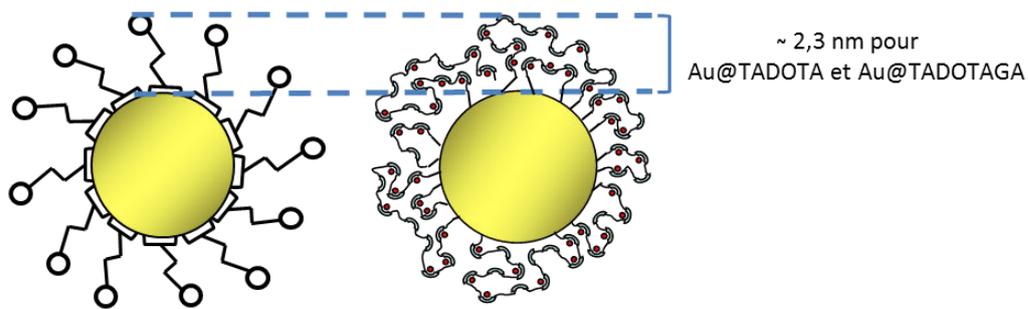
Le diamètre hydrodynamique des différentes nanoparticules a ensuite été mesuré par DLS (tableau 2.2). Les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA sont similaires aux incertitudes près (respectivement 6,4 et 6,7 nm) à celui des nanoparticules Au@DTDTPA (6,6 nm).

Tableau 2.2 Diamètre hydrodynamique des différents types de nanoparticule mesurés par DLS

Nanoparticules	Au@DTDTPA	Au@TADOTAGA	Au@TADOTA	Au@DTDOTA
Diamètre hydrodynamique	6,6 ± 1,8 nm	6,7 ± 1,9 nm	6,4 ± 0,8 nm	12,4 ± 1,0 nm
Diamètre par mesure et calcul	X	7,4 nm	6,9 nm	12 nm

Ces valeurs semblent cohérentes par rapport aux mesures par TEM, l'augmentation de taille (d'environ 4 nm pour Au@TADOTAGA et Au@TADOTA et environ 3 nm pour Au@DTDOTA) provenant des ligands adsorbés et de la couche de solvatation. Néanmoins, il avait été montré que le DTDTPA formait une multicouche (en formant des ponts disulfures en raison de l'éloignement des deux fonctions thiols) autour des cœurs d'or [17]. Or, étant donnée la conformation des différents ligands macrocycliques, la formation d'une multicouche est peu probable en raison de l'encombrement stérique. Cette épaisseur de la couche organique identique entre les nanoparticules Au@DTDTPA (multicouche) et les nanoparticules Au@TADOTA, Au@TADOTAGA et Au@DTDOTA (monocouche probable) pourrait alors s'expliquer par une disposition différente des ligands. En effet, dans le cas des macrocycles, les ligands se présentent sous une forme étirée en raison d'une grande rigidité et de la proximité des fonctions thiols, alors que pour le ligand DTDTPA, nous sommes dans le cas d'un étalement (flexibilité de la chaîne et présence de ponts disulfures entre les ligands) (figure 2.6). La détermination du diamètre des nanoparticules ($D_{\text{cœur d'or}} + 2 \times L_{\text{Ligand}}$) par calcul approximatif de la longueur des ligands TADOTA (2,24 nm), TADOTAGA (2,49 nm) et DTDOTA (1,49 nm), et donc de l'épaisseur de la couche organique, se montre cohérente avec les valeurs du diamètre hydrodynamique mesurées par DLS et semble donc confirmer notre hypothèse concernant la conformation des ligands macrocycliques sur le cœur d'or.

Les nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA, en raison de leur taille réduite (inférieure à 10 nm), présentent, théoriquement, la capacité d'être éliminées par voie rénale contrairement aux nanoparticules Au@DTDOTA qui présentent un diamètre *à priori* trop important (environ 12 nm).



Monocouche de ligands macrocycliques Multicouche de ligands linéaires

Figure 2.6 Schéma représentant la couche organique constitué de ligands macrocycliques (monocouche) et de ligands linéaire (multicouche)

Si le contrôle de la taille des nanoparticules est important pour les applications *in vivo* (en particulier pour favoriser l'élimination rénale), la stabilité colloïdale est cruciale. Celle-ci a donc été évaluée en fonction du pH en enregistrant les spectres UV-visibles. Quel que soit le pH, les spectres des deux types de suspensions Au@TADOTAGA (figure 2.7) et Au@TADOTA sont superposés. Nous pouvons donc en déduire que les suspensions de ces deux types de nanoparticules présentent une stabilité colloïdale sur toute la gamme de pH et notamment au pH physiologique (7,4). Cependant, ce n'est pas le cas pour la suspension de nanoparticules Au@DTDOTA (figure 2.8). En effet, nous pouvons remarquer une superposition des courbes pour les valeurs de pH 7, 9 et 11. Or, en abaissant le pH à 5 puis à 3 nous constatons une diminution de l'absorbance maximale ainsi qu'un déplacement et élargissement de la bande plasmon indiquant une agrégation des nanoparticules. A pH 1, la bande plasmon augmente à nouveau et se trouve entre celle de pH 5 et pH 7 indiquant alors un faible regain de stabilité. Mais il demeure insuffisant pour se retrouver dans la même situation que les suspensions stables de nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA. Néanmoins, il faut souligner que les nanoparticules Au@DTDOTA sont stables à pH physiologique.

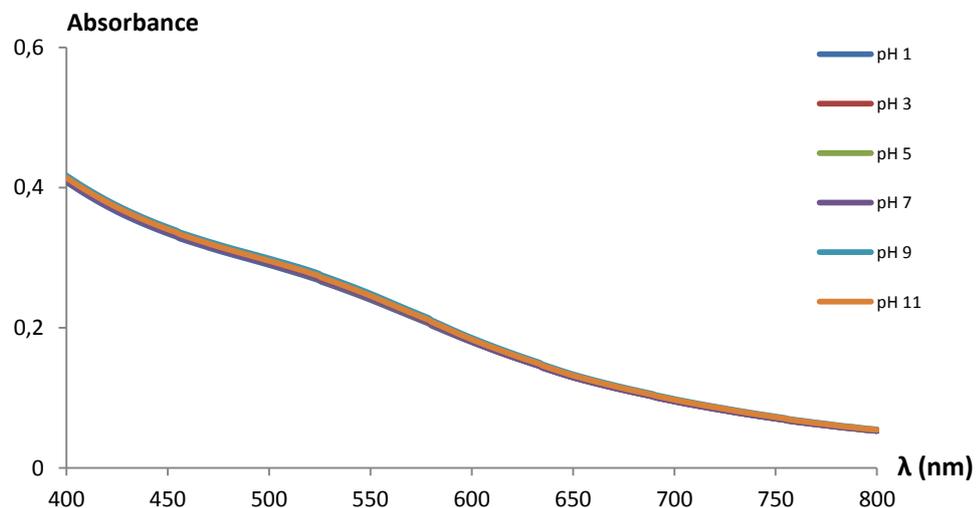


Figure 2.7 Spectres UV entre 400 et 800 nm de la suspension Au@TADOTAGA (comportement identique pour Au@TADOTA) en fonction du pH (pH 1 à 11)

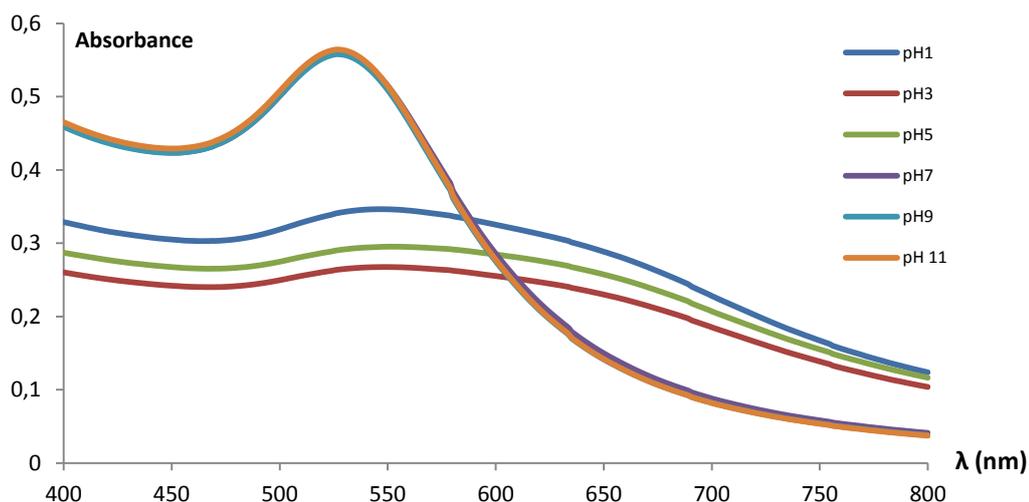


Figure 2.8 Spectres UV entre 400 et 800 nm de la suspension Au@DTDOTA en fonction du pH (pH 1 à 11)

La stabilité colloïdale d'une suspension de nanoparticules peut s'expliquer par l'encombrement stérique des ligands présents à la surface des cœurs d'or mais également par la répulsion électrostatique entre nanoparticules de même charge. Les courbes décrivant l'évolution du potentiel Zêta en fonction du pH montrent clairement la présence d'une charge positive pour des pH inférieurs à 4 (excepté pour les nanoparticules Au@DTDOTA) et négative pour des pH supérieurs à 5 (figure 2.9).

La présence des charges à la surface des nanoparticules résulte du caractère ionisable des fonctions amines et acide carboxylique portées par les macrocycles. La stabilité des suspensions Au@TADOTA et Au@TADOTAGA pour un pH supérieur à 5 est donc assurée par la forte charge négative résultant de la déprotonation des fonctions acide carboxylique. La stabilité en dessous de pH 4 semble être assurée par la charge positive provenant de la protonation des amines tertiaires. En outre, ces suspensions restent stables même au point de charge nulle. Cette stabilité pourrait provenir du fait de répulsions stériques importantes. Concernant la suspension Au@DTDOTA, seules les mesures de potentiel Zêta à pH 1, 7, 9 et 11 ont été réalisées en raison de phénomènes de sédimentations à pH 3 et 5. Nous pouvons associer la stabilité au-dessus de pH 6 aux groupements COO^- . La taille étant beaucoup plus importante que celle des autres nanoparticules, il semblerait que la protonation des amines ne suffise pas à assurer la stabilité aux pH acides.

En raison de la difficulté de synthèse du ligand DTDOTA, de la dispersion importante en taille de son cœur d'or, de son diamètre hydrodynamique trop important pour une élimination rénale et de l'étroitesse de la gamme de pH dans laquelle le colloïde est stable, la suspension Au@DTDOTA se trouve être un candidat moins intéressant pour la thérapie guidée par imagerie et ne sera plus étudié dans la suite de cette thèse.

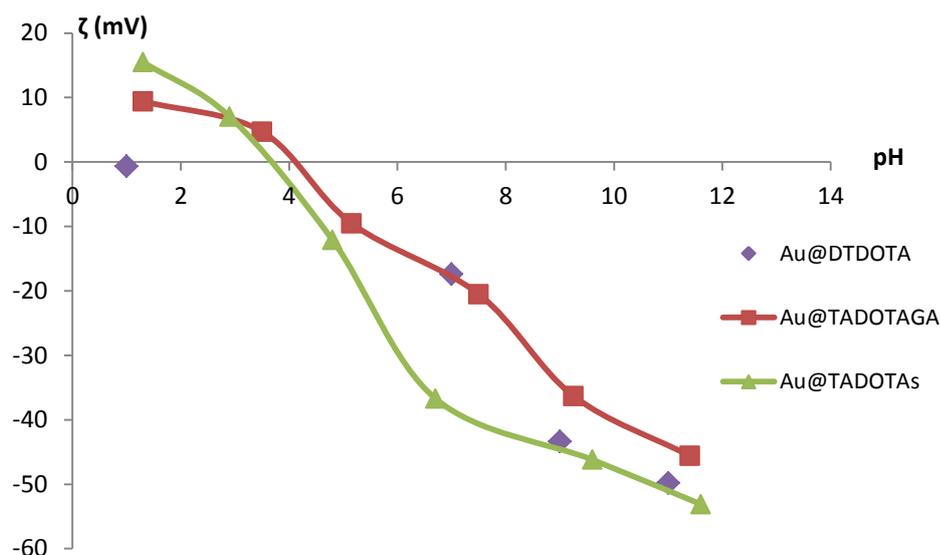


Figure 2.9 Courbes du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions de nanoparticules Au@TADOTA (vert), Au@TADOTAGA (rouge) et Au@DTDOTA (violet). Les lignes reliant les points ne représentent pas une réalité chimique mais une aide à la lecture

En plus d'assurer la stabilité colloïdale, ces ligands macrocycliques ont été développés pour complexer à des fins d'imagerie différents éléments à la surface des nanoparticules. La capacité des nanoparticules à immobiliser des ions Gd^{3+} à leur surface par la formation de complexes avec les ligands macrocycliques a été évaluée par dosage complexométrique à l'aide du xylénol orange [27]. Cette quantification permet en outre de remonter indirectement au nombre de ligands par nanoparticule étant donné l'équivalence entre le nombre de ligands et la quantité d'ions gadolinium maximum pouvant être complexée. Comme nous pouvons le voir dans le tableau 2.3, les capacités de complexation des nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA sont équivalentes. En outre, elles sont inférieures à celle des nanoparticules Au@DTDTPA en raison d'une quantité plus importante de ligands linéaires autour du cœur d'or due à la présence d'une multicouche.

Tableau 2.3 Capacité de complexation et nombre de ligands par nanoparticule des différentes suspensions

Nanoparticules	Au@DTDTPA	Au@TADOTAGA	Au@TADOTA
Capacité de complexation (pour 500 nmol d'or)	185 nmol	135 nmol	135 nmol
Nbr de ligands par nanoparticule	150	105	105
Nbr de ligands par nanoparticule d'après l'ATG	125	84	86

Pour confirmer le nombre de ligands par nanoparticule, l'analyse thermogravimétrique (ATG) semble la meilleure méthode. Cependant les suspensions étant extrêmement stables, même au point de charge nulle, une étape de lyophilisation est nécessaire afin d'obtenir les nanoparticules sous forme de poudre (figure 2.10).



Figure 2.10 Photo d'une suspension aqueuse de nanoparticules et de nanoparticules lyophilisées

Afin de vérifier que la lyophilisation ne modifie pas les nanoparticules, les spectres UV-visible (figure 2.11) enregistrés avant et après lyophilisation, ainsi que les diamètres hydrodynamiques (tableau 2.4) ont été comparés. Il en ressort que l'allure des spectres et les valeurs des diamètres hydrodynamiques sont identiques. Le processus de lyophilisation ne semble donc pas altérer les nanoparticules.

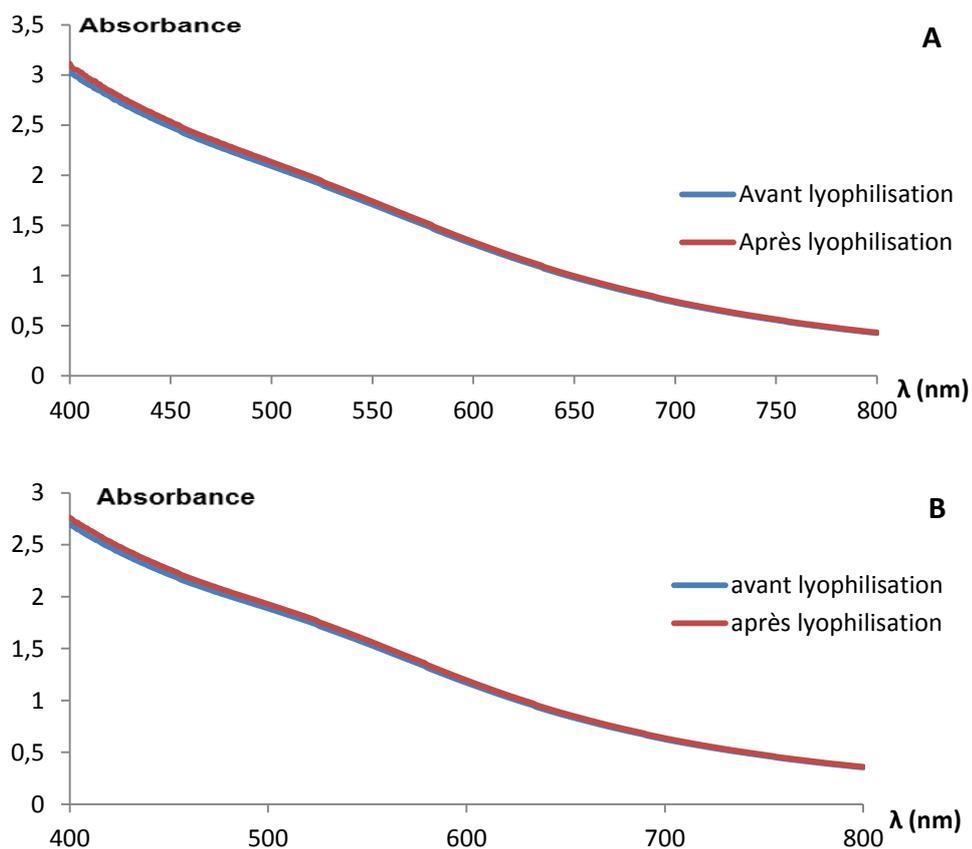


Figure 2.11 Spectres UV entre 400 et 800 nm des suspensions Au@TADOTAGA (A) et Au@TADOTA (B) avant et après lyophilisation

Tableau 2.4 Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA avant et après lyophilisation

Nanoparticules	Au@TADOTA	Au@TADOTA	Au@TADOTAGA	Au@TADOTAGA
	Avant lyoph.	Après lyoph.	Avant lyoph.	Après lyoph.
Diamètre hydrodynamique	6,4 nm	6,4 nm	6,7 nm	6,6 nm

La production de poudre par lyophilisation des suspensions de nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA a donc permis l'analyse par ATG. La figure 2.12, nous indique un comportement similaire entre les deux nanoparticules. Cela est concordant avec les données obtenues par le dosage au xylénol orange et la mesure du diamètre hydrodynamique. En mesurant le pourcentage de perte massique à partir d'environ 140°C (la perte de masse inférieure à cette température correspondant à la désorption des

molécules d'eau), ces courbes indiquent une perte de masse d'environ 41% pour Au@TADOTAGA et 40% pour Au@TADOTA. En d'autres termes, les nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA sont constituées à 40 % de matière organique (le ligand) et 60 % d'or. Ces valeurs nous permettent de remonter aux nombres de ligands par nanoparticule et ainsi confirmer ou infirmer les valeurs calculées d'après le dosage complexométrique (tableau 2.3). Nous pouvons remarquer que les valeurs entre les calculs réalisés par dosage et par ATG sont cohérentes avec une erreur d'environ 20% (même ordre de grandeur que celui observé dans le cas des nanoparticules Au@DTDTPA) mais avec une meilleure précision pour l'ATG [28]. Nous considérerons donc que les nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA sont composées d'environ 85 ligands.

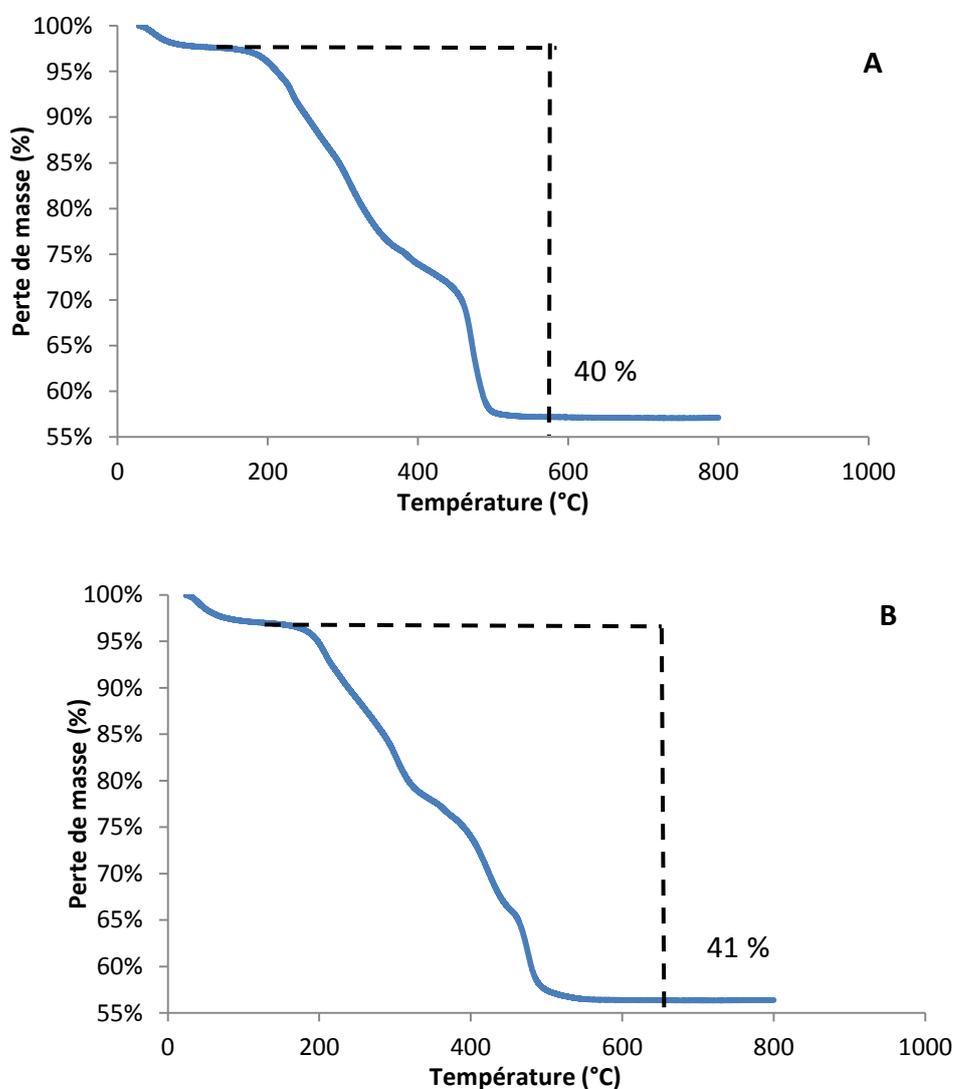
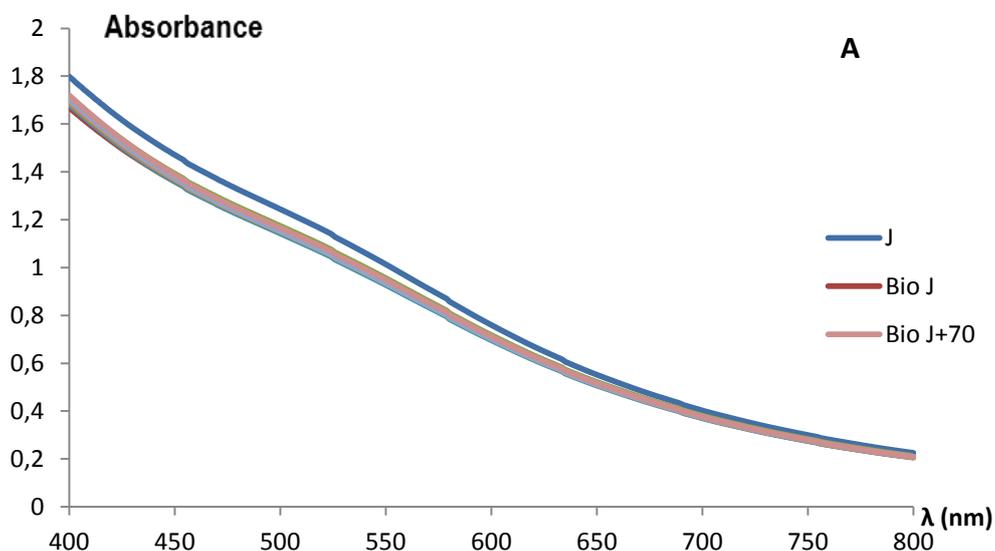


Figure 2.12 Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules Au@TADOTA (A) et Au@TADOTAGA (B)

Ces suspensions, complexant avec succès le gadolinium, peuvent donc potentiellement permettre un suivi par IRM. Néanmoins, avant de réaliser des tests *in vivo*, la stabilité colloïdale des nanoparticules complexant du gadolinium (5 mM) en condition biologique (force ionique élevée) a été testée afin de vérifier que la présence de gadolinium et/ou les conditions biologiques ne vont pas déstabiliser les suspensions. En effet, la charge positive des ions Gd^{3+} va induire une diminution du potentiel Zêta. Ajouté à cela, la force ionique importante va induire des phénomènes d'écrantage de charges et donc un affaiblissement de la répulsion électrostatique.

Il est donc nécessaire de vérifier qu'en condition *in vivo*, les suspensions restent stables afin d'éviter une embolie causée par l'agrégation des nanoparticules. L'évolution des courbes UV-visible au cours du temps, nous indique que les suspensions Au@TADOTA et Au@TADOTAGA complexant du gadolinium restent stables pendant au moins deux mois à pH et force ionique physiologiques (figure 2.13).



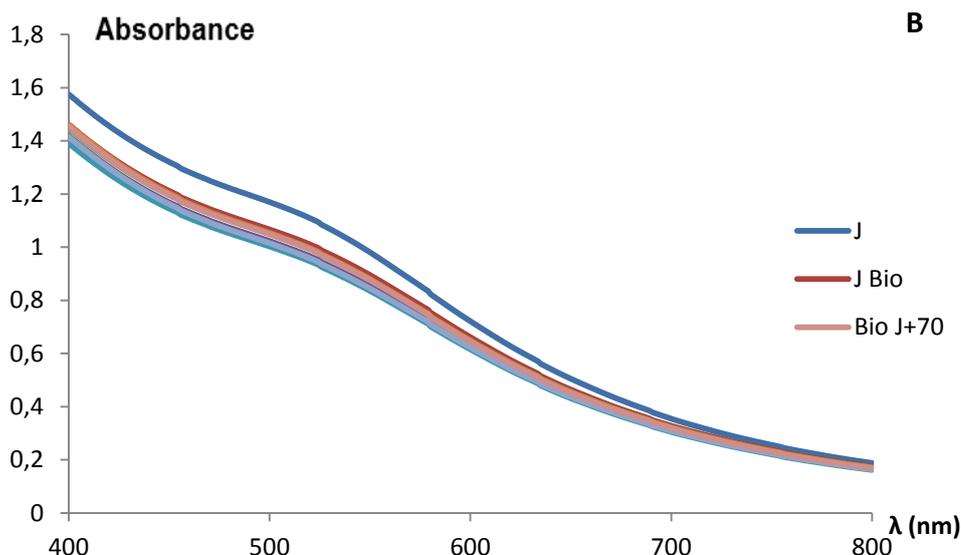


Figure 2.13 Spectres UV entre 400 et 800 nm des suspensions Au@TADOTAGA-Gd³⁺ (A) et Au@TADOTA-Gd³⁺ (B) en condition biologique pour l'IRM (300 mOsm/L et 5mM de Gd³⁺) en fonction du temps

Grâce à la couche de ligands macrocycliques, les nanoparticules sont en mesure d'immobiliser les ions gadolinium à leur surface tout en conservant une excellente stabilité colloïdale. Ces nano-objets peuvent donc potentiellement être suivis par IRM. Cette aptitude nécessite d'être évaluée, par des mesures de profil NMRD et de relaxivité, avant de réaliser des études d'imagerie *in vivo*. Les profils NMRD tracés pour des concentrations en gadolinium de 2 mM (figure 2.14), montrent dans un premier temps que les trois suspensions présentent un taux de relaxation R_{1obs} plus élevé que celui du Dotarem[®] (agent de contraste moléculaire utilisé en clinique, constitué de gadolinium complexé par un macrocycle de type DOTA). Cela indique que les nanoparticules possèdent un potentiel plus important pour rehausser le contraste positif des images IRM. En outre, nous pouvons remarquer que le profil NMRD du Dotarem[®] présente une décroissance continue du taux de relaxation à la fin du palier (vers 1 MHz), alors que l'allure des profils NMRD des deux suspensions de nanoparticules est différente. A la suite du palier, R_1 décroît jusqu'à environ 6-7 MHz puis augmente brusquement jusqu'à un maximum situé autour de 10 MHz. Cette courbe en cloche après le palier est caractéristique d'un agent de contraste volumineux [29]. Ce phénomène est extrêmement avantageux étant donnée la tendance actuelle qui consiste à fabriquer des appareils IRM fonctionnant à haut champ. La décroissance du Dotarem[®], caractéristique d'un agent de contraste moléculaire, montre bien que ceux-ci ne sont plus

adaptés pour des appareils à haut champ contrairement aux nanoparticules. En comparant le comportement des deux suspensions pour une même concentration de gadolinium, nous pouvons remarquer que le profil de la suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA présente un R_{1obs} plus élevé mais une diminution de celui-ci plus importante comparée au profil de la suspension Au@TADOTA, rendant leurs taux de relaxation proches à haut champ.

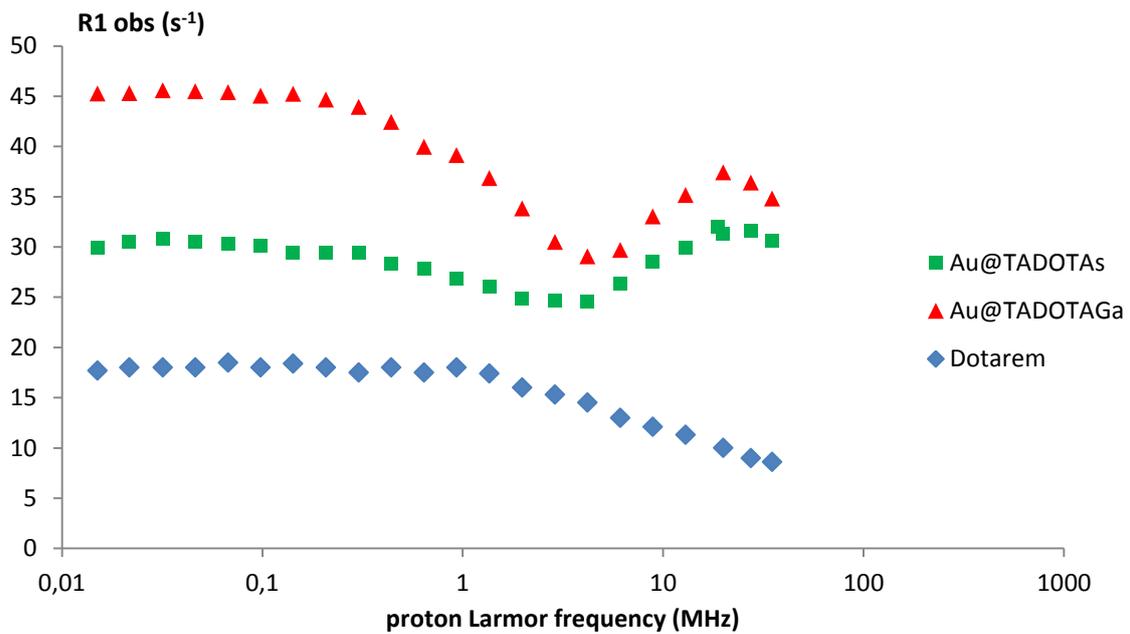


Figure 2.14 Profils NMRD de 0,01 à 1000 MHz des suspensions Au@TADOTA (en vert) et Au@TADOTAGA (en rouge) et du Dotarem®(en bleu)

Pour une fréquence donnée, il est possible de déduire de R_i , la relaxivité r_i d'après l'équation :

$$R_{i_{obs}} = \frac{1}{T_{i_{obs}}} = r_i[Gd^{3+}] + \frac{1}{T_{i_{diamagnétique}}}$$

En d'autres termes, r_i est le coefficient directeur des droites :

$$R_{i_{obs}} = \frac{1}{T_{i_{obs}}} = f([Gd^{3+}]).$$

La détermination de r_1 (relaxivité longitudinale) et r_2 (relaxivité transversale) permet de comparer le potentiel des agents de contraste à rehausser le contraste positif ou négatif des images IRM. Dans le cas d'un agent de contraste positif (en général à base de gadolinium), le rapport r_2/r_1 est proche de 1 et l'agent est d'autant plus performant que r_1 est élevé.

A partir de la figure 2.15, nous en déduisons les valeurs de r_1 et r_2 des deux types de nanoparticules ainsi que le rapport r_2/r_1 (tableau 2.5).

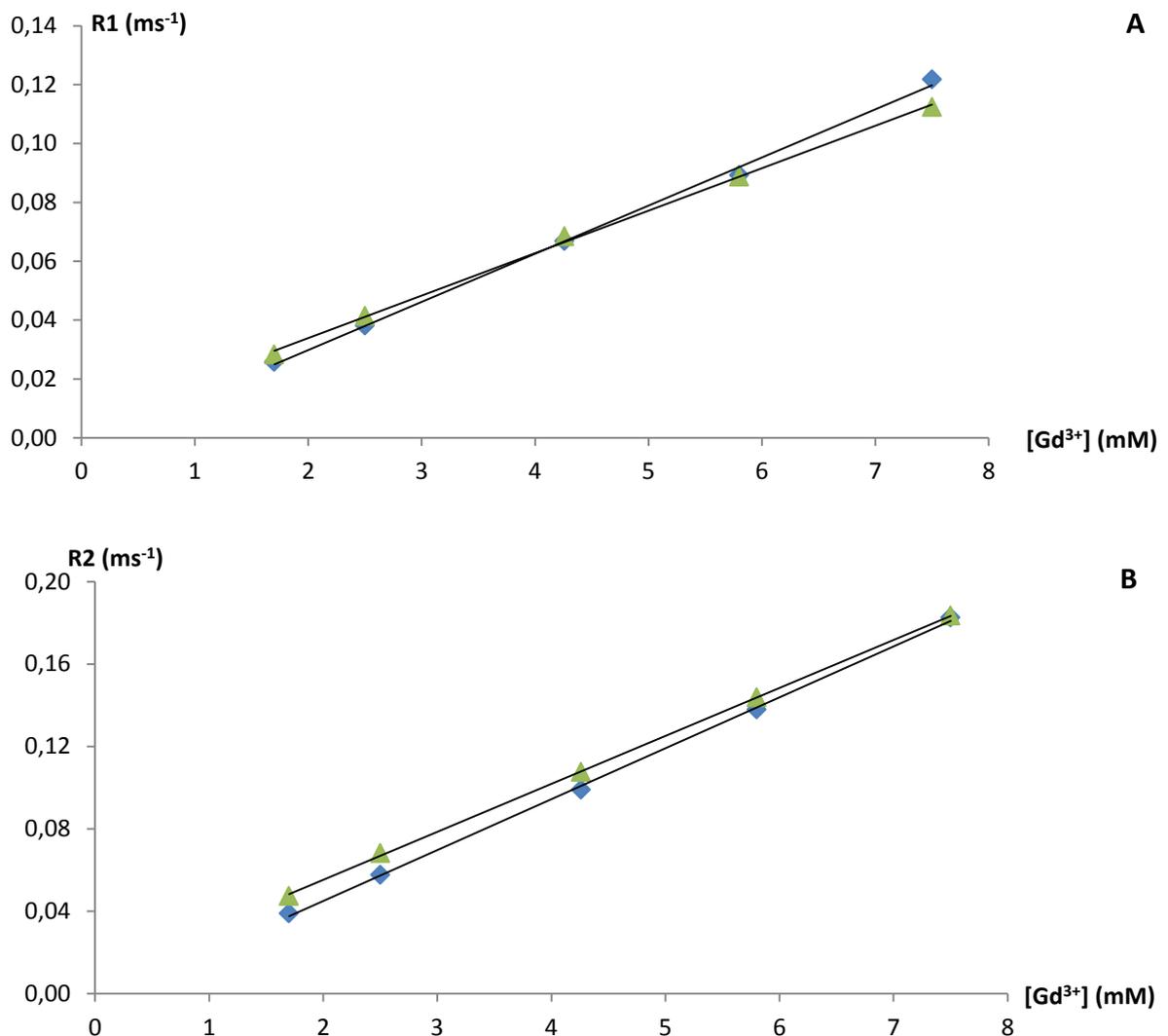


Figure 2.15 Courbes du taux de relaxation longitudinale R1 (A) et transversale R2 (B) en fonction de la concentration en gadolinium pour les suspensions Au@TADOTA (bleu) et Au@TADOTAGA (vert)

Tableau 2.5 Calcul des relaxivités longitudinales (r_1) et transversales (r_2) ainsi que du rapport r_2/r_1 pour le Dotarem® et les suspensions de nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA

Particules	r_1 60 MHz ($s^{-1}.mM^{-1}$)	r_2 60 MHz ($s^{-1}.mM^{-1}$)	r_2/r_1
Au@TADOTA	16,4	24,7	1,50
Au@TADOTAGA	14,4	23,3	1,62
Dotarem®	2,9	3,2	1,10

Puisque le rapport r_2/r_1 est compris entre 1 et 1,6, les deux types de nanoparticules devraient se comporter comme des agents de contraste positif. Cela est cohérent étant donné la nature paramagnétique du gadolinium. L'imagerie IRM avec les deux types de suspensions devra donc être réalisée en pondération T_1 . Sous cette condition, le paramètre rendant compte de l'aptitude de l'agent à rehausser le contraste positif est la relaxivité longitudinale (r_1). Celle-ci présente des valeurs importantes, largement supérieures à celle du Dotarem (amélioration d'un facteur 5 à 6). Les nanoparticules présentent donc une forte valeur ajoutée en tant qu'agent de contraste pour l'IRM par rapport à l'agent de contraste moléculaire utilisé en routine en imagerie clinique. Le type de nanoparticules montrant le plus de potentiel semble être Au@TADOTA puis Au@TADOTAGA. Ces deux suspensions montrent donc un fort potentiel en tant qu'agent de contraste positif pour l'IRM.

En plus de jouer le rôle d'agent de contraste pour l'IRM, les nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA ont également été conçues pour être suivies par imagerie nucléaire TEMP ou TEP. Les radiomarquages par l'indium-111 (pour l'imagerie TEMP) des nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA ainsi que le radiomarquage des nanoparticules Au@TADOTAGA par le cuivre-64 (pour l'imagerie TEP) ont été réalisés. Les radiochromatogrammes indiquent la complexation totale de l'indium et une très faible quantité de cuivre libre (figure 2.16). La pureté radiochimique (97 % pour le cuivre-64 et 100 % pour l'indium-111) permet donc une utilisation des nanoparticules *in vivo* pour le suivi par imagerie TEMP ou TEP.

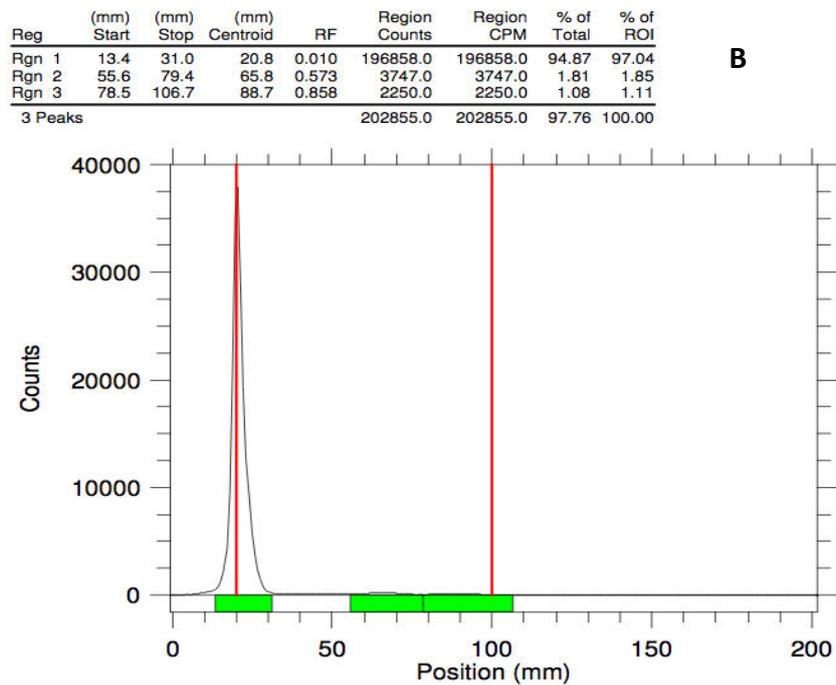
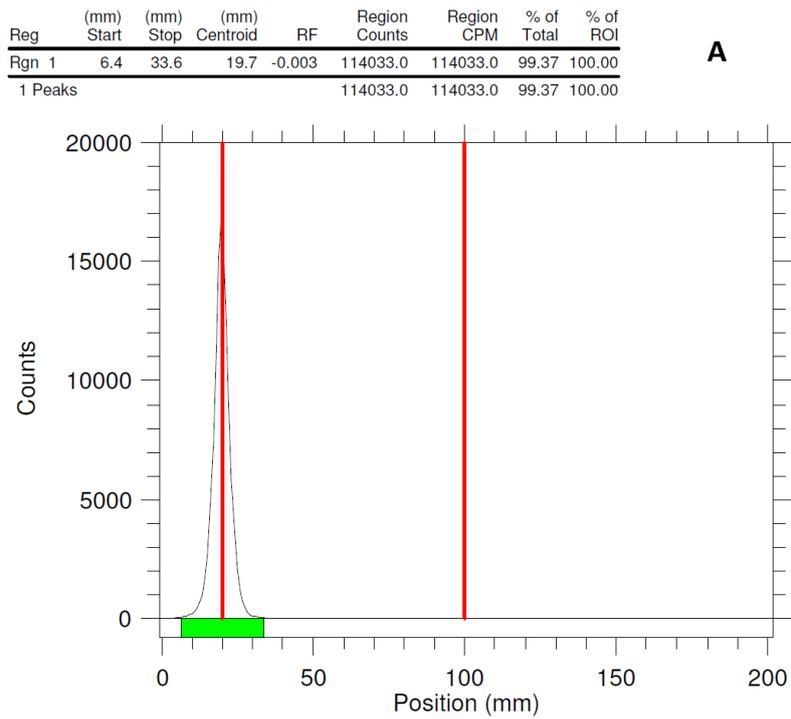


Figure 2.16 : Radiochromatogrammes du marquage des nanoparticules par l'indium-111 (A) et par le cuivre-64 (B)

2.5. Bilan

Différentes nanoparticules ont été synthétisées en se basant sur les nanoparticules Au@DTDTPA, en remplaçant notamment la couche organique. En raison de leur taille, de la stabilité colloïdale des suspensions, de leur capacité à immobiliser l'ion Gd^{3+} et par conséquent à rehausser le contraste positif des images IRM, deux types de nanoparticules ont attiré notre attention. Le premier type de nanoparticule, Au@TADOTA, montre des caractéristiques très proches de celles du modèle avec un diamètre du cœur d'or de 2,3 nm, d'un diamètre hydrodynamique d'environ 6,4 nm et une couche organique constituée de 85 ligands. Le deuxième type de nanoparticules, Au@TADOTAGA, présente les mêmes caractéristiques, notamment de taille, que les nanoparticules Au@TADOTA. Néanmoins, la couche organique est légèrement différente dans sa composition avec la présence d'une fonction acide carboxylique supplémentaire à proximité du DOTA de manière à améliorer potentiellement la stabilité colloïdale et la complexation des différents éléments pour l'imagerie.

En effet, en plus de permettre une stabilité colloïdale sur toute la gamme de pH pour les deux types de nanoparticule ainsi qu'une stabilité en condition biologique simulée pendant plus de deux mois, la couche organique permet de complexer du gadolinium et des radionucléides. Il est donc *à priori* possible de les suivre par imagerie IRM, SPECT et TEP, avec un potentiel important pour l'IRM en raison d'une relaxivité longitudinale relativement élevée en comparaison du Dotarem.

L'aptitude de ces suspensions de nanoparticules à être suivies par les différentes techniques d'imagerie (SPECT, TEP, IRM) permettra d'étudier leur biodistribution qui doit être évaluée afin de vérifier qu'elles sont adaptées pour une application *in vivo*, et en particulier pour la radiothérapie guidée par imagerie qui constitue le but principal de ce travail.

Références

- [1] A.M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas, W.D. James, R.A. Drezek, J.L. West, Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1929–1934.
- [2] L.R. Hirsch, R.J. Stafford, J.A. Bankson, S.R. Sershen, B. Rivera, R.E. Price, J.D. Hazle, N.J. Halas, J.L. West, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (2003) 13549–13554.
- [3] P. Huang, L. Bao, C. Zhang, J. Lin, T. Luo, D. Yang, M. He, Z. Li, G. Gao, B. Gao, S. Fu, D. Cui, Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy, *Biomaterials*, 32 (2011) 9796–9809.
- [4] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, T.M. Focella, H.M. Smilowitz, Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *Br. J. Radiol.*, 79 (2006) 248–253.
- [5] K.T. Butterworth, S.J. McMahon, F.J. Currell, K.M. Prise, Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization, *Nanoscale*, 4 (2012) 4830–4838.
- [6] C. Alric, J. Taleb, G.L. Duc, C. Mandon, C. Billotey, A.L. Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging, *J Am Chem Soc*, 130 (2008) 5908–5915.
- [7] C. Alric, I. Miladi, D. Kryza, J. Taleb, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance, *Nanoscale*, 5 (2013) 5930–5939.
- [8] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 10 (2014) 1116–1124.
- [9] J.L. Abraham, C. Thakral, L. Skov, K. Rossen, P. Marckmann, Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis, *Br. J. Dermatol.*, 158 (2008) 273–280.
- [10] W.A. High, R.A. Ayers, J. Chandler, G. Zito, S.E. Cowper, Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 56 (2007) 21–26.
- [11] M.A. Sieber, H. Pietsch, J. Walter, W. Haider, T. Frenzel, H.-J. Weinmann, A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media, *Invest. Radiol.*, 43 (2008) 65–75.
- [12] P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M.B. Damholt, J.G. Heaf, H.S. Thomsen, Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, 17 (2006) 2359–2362.
- [13] G. Schuhmann-Giampieri, G. Krestin, Pharmacokinetics of Gd-DTPA in patients with chronic renal failure, *Invest. Radiol.*, 26 (1991) 975–979.

- [14] V. Mogilireddy, I. Déchamps-Olivier, C. Alric, G. Laurent, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, R. Bazzi, S. Roux, O. Tillement, F. Chuburu, Thermodynamic stability and kinetic inertness of a Gd–DTPA bisamide complex grafted onto gold nanoparticles, *Contrast Media Mol. Imaging*, (2014)
- [15] M. Magerstädt, O.A. Gansow, M.W. Brechbiel, D. Colcher, L. Baltzer, R.H. Knop, M.E. Girton, M. Naegele, Gd(DOTA): An alternative to Gd(DTPA) as a T_{1,2} relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy, *Magn. Reson. Med.*, 3 (1986) 808–812.
- [16] R.H. Knop, J.A. Frank, A.J. Dwyer, M.E. Girton, M. Naegele, M. Schrader, J. Cobb, O. Gansow, M. Maegerstadt, M. Brechbiel, Gadolinium cryptelates as MR contrast agents, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 11 (1987) 35–42.
- [17] P.-J. Debouttière, S. Roux, F. Vocanson, C. Billotey, O. Beuf, A. Favre-Réguillon, Y. Lin, S. Pellet-Rostaing, R. Lamartine, P. Perriat, O. Tillement, Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, 16 (2006) 2330–2339.
- [18] S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol, *Langmuir*, 21 (2005) 2526–2536.
- [19] Z. Li, R. Jin, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates, *Nucleic Acids Res.*, 30 (2002) 1558–1562.
- [20] B. Garcia, M. Salome, L. Lemelle, J.-L. Bridot, P. Gillet, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, (2005) 369–371.
- [21] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1995) 1655.
- [22] A. Roch, R.N. Muller, P. Gillis, Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles, *J. Chem. Phys.*, 110 (1999) 5403–5411.
- [23] P. Gillis, F. Moïny, R.A. Brooks, On T₂-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model, *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.*, 47 (2002) 257–263.
- [24] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2064–2110.
- [25] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 4215–4221.
- [26] S. Link, M.A. El-Sayed, Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*, 103 (1999) 4212–4217.
- [27] A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio, F. Fedeli, How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates A technical note, *Contrast Media Mol. Imaging*, 1 (2006) 184–188.

- [28] C. Alric, Synthèse et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie LPCML Lyon 1, (2012).
- [29] L. Helm, Relaxivity in paramagnetic systems: Theory and mechanisms, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 49 (2006) 45–64.

Chapitre 3. Nanoparticules pour l'imagerie médicale

3.1.	Introduction.....	101
3.2.	Agent de contraste pour l'imagerie nucléaire TEMP	102
3.2.1.	Protocole.....	102
3.2.1.1.	Animaux.....	102
3.2.1.2.	TEMP/CT	102
3.2.1.3.	Biodistribution ex vivo	103
3.2.1.4.	Analyse ICP-EOS.....	103
3.2.2.	Résultats et discussion.....	104
3.3.	Agent de contraste pour l'IRM	110
3.3.1.	Protocole.....	110
3.3.1.1.	Animaux.....	110
3.3.1.2.	IRM.....	110
3.3.2.	Résultats et discussion.....	111
3.4.	Agent de contraste bimodal TEP/IRM.....	115
3.4.1.	Protocole.....	115
3.4.1.1.	Animaux.....	115
3.4.1.2.	TEP/IRM	116
3.4.1.3.	Analyse ICP	116
3.4.2.	Résultats et discussion.....	116
3.5.	Bilan.....	122

3.1. Introduction

Nous avons montré que les nanoparticules Au@TADOTA et Au@TADOTAGA présentaient la possibilité de complexer du gadolinium et des radionucléides (Cuivre-64 et Indium-111). De plus, la pureté radiochimique est très élevée concernant la complexation des radioisotopes, et la relaxivité des deux suspensions de nanoparticules est nettement supérieure à celle du Dotarem® utilisé couramment en clinique comme agent de contraste pour l'IRM. Nous nous attendons donc à pouvoir suivre ces nano-objets par IRM (grâce au gadolinium) et imagerie nucléaire TEMP (grâce à l'indium-111) ou TEP (grâce au cuivre-64).

Chacune de ces techniques d'imagerie, présentent un intérêt propre. En effet, l'imagerie nucléaire TEMP ou TEP permet de réaliser une image du corps entier avec une grande sensibilité et permet donc de donner des informations sur la biodistribution des nano-objets. Le comportement des nanoparticules après injection peut être ainsi étudié, notamment sur le plan de l'élimination rénale, de l'accumulation dans la tumeur et de la libre circulation sans accumulation indésirable dans les tissus sains. La technique d'IRM, facile à mettre en œuvre (ne nécessite pas de radiomarquage), présente l'avantage d'être non ionisante. En outre, ce procédé d'imagerie est caractérisé par une très bonne résolution (10-100 μm).

Néanmoins, ces techniques présentent chacune leurs inconvénients. Effectivement, l'IRM manque de sensibilité et l'imagerie nucléaire manque de résolution. Il serait alors intéressant de combiner ces deux techniques d'imagerie afin de bénéficier de l'excellente résolution de l'IRM et de l'extrême sensibilité de l'imagerie nucléaire. Ces deux techniques combinées compenseraient chacune leurs défauts tout en combinant leurs avantages. Les nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA pourraient être une plateforme prometteuse pour réaliser une imagerie bimodale TEP/IRM.

Pour confirmer le potentiel de ces nanoparticules comme agent de contraste pour l'IRM ou l'imagerie nucléaire et comme agent de contraste bimodal (TEP/IRM) tout en étudiant leur comportement après injection intraveineuse, plusieurs expériences d'imagerie ont été réalisées.

3.2. Agent de contraste pour l'imagerie nucléaire TEMP

3.2.1. Protocole

3.2.1.1. Animaux

Pour cette étude, des souris NMRI nude femelles âgées de six semaines sont utilisées. Les cellules tumorales U87-MG (lignée de glioblastome) sont implantées par injection sous cutanée sur le flanc à raison de $5 \cdot 10^7$ cellules (dans 200 μ L de PBS). L'implantation est réalisée sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4% pour l'induction puis 2%). Après cinq semaines de croissance tumorale, les souris reçoivent une injection intra-veineuse de 100 μ L d'une suspension de nanoparticule Au@X-¹¹¹In (3 souris pas type de nanoparticules). L'activité injectée pour la suspension Au@TADOTA est de 4,56 MBq et pour la suspension Au@TADOTAGA de 14,96 MBq. Les images ne permettent donc pas, de comparer directement la biodistribution entre des différentes suspensions.

3.2.1.2. TEMP/CT

L'imagerie TEMP/CT a été réalisée 1, 4, 24 et 72 heures après l'injection des nanoparticules à l'aide d'un système NanoSPECT/CT® (Bioscan). L'imagerie des souris est réalisée sous anesthésie gazeuse (isoflurane). L'acquisition CT (55kVp, 34 mAs) est réalisée pendant 10-12 minutes et suivie par l'acquisition TEMP pendant 15-45 minutes.

La fusion des images TEMP et CT a été obtenue en utilisant le logiciel InVivoScope. La quantification a été réalisée par une calibration précise de la gamma camera. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée.

3.2.1.3. Biodistribution ex vivo

L'étude *ex vivo* de la biodistribution des nanoparticules a été réalisée par mesure de la quantité d'or présente dans les différents organes de souris ayant reçu une injection de nanoparticules appartenant aux mêmes lots que ceux utilisés pour l'imagerie mais sans radionucléide (Au@X). Après dissolution des organes et des nanoparticules qu'ils contenaient, la quantité d'or a été évaluée par ICP-OES.

La quantification des nanoparticules présentes dans les organes a également été déterminée par la mesure de l'activité, à l'aide d'un compteur gamma Cobra 418 (Perkin Elmer), des différents organes d'intérêt prélevés sur les animaux étudiés en imagerie.

3.2.1.4. Analyse ICP-EOS

Les différents organes prélevés sont minéralisés par de l'eau régale à chaud dans des tubes de minéralisation jaugés (DigiTUBEs, SCP Sciences). Les tubes sont placés dans un bloc de minéralisation (Digiprep, SCP science) de manière à atteindre une température de 120°C jusqu'à dissolution complète des organes. Le volume est complété jusqu'au trait de jauge (50 mL) avec de l'acide nitrique 5 %. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22 µm pour supprimer d'éventuels résidus.

L'échantillon est ensuite analysé par un ICP-OES modèle 710 ES (Varian/Agilent) à torche axiale, avec nébuliseur concentrique et une chambre de nébulisation cyclonique. Les paramètres utilisés sont les suivants : une puissance de 1,2 kW avec un débit d'argon plasmagène de 15 L.min⁻¹ et d'argon auxiliaire de 1,5 L.min⁻¹ et enfin une pression du nébuliseur de 200 kPa. Les raies d'émission choisies pour la mesure de concentration en or sont 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm.

3.2.2. Résultats et discussion

Suite au radiomarquage des nanoparticules par l'indium-111, l'acquisition d'images TEMP/CT à 1h, 4h, 24h et 72h a été réalisée afin de vérifier l'aptitude de ces nano-objets à exercer le rôle de radiotraceur pour la TEMP et d'étudier leur biodistribution. Les images des souris après injections des suspensions de nanoparticules Au@TADOTAGA (figure 3.1) et Au@TADOTA (figure 3.2) montrent dans un premier temps une radioactivité importante dans différents organes indiquant la présence des nanoparticules dans ceux-ci.

De manière générale, les deux types de suspensions présentent une biodistribution similaire. Nous pouvons remarquer que les nanoparticules sont localisées en majeure partie dans la vessie et dans les reins de manière passagère. En effet, la quantité de nanoparticules dans ces organes semble diminuer au cours du temps jusqu'à devenir très faible à 72h. Les nanoparticules circulent donc, à priori, correctement dans le sang et sont éliminées par la voie rénale.

Néanmoins, nous pouvons remarquer une présence des nanoparticules dans le foie nettement visible 24h après injection et qui semble perdurer jusqu'à 72h. L'absence de nanoparticules dans le foie au cours des premières heures indique une capture hépatique qui ne serait pas causée par une opsonisation. Auquel cas, la quasi-totalité des nanoparticules se serait accumulée dans le foie dès les premiers instants (quelques minutes)[1][2]. Ce comportement inattendu pourrait résulter d'une agglomération des nanoparticules provoquée par leur modification au cours du temps. Les nano-objets seraient alors potentiellement captés par les macrophages au cours du temps.

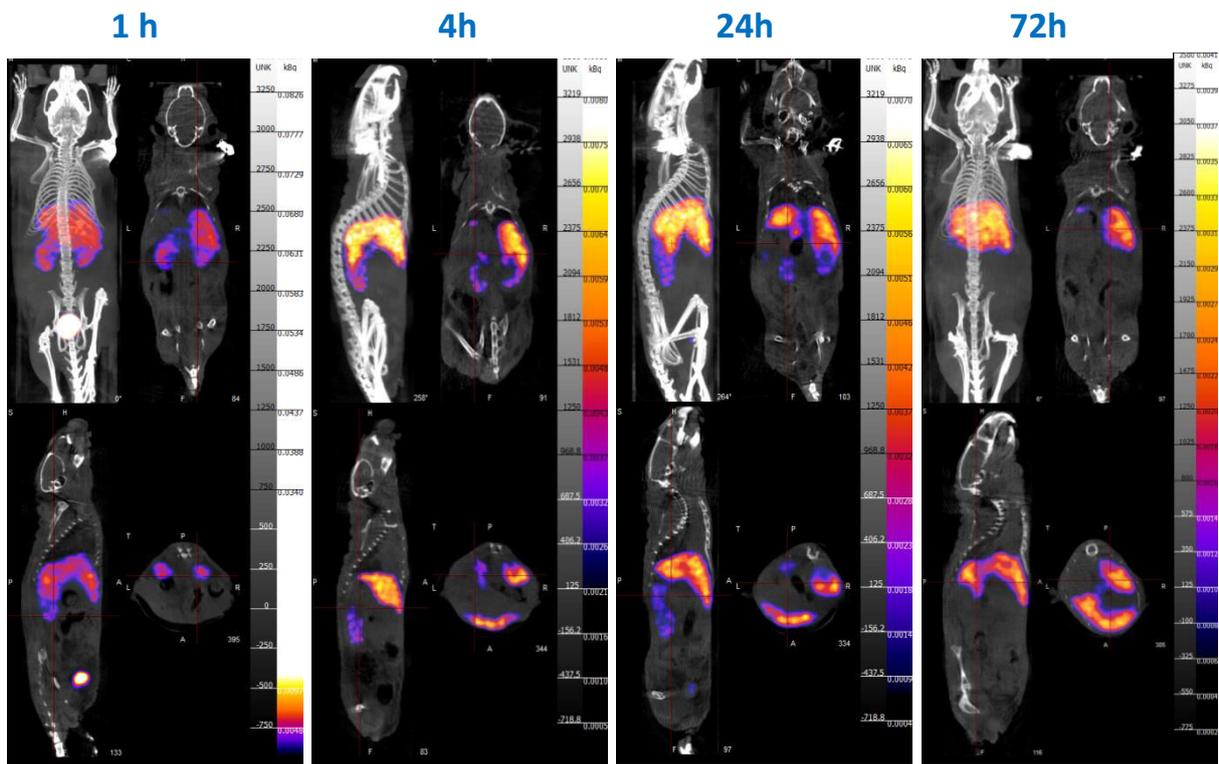


Figure 3.1 Clichés TEMP/CT représentant l'évolution de la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTAGA au cours du temps (1h, 4h, 24h et 72h)

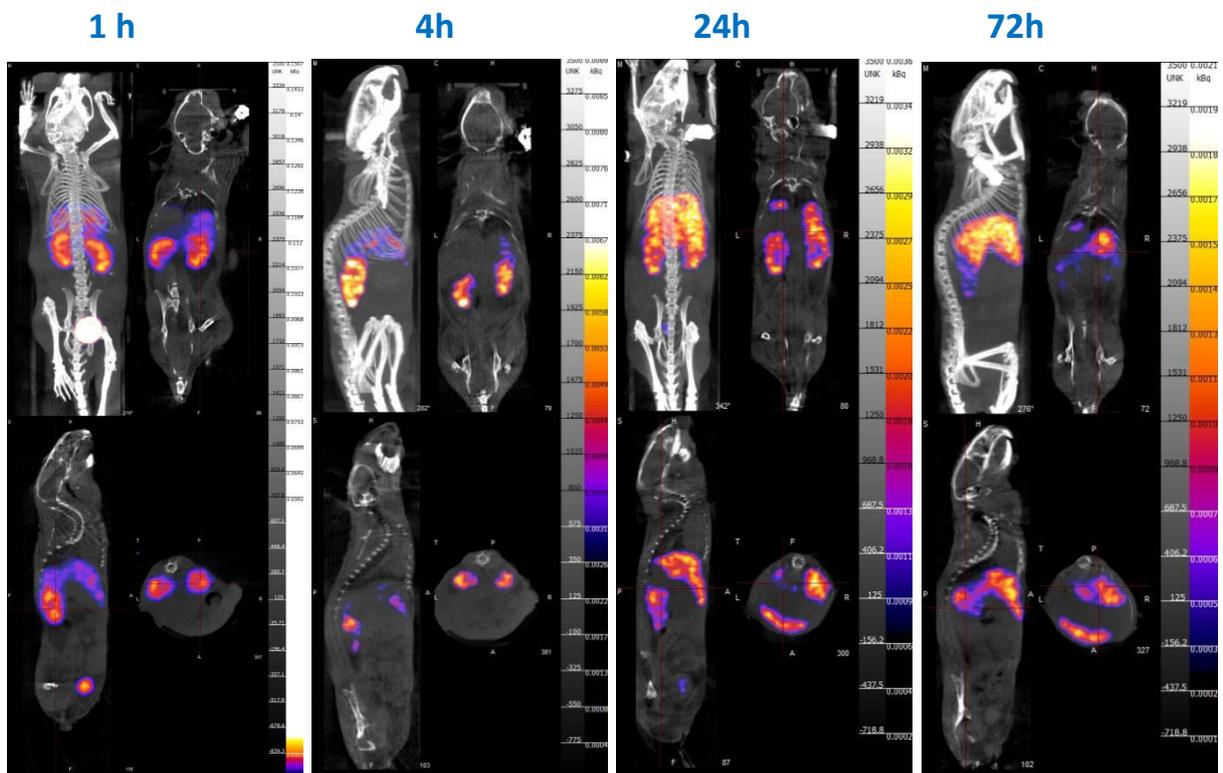


Figure 3.2 Clichés TEMP/CT représentant l'évolution de la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTA au cours du temps (1h, 4h, 24h et 72h)

A partir de l'image, il est possible de déterminer l'activité par unité de volume. Elle est reliée à la quantité de nanoparticules radiomarquées dans le volume des organes étudié. Rapportée à l'activité de la dose injectée et normalisée à la masse des organes, il est ainsi possible, à partir des images acquises à différents temps, de déterminer et de quantifier la distribution des nanoparticules radiomarquées dans l'organisme après injection intraveineuse.

Les données fournies par le traitement des images sont pertinentes. En effet, celles-ci sont en assez bon accord avec les données obtenues par un comptage gamma post-mortem des organes (figure 3.3). Nous pouvons remarquer que les résultats sont similaires avec une erreur acceptable variant de 20 à 30%.

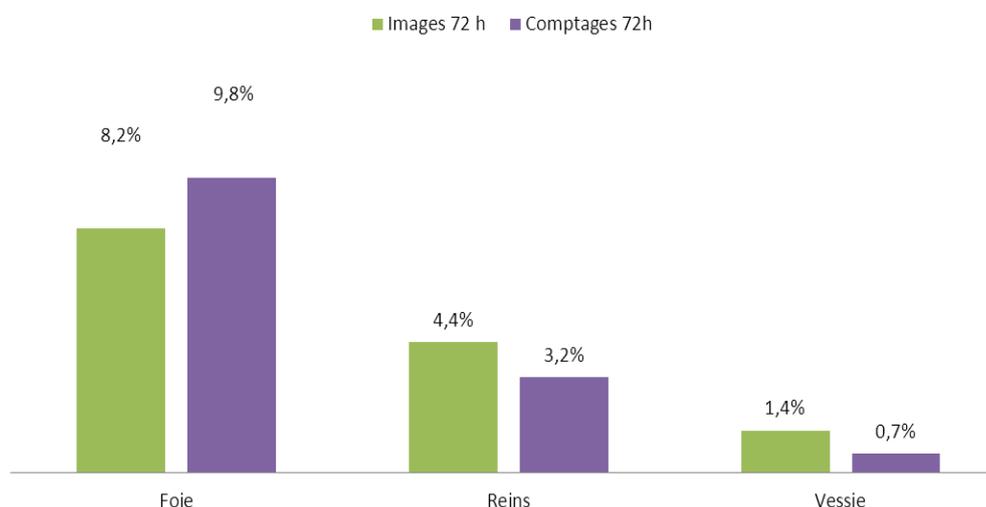


Figure 3.3 Comparaison des mesures du pourcentage de l'activité rapportée à la masse des organes réalisée par traitement de l'image et par comptage gamma 72h après injection des nanoparticules Au@TADOTAGA-In¹¹¹

L'étude de la biodistribution de Au@TADOTAGA (similaire à celle de Au@TADOTA) (figure 3.4) indique dans un premier temps que la quantité des nanoparticules dans le foie reste modérée (~ 8 %) par rapport à ce que l'on peut voir dans la littérature [3][4][5]. De plus cette quantité est inférieure à celle dans les reins, exceptée à 72h après l'injection en raison du différentiel d'élimination entre la voie rénale et hépatobiliaire. Néanmoins, la quantité dans le foie, bien que modérée, reste plus élevée par rapport aux nanoparticules Au@DTDTPA [6]. Il reste donc une marge d'amélioration consistant à limiter la quantité de nanoparticules dans le foie.

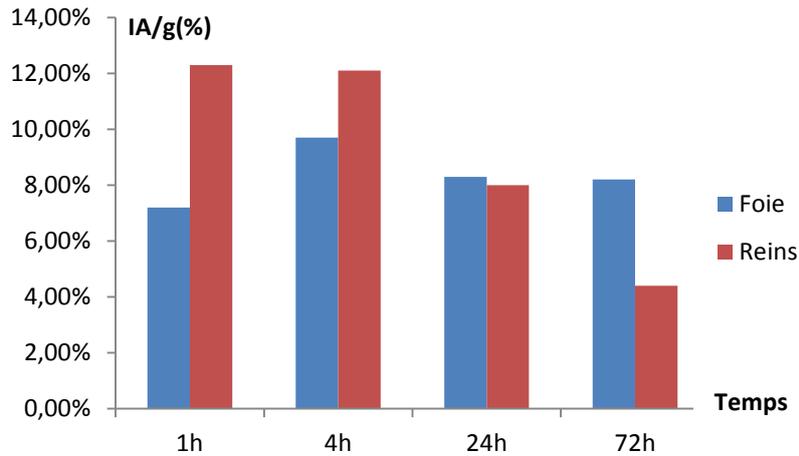


Figure 3.4 Pourcentage de l'activité totale normalisée à la masse des organes, dans le foie (en bleu), les reins (en rouge) pour une souris ayant reçu l'injection de nanoparticules Au@TADOTAGA-In¹¹¹

La comparaison de la biodistribution moyenne (sur trois souris) des suspensions de nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA 72h post injection par comptage gamma (figure 3.5) indique une similitude entre les nanoparticules.

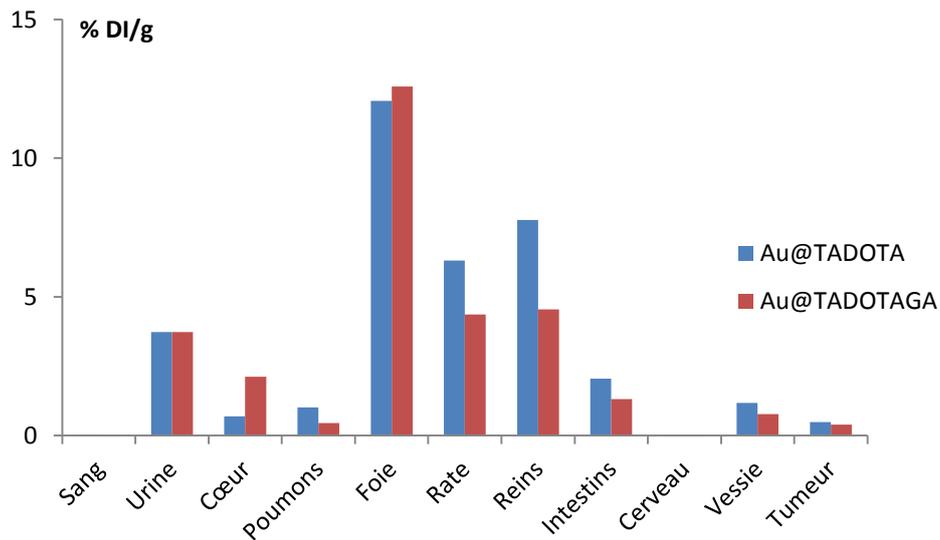
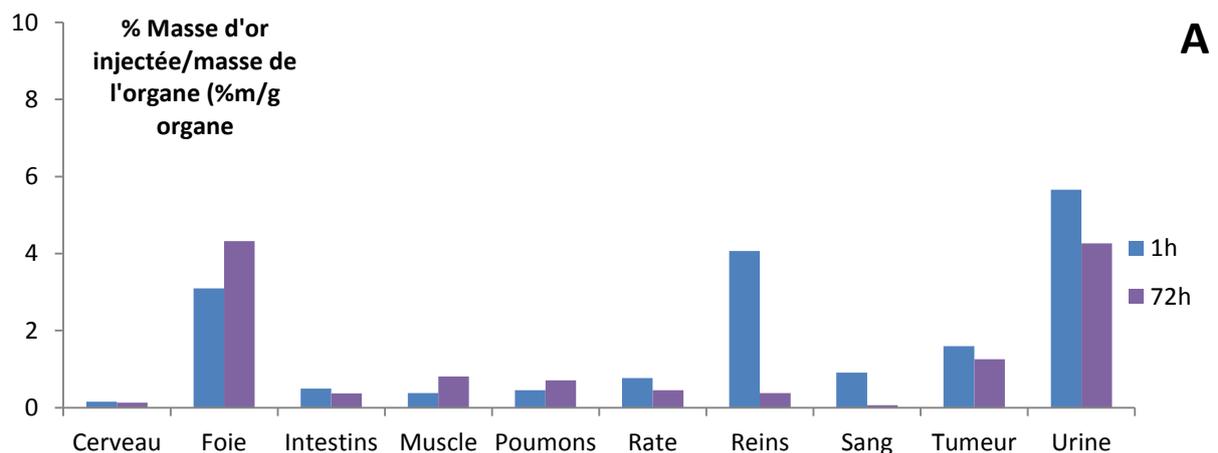


Figure 3.5 Comparaison de la biodistribution 72h après injection des suspensions Au@TADOTA (bleu) et Au@TADOTAGA (rouge) par comptage gamma

De manière générale, les nanoparticules se trouvent en quantité non négligeable dans le foie, les reins et l'urine comme remarqué précédemment. Nous pouvons aussi noter une quantité non négligeable dans la rate qui peut s'expliquer de la même manière que l'accumulation hépatique. Cependant, nous pouvons remarquer que la quantité de nanoparticules dans la tumeur est négligeable pour les deux suspensions. Les nanoparticules ne se sont donc pas accumulées au sein de la tumeur. Il est envisageable que ces nano-objets ne soient pas adaptés pour le traitement de ce type de tumeur (glioblastome) en raison de la physiologie tumorale, notamment au niveau de la vascularisation.

L'étude de biodistribution a été réalisée en parallèle par dosage de la quantité d'or dans les organes des animaux ayant reçu le même lot de nanoparticules Au@X (figure 3.6) sans radionucléides de manière à confirmer l'étude de biodistribution par imagerie et afin de vérifier que le radiomarquage ne modifie pas le comportement des nano-objets. En raison de problème technique lors de l'étude, seulement la biodistribution à 1h et 72h pour les nanoparticules Au@TADOTAGA et la biodistribution à 1h et 24h pour Au@TADOTA seront étudiées.



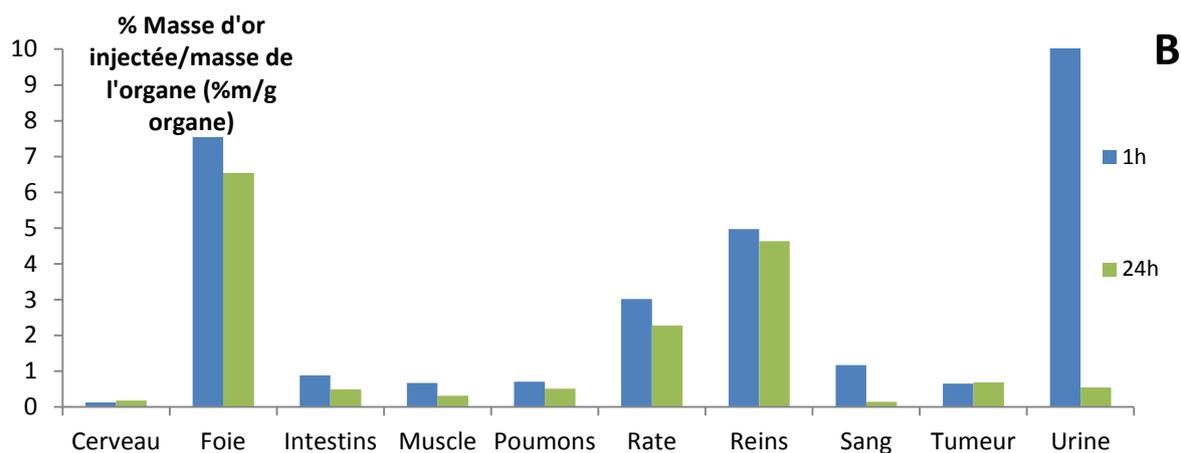


Figure 3.6 Biodistribution par dosage ICP de l'or contenue dans les organes d'intérêts 1h (en bleu), 24h (en vert) et 72h (en violet) des souris ayant reçu une injection des nanoparticules Au@TADOTAGA (A) et Au@TADOTA (B)

De manière générale, nous pouvons noter que les résultats semblent plutôt cohérents avec ceux observés par imagerie. Nous pouvons remarquer une quantité de nanoparticules non négligeable dans le foie, les reins ainsi que la rate. La quantité dans le foie et dans les reins sont similaires à ce que l'on a pu observer précédemment. En outre, la quantité de nanoparticules dans la tumeur reste négligeable exceptée pour la suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA qui semble présenter une légère accumulation et se démarque ainsi de la suspension Au@TADOTA.

Il en ressort globalement que la biodistribution des différentes nanoparticules étudiées par imagerie et analyse *ex vivo* sont proches indiquant une co-localisation de l'or et des radionucléides. A priori, la présence de l'indium-111 ainsi que sa méthode de greffage ne modifie pas ou peu le comportement des nanoparticules.

Ces deux types de nanoparticules montrent une biodistribution adaptée mise à part la faible (pour Au@TADOTAGA) ou l'absence d'accumulation (pour Au@TADOTA) dans la tumeur. En effet, l'élimination rénale qui est un point primordial pour l'utilisation de ces nano-objets est vérifiée et la présence dans le foie reste modérée. Cela nous encourage à continuer en se focalisant sur l'accumulation tumorale. Pour cela, une étude par IRM focalisée sur le cerveau serait intéressante pour vérifier l'accumulation au sein de la tumeur d'intérêt, le gliosarcome 9L.

3.3. Agent de contraste pour l'IRM

3.3.1. Protocole

3.3.1.1. Animaux

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire a été réalisée sur des rats mâles Fisher âgés de 10 semaines. Des cellules tumorales 9LGS (gliosarcome de rat) sont implantées par injection stéréotaxique de 10^4 cellules (dans 1 μ L de DMEM + 1% pénicilline/streptomycine) dans le noyau caudé (3,5 mm à droite de la Bregma, 6 mm de profondeur). Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange Ketamine (5,4 mg/kg) / xylazine (64,5 mg/kg) [7][8]. Les rats reçoivent, 9-10 jours après l'implantation, une injection intraveineuse (veine saphène) de suspensions de nanoparticules Au@X-Gd³⁺ (0,7 mL à 50 mM en or et 5 mM en gadolinium).

Le choix d'utiliser des rats ou des souris selon l'étude s'explique par des raisons pratiques. Selon la modalité d'imagerie, il peut être plus aisé de travailler avec des souris qu'avec des rats, notamment pour la TEMP. En effet, il est possible de réaliser une seule acquisition avec trois souris, permettant ainsi de tester plusieurs modalités en même temps. Concernant le choix des tumeurs, la faible taille du cerveau des souris rend difficile l'inoculation d'un gliosarcome 9L, c'est pourquoi nous travaillons avec des tumeurs différentes dans le cas des études sur souris. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'objectif est de traiter une tumeur radiorésistante dans un organe radiosensible, le gliosarcome.

3.3.1.2. IRM

L'acquisition des images IRM a été réalisée à l'aide d'un système IRM Biospec 70/20 (Brucker) opérant à 7 Tesla.

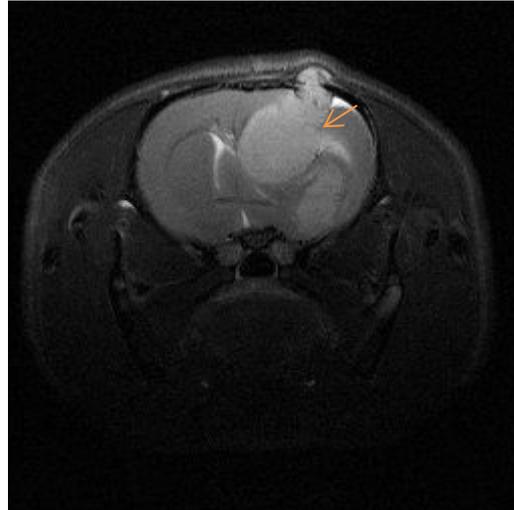
Les images anatomiques T₂ ont été acquises grâce à une séquence IRM turbo-RARE (TR/TE= 2500/40ms, NA=2,17 coupes avec FOV =3,3 cm et un taille de voxel = 117x117x1000 μ m, matrice 256x256).

La visualisation de l'augmentation du contraste en pondération T_1 a été effectuée à l'aide d'une séquence RARE (TR/TE = 800/5 ms), NA = 4,5 coupes avec FOV = 3,3 cm et une taille de voxel = 234x234x1000 μm (matrice 256x256).

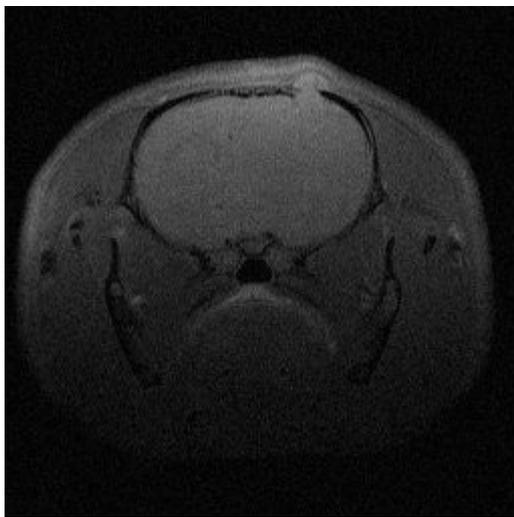
3.3.2. Résultats et discussion

La caractérisation des nanoparticules a montré que ces objets présentaient un fort potentiel pour l'imagerie IRM en pondération T_1 en raison d'une relaxivité longitudinale élevée. L'acquisition d'image IRM en pondération T_1 avant et après injection a donc été réalisée de manière à vérifier la prise de contraste des nanoparticules tout en observant leur localisation. De plus, une image en pondération T_2 a été réalisée de manière à vérifier dans un premier temps la présence de la tumeur et ensuite de connaître sa localisation.

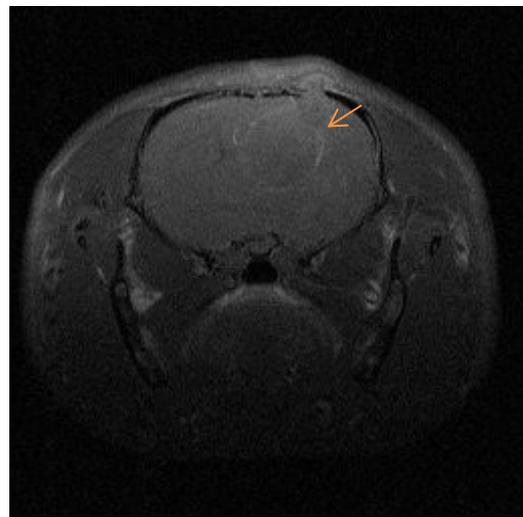
Les images IRM du cerveau pour les nanoparticules Au@TADOTA (figure 3.7) et Au@TADOTAGA (figure 3.8) montrent en pondération T_2 que la tumeur est effectivement présente (dans le lobe droit) et visible contrairement aux images en pondération T_1 avant l'injection des nanoparticules. La comparaison des images avant et après injection (en pondération T_1) met en évidence une augmentation du contraste après injection. Ces objets peuvent donc être suivis par IRM.



Pondération T2

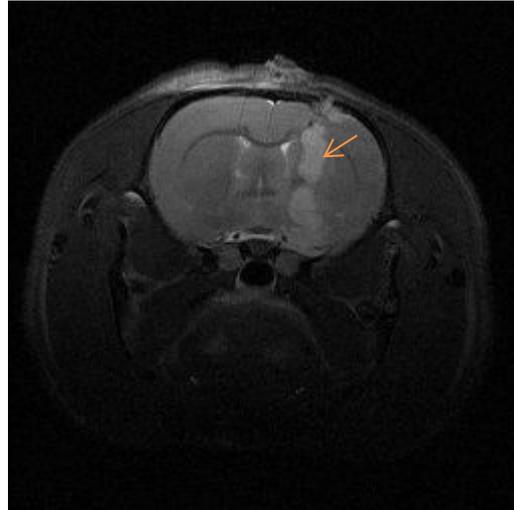


Pondération T1 : Avant injection

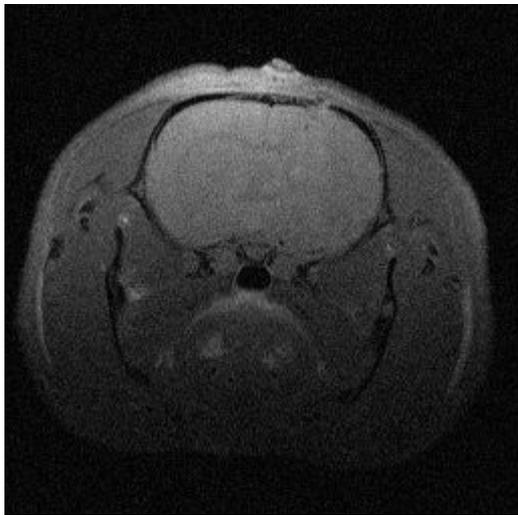


Pondération T1 : Après injection

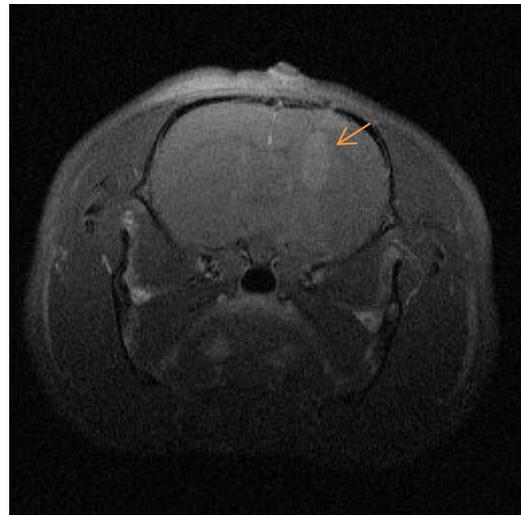
Figure 3.7 Images IRM en pondération T2 avant injection et en pondération T1 avant et après injection de la suspension Au@TADOTA



Pondération T2



Pondération T1 : Avant injection



Pondération T1 : Après injection

Figure 3.8 Images IRM en pondération T2 avant injection et en pondération T1 avant et après injection de la suspension Au@TADOTAGA

Le blanchiment de l'image, caractéristique du rehaussement du contraste positif, concerne les zones différentes d'un type de nanoparticules à un autre. Après injection intraveineuse de nanoparticules Au@TADOTA, le blanchiment apparaît uniquement à la périphérie de la tumeur. Les nanoparticules Au@TADOTA ne semblent pas être capables de s'accumuler dans la tumeur.

Par contre, les images IRM du rat ayant reçu l'injection de nanoparticules Au@TADOTAGA montrent une augmentation du contraste dans la zone tumorale, il y a dans ce cas, un remplissage de la tumeur par la suspension de nanoparticules. Il apparaît donc, une accumulation modérée des nanoparticules Au@TADOTAGA au sein de la tumeur contrairement aux nanoparticules Au@TADOTA qui sont localisées en périphérie. Bien que l'IRM soit beaucoup moins sensible que la TEMP, nous pouvons localiser les nano-objets dans ou autour de la tumeur contrairement à l'étude précédente réalisée par TEMP sur un type de tumeur différent, un glioblastome U87. Cela montre la nécessité de connaître la physiologie de la tumeur à traiter. Il semblerait que ces nanoparticules soient mieux adaptées pour le traitement d'une tumeur de type gliosarcome 9L.

La différence de comportement entre ces deux suspensions, montre l'importance de la couche organique sur la biodistribution tumorale. En effet, l'unique différence entre ces deux nano-objets est la présence d'une fonction acide carboxylique supplémentaire pour les nanoparticules Au@TADOTAGA. La chimie de surface, et notamment la charge dans notre cas, exerce un impact considérable sur l'accumulation dans une tumeur de type gliosarcome 9L.

Ces suspensions colloïdales de nanoparticules peuvent donc effectivement jouer le rôle d'agent de contraste pour l'IRM, bien que l'augmentation de contraste soit modérée. De plus, il y a bien présence des nanoparticules autour ou dans la tumeur par ciblage passif selon les type de nanoparticules.

Les résultats des études d'imagerie IRM, TEMP/CT et ICP indiquent que la suspension ayant le meilleur potentiel pour réaliser de la thérapie guidée par imagerie est celle à base de nanoparticules Au@TADOTAGA en raison d'une accumulation dans le gliosarcome et une élimination rénale sans accumulation importante dans les autres organes.

3.4. Agent de contraste bimodal TEP/IRM

Nous avons montré que les suspensions de nanoparticules possédaient des caractéristiques attrayantes pour être utilisées comme agent de contraste pour l'IRM et comme traceur pour l'imagerie nucléaire. Ces deux techniques présentent une forte complémentarité du fait de la forte sensibilité de l'imagerie nucléaire et de l'excellente résolution de l'IRM. La combinaison de ces deux techniques est donc extrêmement intéressante pour une localisation précise des nano-objets. La suspension de nanoparticules la plus prometteuse au niveau de la biodistribution et de l'accumulation dans la tumeur, Au@TADOTAGA, a donc été testée pour réaliser l'imagerie bimodale TEP/IRM sur le même animal.

3.4.1. Protocole

3.4.1.1. Animaux

Les souris utilisées pour l'étude PET/IRM sont du même type que celles utilisées lors de l'étude SPECT/CT. Le type de tumeur est néanmoins différent. Des cellules tumorales TS/A-pc (carcinome mammaire murin) sont implantées aux souris, par injection sous-cutanée sur le flanc à raison de 10^7 cellules (dans 200 μ L de PBS), sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4% pour l'induction puis 2%). Après 12-14 jours de croissance tumorale, les souris reçoivent une injection intraveineuse de 100 μ L d'une suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA($^{64}\text{Cu-Gd}^{3+}$)(20,60 MBq). Les animaux sont placés dans un lit spécifique adaptable aux deux appareils (IRM et TEP).

3.4.1.2. TEP/IRM

Les animaux sont imagés par un système IRM MRS3000 opérant à 3 Teslas (MR solutions) et appareil TEP BioPET/CT (Bioscan), 30 minutes et 18h-20h après l'injection des nanoparticules. Le rythme respiratoire est suivi afin de compenser les mouvements durant l'acquisition. L'acquisition IRM est réalisée puis, immédiatement après, le lit est déplacé dans le système TEP pour la deuxième modalité d'imagerie. La fusion des images est ensuite réalisée en utilisant le logiciel InVivoScope software (Bioscan).

La visualisation de l'augmentation du contraste en pondération T_1 a été effectuée à l'aide d'une séquence FSE (Fast Spin Echo) (TR/TE = 700/11 ms), NA = 8 coupes avec FOV = 4,0 cm et une matrice 256x256. Le scan TEP (250-700 keV) a été réalisé avec FOV = 4,6 cm.

3.4.1.3. Analyse ICP

La quantité d'or dans les organes d'intérêt a été évaluée par ICP-OES en utilisant les mêmes paramètres que ceux de l'étude précédente, détaillés dans la partie 3.2.1.4.

3.4.2. Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer sur l'image IRM post-injection, un rehaussement du contraste positif dans les reins et plus précisément dans la zone corticale par rapport à l'image acquise avant injection (figure 3.9). En outre, nous observons sur l'image TEP, un signal intense au même endroit. Cette étude confirme bien que ces objets sont éliminés par voie rénale. La fusion de ces deux images mène à une superposition des signaux. L'imagerie multimodale TEP/IRM sur le même animal a donc été réalisée avec succès.

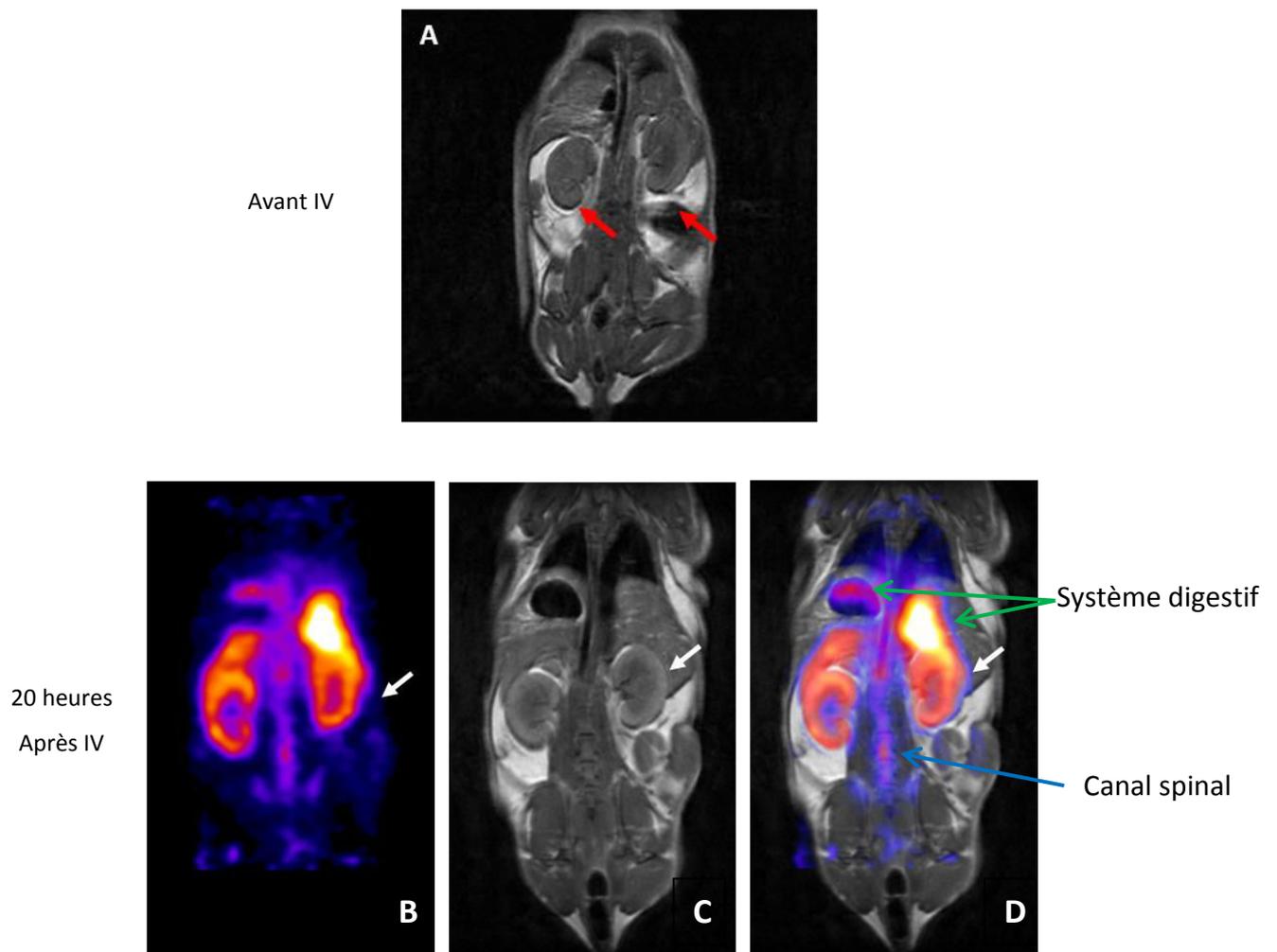


Figure 3.9 Image IRM centrée sur les reins (flèche) avant injection (A) et images centrées sur les reins montrant la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTAGA par TEP (B), IRM (C) et fusion des images B et C : IRM/TEP (D) 20h après injection

Cependant, nous pouvons remarquer sur l'image TEP un signal dans d'autres organes. En premier lieu, un signal est présent au-dessus des reins qui correspond au système digestif (cela peut être le foie, l'estomac et/ou la rate). Ce qui n'est pas étonnant aux vues des résultats de biodistribution précédents. De plus, nous pouvons remarquer du signal au niveau du canal spinal. Cette observation semble indiquer une désorption de cuivre 64. En effet, celui-ci a tendance à s'accumuler au niveau des os et notamment sur la colonne vertébrale [9].

Une deuxième série d'images a été réalisée au niveau de la tumeur (figure 3.10). L'absence de rehaussement de contraste positif en IRM et d'activité en TEP 30 minutes après injection indique que les nanoparticules d'or ne sont pas présentes en nombre suffisant dans la tumeur. Les images réalisées 20h après l'injection intraveineuse paraissent bien plus intéressantes. En effet nous pouvons distinguer, sur l'image IRM, un léger blanchiment (hypersignal) dans la zone tumorale (flèche), comparé à l'image prise 30 minutes après l'injection, qui semblerait indiquer une accumulation modérée au sein de celle-ci au cours du temps. Cette accumulation des nanoparticules Au@TADOTAGA dans la tumeur est clairement confirmée par l'image TEP grâce à la sensibilité importante et surtout sur l'image TEP/IRM qui réunit sensibilité, résolution spatiale et repère anatomique. En outre, un signal significatif est présent au centre de l'image correspondant au sacrum avec en son milieu le canal spinal (entouré en blanc). Il en est de même au niveau du tube digestif (entouré en vert) et du colon contenant des matières fécales (entouré en brun). Ces résultats confirment qu'une partie des nanoparticules sont éliminées par la voie hépatobiliaire.

La présence au niveau des os résulte d'une désorption modérée du radionucléide. Ce qui peut s'expliquer par le fait que les ligands de type DOTA, contrairement au NODA (1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacétate), ne sont pas les mieux adaptés pour former des complexes stables de cuivre(II) [10][11]. Cependant, ces ligands présentent l'avantage par rapport à ceux de type NODA de complexer à la fois les ions Gd^{3+} et Cu^{2+} [12][13]. Des ajustements au niveau du protocole de greffage du cuivre-64 sont donc nécessaires mais ces données sont extrêmement intéressantes pour cette étude préliminaire d'une technique d'imagerie innovante.

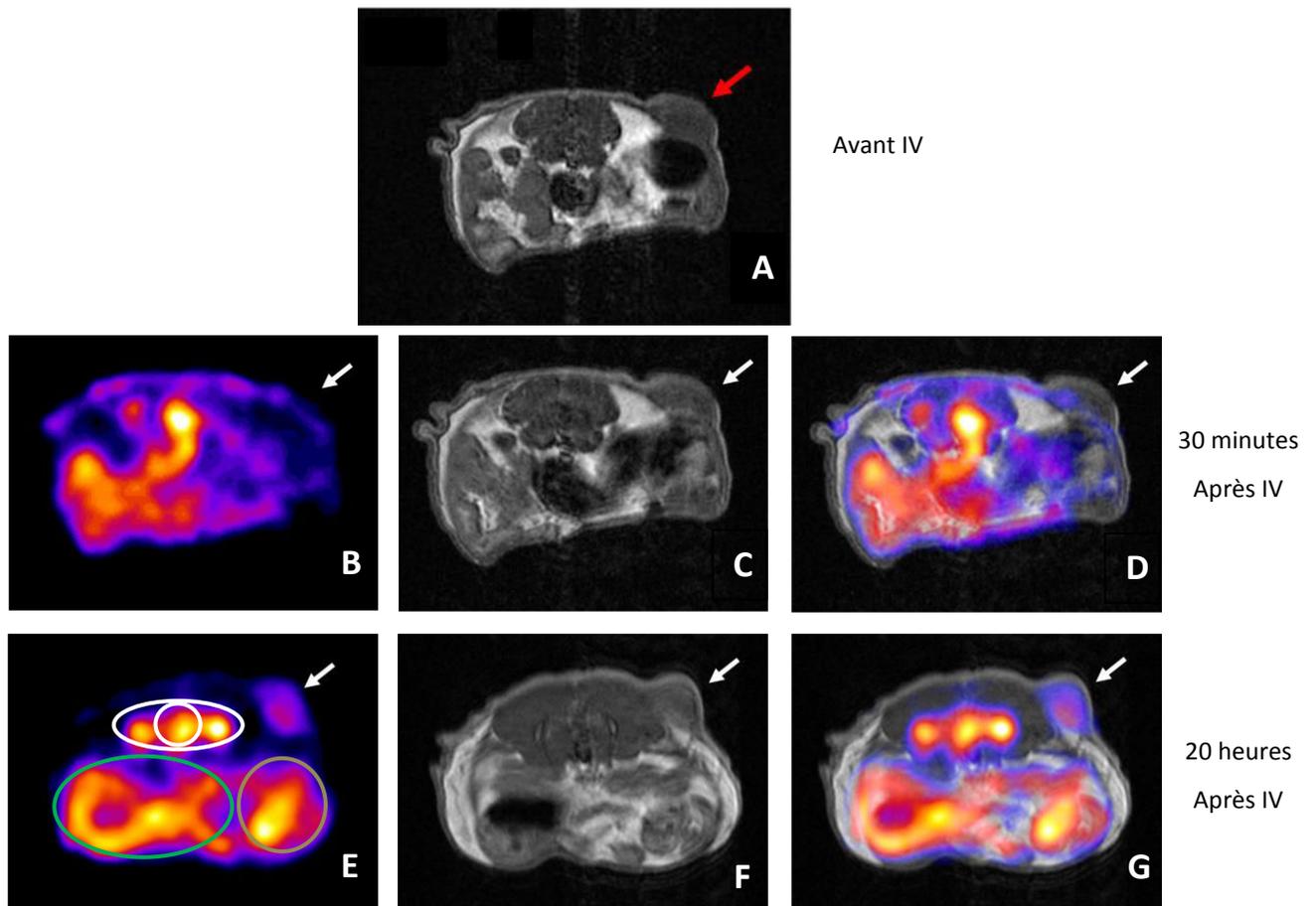


Figure 3.10 Image IRM d'une section incluant la tumeur (flèche) avant (A), 30 minutes (C) et 24h (F) après injection des nanoparticules Au@TADOTAGA. Images TEP acquises 30 minutes (B) et 24h après injection. Fusion des images TEP et IRM B-C (D) et E-F (G)

Le co-marquage des nanoparticules Au@TADOTAGA par le gadolinium et le cuivre-64 permet donc de suivre le comportement des nanoparticules d'or par IRM et TEP après injection intraveineuse sur le même animal. Les images TEP nous indiquent, grâce à l'excellente sensibilité qui caractérise cette modalité d'imagerie, la présence de nanoparticules dans la tumeur mais avec une mauvaise résolution et sans repère anatomique. En raison de sa faible sensibilité, l'imagerie IRM, nous permet de distinguer que très faiblement l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur. Cependant, en raison de sa résolution importante et de la visualisation des repères anatomiques, il est relativement aisé de repérer les différents organes visibles sur la coupe et de délimiter la zone où les nano-objets se trouvent. La fusion de ces deux images prend alors tout son sens et permet de localiser avec précision (sensibilité et résolution) les nanoparticules.

Le comptage gamma des différents organes post-mortem, (figure 3.11) coïncide avec l'image et présente le même comportement que le comptage gamma réalisé lors de l'étude TEMP/CT.

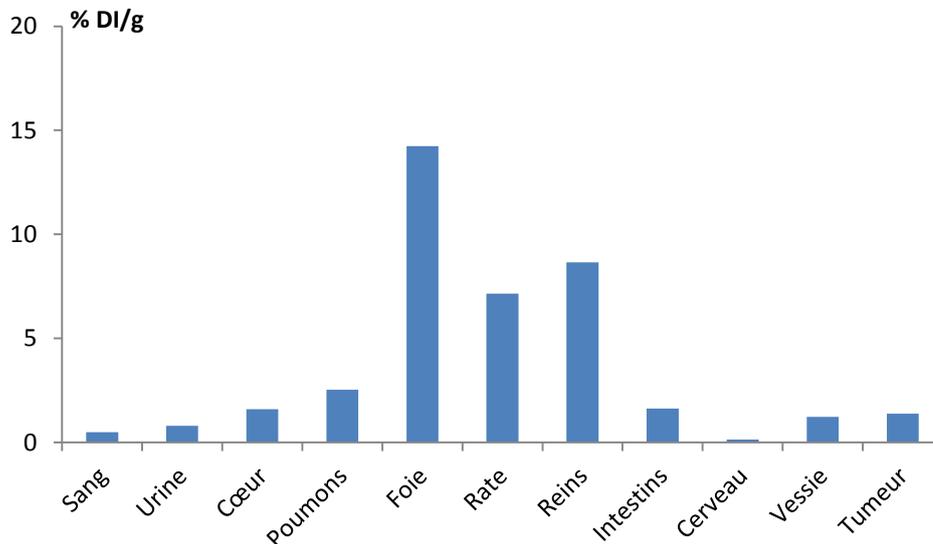


Figure 3.11 Biodistribution 24h après injection de la suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA-⁶⁴Cu par comptage gamma

Afin de vérifier la co-localisation du cuivre-64 (image TEP) et du gadolinium (image IRM) avec l'or, une analyse ICP de l'or dans les différents organes des animaux imagés a été réalisée. Les données qui représentent le pourcentage de masse d'or injectée normalisé à la masse des organes sont cohérentes avec celles de l'étude de biodistribution par comptage gamma (figure 3.12). En effet, l'analyse indique une quantité d'or non négligeable dans le foie, les reins et la rate avec un rapport similaire entre les différents organes. En outre, nous pouvons observer une faible quantité d'or dans la tumeur (0,23 %). La présence de signal dans les différents organes est bien due à la présence des nanoparticules et non du cuivre-64 libre potentiellement désorbé. Un dosage par ICM-MS, beaucoup plus sensible, est nécessaire pour connaître précisément la quantité d'or dans la tumeur.

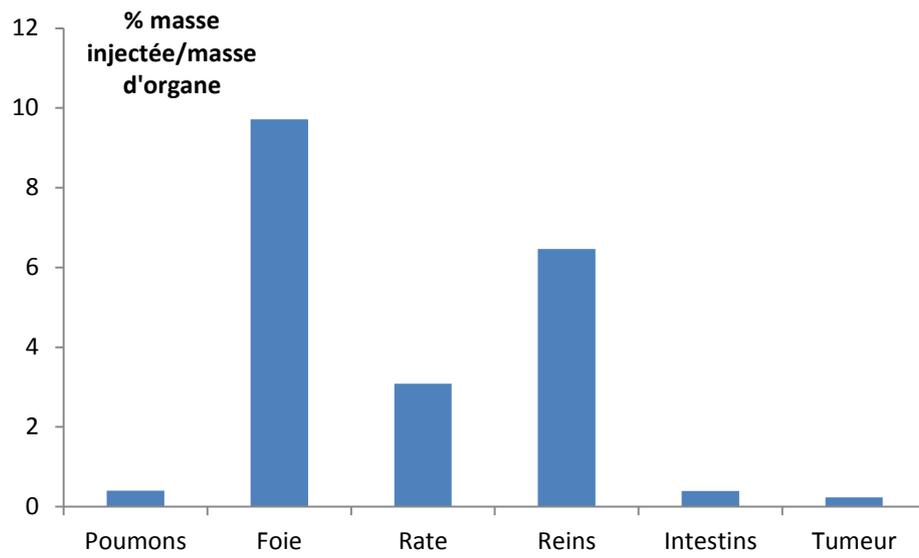


Figure 3.12 Dosage ICP du pourcentage d'or injecté moyen (n=3) dans les organes d'intérêt des animaux imagés en TEP/IRM après injection des nanoparticules Au@TADOTAGA-⁶⁴Cu

3.5. Bilan

Du fait de la présence de ligands macrocycliques à la surface de ces nanoparticules, nous venons de montrer qu'il est possible de les suivre par différentes techniques d'imagerie comme la TEMP, la TEP et l'IRM. Il est donc possible de choisir le type d'imagerie selon les besoins en jouant sur la nature des ions immobilisés. De plus, le co-marquage de ces nano-objets rendu possible par les ligands de type DOTA permet de coupler la TEP et l'IRM qui présentent une forte complémentarité. Le jumelage de l'IRM et la TEP permet de tirer parti des avantages de ces deux techniques tout en compensant leurs défauts. Cette imagerie bimodale permet donc une localisation précise des nanoparticules, grâce à l'excellente résolution de l'IRM et à la très bonne sensibilité de la TEP.

Les suspensions de nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TADOTA montrent une biodistribution adéquate pour une utilisation *in vivo*. Ces nanoparticules circulent librement dans le sang sans montrer d'accumulation importante dans les organes excepté une présence dans le foie qui reste cependant modérée. Il est important de noter qu'elle ne résulte pas du phénomène d'opsonisation, qui est incompatible avec une application thérapeutique, mais elle est le signe d'une élimination hépatobiliaire (fèces). La voie d'élimination principale de ces objets est assurée par excrétion rénale. En outre, les nanoparticules Au@TADOTAGA semblent montrer le comportement le plus intéressant parmi les nanoparticules étudiées. En effet, en plus d'un comportement sain au niveau de la biodistribution, une accumulation significative dans la tumeur a été observée dans le cas d'un carcinome mammaire et d'un gliosarcome. Ces nano-objets possèdent un fort potentiel pour la radiothérapie guidée par imagerie. Néanmoins, leur caractère radiosensibilisant reste à être évalué.

Références

- [1] S.M. Moghimi, J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Prog. Lipid Res.*, 42 (2003) 463–478.
- [2] S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoka, K. Higaki, T. Kimura, Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics, *Int. J. Pharm.*, 342 (2007) 215–221.
- [3] R. Kumar, I. Roy, T.Y. Ohulchanskyy, L.A. Vathy, E.J. Bergey, M. Sajjad, P.N. Prasad, In Vivo Biodistribution and Clearance Studies Using Multimodal Organically Modified Silica Nanoparticles, *ACS Nano*, 4 (2010) 699–708.
- [4] T.K. Jain, M.K. Reddy, M.A. Morales, D.L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats, *Mol. Pharm.*, 5 (2008) 316–327.
- [5] C. Tu, X. Ma, A. House, S.M. Kauzlarich, A.Y. Louie, PET Imaging and Biodistribution of Silicon Quantum Dots in Mice, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2 (2011) 285–288.
- [6] C. Alric, I. Miladi, D. Kryza, J. Taleb, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance, *Nanoscale*, 5 (2013) 5930–5939.
- [7] P. Regnard, G. Le Duc, E. Bräuer-Krisch, I. Troprès, E.A. Siegbahn, A. Kusak, C. Clair, H. Bernard, D. Dallery, J.A. Laissue, A. Bravin, Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing, *Phys. Med. Biol.*, 53 (2008) 861–878.
- [8] A. Bouchet, M. Bidart, I. Miladi, C. Le Clec'h, R. Serduc, C. Coutton, P. Regnard, E. Khalil, S. Dufort, B. Lemasson, J. Laissue, L. Pelletier, G. Le Duc, Characterization of the 9L gliosarcoma implanted in the Fischer rat: an orthotopic model for a grade IV brain tumor, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, 35 (2014) 6221–6233.
- [9] T.M. Jones-Wilson, K.A. Deal, C.J. Anderson, D.W. McCarthy, Z. Kovacs, R.J. Motekaitis, A.D. Sherry, A.E. Martell, M.J. Welch, The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes, *Nucl. Med. Biol.*, 25 (1998) 523–530.
- [10] S. Ait-Mohand, P. Fournier, V. Dumulon-Perreault, G.E. Kiefer, P. Jurek, C.L. Ferreira, F. Bénard, B. Guérin, Evaluation of ⁶⁴Cu-labeled bifunctional chelate-bombesin conjugates, *Bioconjug. Chem.*, 22 (2011) 1729–1735.
- [11] M.S. Cooper, M.T. Ma, K. Sunassee, K.P. Shaw, J.D. Williams, R.L. Paul, P.S. Donnelly, P.J. Blower, Comparison of ⁶⁴Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability, *Bioconjug. Chem.*, 23 (2012) 1029–1039.
- [12] R.H. Knop, J.A. Frank, A.J. Dwyer, M.E. Girton, M. Naegele, M. Schrader, J. Cobb, O. Gansow, M. Maegerstadt, M. Brechbiel, Gadolinium cryptelates as MR contrast agents, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 11 (1987) 35–42.

- [13] M. Magerstädt, O.A. Gansow, M.W. Brechbiel, D. Colcher, L. Baltzer, R.H. Knop, M.E. Girton, M. Naegele, Gd(DOTA): An alternative to Gd(DTPA) as a T_{1,2} relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy, *Magn. Reson. Med.*, 3 (1986) 808–812.

Chapitre 4. Nanoparticules comme agent radiosensibilisant.

4.1.	Introduction.....	127
4.2.	Etudes in vitro	130
4.2.1.	Protocole.....	130
4.2.2.	Résultats et discussion.....	131
4.3.	Etude in vivo par MRT	133
4.3.1.	Etude de la dégradation des nanoparticules après MRT.....	134
4.3.2.	Injection intratumorale.....	135
4.3.2.1.	Protocole	135
4.3.2.2.	Résultats et discussion.....	137
4.3.3.	Injection intraveineuse.....	142
4.3.3.1.	Protocole	142
4.3.3.2.	Résultats et discussion.....	144
4.4.	Bilan.....	147

4.1. Introduction

La thérapie du cancer est un axe majeur de la recherche en raison de la fréquence et de la mortalité importantes de cette maladie. Bien que l'avancée dans les trois axes de la thérapie (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) ait permis de traiter des tumeurs jusque-là incurable et d'améliorer considérablement la survie des patients, il subsiste des tumeurs restant extrêmement difficiles à traiter en raison de leurs caractéristiques (résistance au traitement tels que la radiothérapie), leur localisation (au niveau des organes vitaux ou sensibles au traitement mis en œuvre, notamment le cerveau). C'est le cas notamment du glioblastome [1] [2]. Ce type de cancer se trouve être la tumeur cérébrale la plus fréquente mais aussi la plus agressive. En effet, c'est la deuxième cause de mortalité des cancers chez l'enfant et la troisième chez l'homme. En raison du caractère infiltrant de la tumeur, l'ablation totale de la tumeur par chirurgie est généralement impossible. Effectivement, elle s'infiltré dans le parenchyme cérébral normal qui rend impossible l'exérèse sans causer de lésions graves. C'est pourquoi, un des protocoles thérapeutiques de ce cancer consiste en un traitement combiné de l'ablation de la tumeur dans la mesure du possible, suivi d'une radiothérapie ainsi que d'une chimiothérapie (Temodal). Cependant en raison du caractère radorésistant et de sa localisation dans un organe radiosensible, le gain thérapeutique par radiothérapie est faible. Malgré un traitement combinant les trois techniques de thérapie, la guérison totale de cette pathologie ne peut être atteinte mais permet néanmoins une augmentation de la durée de vie de quelques mois. Cependant, l'espérance de vie demeure extrêmement faible, de l'ordre d'une année ou deux avec une médiane de survie atteignant 14,5 mois [3]. Il est donc nécessaire de se tourner vers le développement de nouvelles techniques pour le traitement de cette pathologie. Certaines avancées ont été réalisées très récemment, améliorant la thérapie, par l'utilisation de Bevacizumab® (anticorps monoclonal inhibiteur de l'angiogenèse) en plus de la radiothérapie couplée à la chimiothérapie. Néanmoins, cette avancée ne permet pas une amélioration de la survie générale mais une amélioration de la survie sans progression de la tumeur et un gain de la qualité de vie des patients [4]. D'autres pistes intéressantes comme l'amélioration de la technique de radiothérapie sont donc à envisager [5].

L'utilisation du rayonnement synchrotron fait partie de ces pistes intéressantes. Le principe de ce rayonnement consiste à faire circuler des électrons de haute énergie dans un anneau circulaire, dit de stockage. Ceux-ci, se déplaçant de manière non uniforme en raison de la courbure de l'anneau, vont émettre un rayonnement électromagnétique (d'après les équations de Maxwell). L'utilisation de ce rayonnement, en plaçant des lignes de lumières autour de l'anneau de stockage (figure 4.1), est très intéressante en raison des propriétés uniques du rayonnement comme une brillance très élevée, une faible divergence du faisceau et un spectre d'émission continu et adaptable [6].

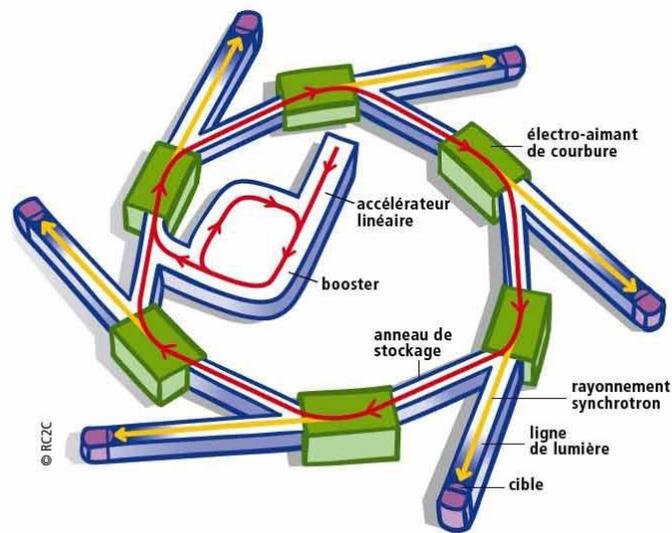


Figure 4.1 Schéma d'un synchrotron [7]

Une des techniques de radiothérapie extrêmement intéressante provenant de ce rayonnement synchrotron est la technique de radiothérapie par microfaisceaux (MRT). Cette technique est basée sur l'utilisation de collimateurs pour fractionner le faisceau en microfaisceaux quasi-parallèles. L'intérêt d'utiliser une source synchrotron réside dans le débit de dose très important (de l'ordre du kGy/s) rendant les temps d'irradiation extrêmement courts (de l'ordre de la milliseconde au lieu de plusieurs dizaines de minutes dans le cadre d'une radiothérapie conventionnelle). Le faible temps d'exposition au rayonnement est extrêmement intéressant car il permet de s'affranchir des mouvements inévitables du sujet comme la respiration ou les mouvements cardiaques. Comme autre attrait, le rayonnement synchrotron possède une divergence extrêmement faible qui permet de contrôler de manière très précise la largeur des microfaisceaux.

Typiquement, les microfaisceaux utilisés pour la radiothérapie sont d'une largeur d'environ 25-75 microns espacés les uns des autres de 100 à 400 microns [8]. L'utilisation d'un rayonnement sous forme de microfaisceaux permet d'utiliser des énergies très importantes de plusieurs centaines de Grays grâce à l'alternance de zones où une forte dose est déposée (dose pic) et de zones où la dose est très faible (dose vallée) comme le montre la figure 4.2.

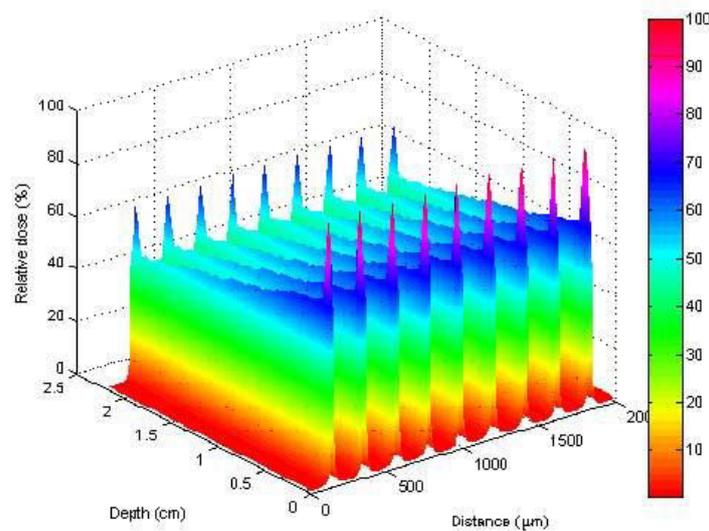


Figure 4.2 Simulation 3D du profil de dose de 9 microfaisceaux dans le crâne d'une souris [8]

L'utilisation de la MRT montre des résultats très intéressants en raison de sa capacité à irradier des zones très réduites avec une dose très importante sans occasionner de nécrose [9]. D'après de nombreuses études très encourageantes [10][11][12], la MRT s'impose comme une amélioration de la radiothérapie classique sans toutefois parvenir à obtenir la guérison totale de tumeurs comme le glioblastome. L'utilisation d'un agent radiosensibilisant pour augmenter l'effet de la MRT, dans le but d'atteindre une guérison totale ou tout du moins améliorer la durée de vie, est une piste intéressante à suivre.

L'utilisation des différentes suspensions de nanoparticules comme agent radiosensibilisant, en raison de la forte propension de l'or à absorber les rayons X comme expliqué dans le chapitre 1, pourrait donc présenter un fort intérêt en les combinant à la MRT. Dans un premier temps, l'aptitude thérapeutique des nanoparticules a été étudiée (*in vitro*) en utilisant un irradiateur classique. Puis, après avoir évalué la dégradation des nanoparticules après irradiation par le rayonnement MRT, l'effet radiothérapeutique des nano-objets a été testé *in vivo* en les injectant par voie intratumorale chez des souris portant un mélanome puis par voie intraveineuse chez des rats portant un gliosarcome quelques temps avant de réaliser la radiothérapie par MRT.

4.2. Etudes *in vitro*

4.2.1. Protocole

Les tests de radiosensibilisation *in vitro* ont été réalisés sur des cellules SF 763 provenant de glioblastome humain. Les cellules, en suspension dans le milieu de culture DMEM GlutaMAX avec 10% de sérum et un mélange d'antibiotiques (pénicilline G (100 U/mL) + streptomycine (100 µg/mL)), sont introduites dans des plaques 96 puits à raison de 200, 400 et 800 cellules par puits de manière à ce que, pour ces trois conditions, celles-ci puissent se multiplier suffisamment tout en évitant un surnombre pouvant provoquer la mort cellulaire. Les plaques sont laissées une journée dans l'incubateur (37 °C, 5 % CO₂ et 95% d'humidité).

Les différentes suspensions de nanoparticules (Au@DTDTPA, Au@TADOTA et Au@TADOTAGA) ont été tamponnées par du PBS pour respecter l'isotonicité de l'organisme. Les quatre sels suivants ont été ajoutés dans ces proportions :

- 8,01 g.L⁻¹ de NaCl
- 0,20 g.L⁻¹ de KCl
- 1,78 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.2H₂O
- 0,27 g.L⁻¹ de KH₂PO₄

Les cellules ayant besoin de milieu de culture et d'une proportion en PBS (dans notre cas la suspension de nanoparticule) par rapport au volume totale de 10 % pour vivre, la solution de nanoparticules à 10 g/L en or est diluée avec du milieu DMEM sans sérum dix fois. Un volume de 100 µL de cette solution de nanoparticules diluée (1 g/L en or) est ajouté dans les puits. Une heure après incubation, les plaques sont irradiées.

L'irradiation par rayonnement X est réalisée à l'aide d'une machine X-RAD 320 à l'Institut Curie d'Orsay à 3 et 8 Grays avec une tension de 200 kV et un courant de 20 mA. Après irradiation, le milieu est changé de manière à retirer les nanoparticules des puits. Les plaques sont ensuite laissées dans l'incubateur pendant dix jours.

Pour analyser le taux de survie cellulaire, la méthode Odyssey est utilisée. Pour cela les cellules sont fixées dans les puits en utilisant 200 µL de PFA (paraformaldéhyde) à 4%. Cette étape consiste à tuer la cellule tout en conservant sa structure et sa composition chimique par formation de liaisons covalentes entre les amines primaires des protéines. Ensuite les cellules sont perméabilisées, après lavage, par 200 µL de PBS/Triton 0,5 %. Enfin, une solution (200 µL) de TO-PRO-3 Iodide ($\lambda_{\text{excitation}}/\lambda_{\text{émission}} = 642/661 \text{ nm}$) est ajoutée dans les puits. Après 10 minutes d'incubation sans lumière les cellules sont analysées par un système Odyssey CLx.

4.2.2. Résultats et discussion

Les courbes de survie des cellules (figure 4.3) indiquent dans un premier temps un taux de survie convenable de l'ordre de 90 % pour les cellules ayant été en contact avec les nanoparticules sans irradiation. Les nanoparticules Au@TADOTAGA semblent plus adaptées que les autres avec un taux de survie de 105 %. Concernant l'effet synergique rayonnement/particule, les résultats ne sont pas probants. En effet, le taux de survie est similaire à celui des cellules ayant reçu uniquement l'irradiation. De manière générale, il y a un léger gain d'effet radiosensibilisant mais pas significatif.

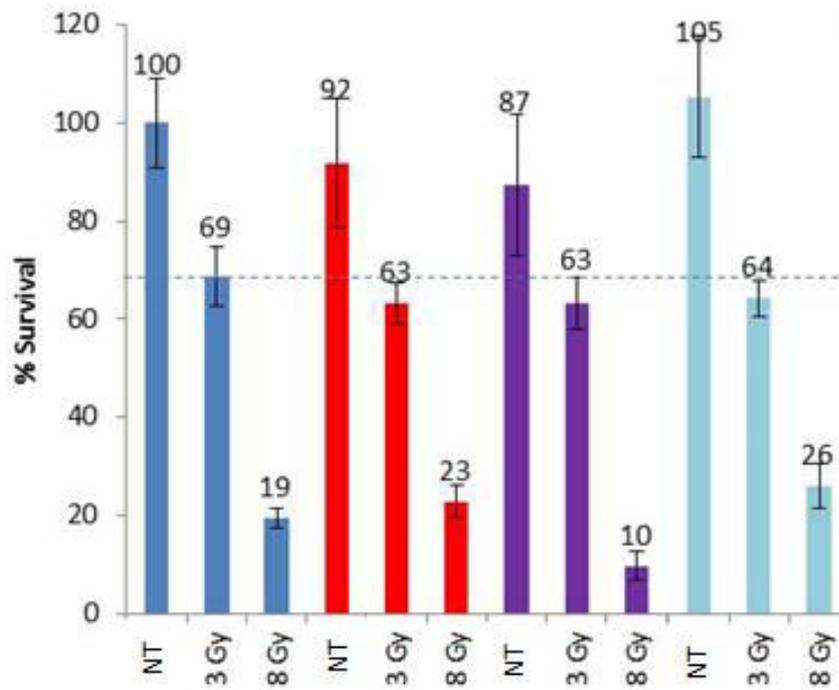


Figure 4.3 Survie des cellules seules (bleu foncé) et des cellules incubées avec les nanoparticules Au@DTDTPA (en rouge), Au@TADOTA (en violet) et Au@TADOTAGA (en bleu clair) pour différentes conditions (sans irradiation, 3 Gy, 8 Gy)

Ce faible effet synergique de l'irradiation et des nanoparticules est étonnant. En effet, nous attendions un effet significatif beaucoup plus marqué en raison de la propension de l'or à absorber le rayonnement X et surtout d'après les études réalisées précédemment par l'équipe [13]. En effet, des tests « comète » effectués au cours de la thèse de Christophe Alric avaient montré un effet important de la combinaison irradiation/nanoparticules comparé à l'irradiation seule (figure 4.4). Cette méthode consiste à mesurer le moment moyen de la queue des comètes après électrophorèse des cellules lysées pour mettre en évidence l'importance du nombre de cassures de l'ADN.

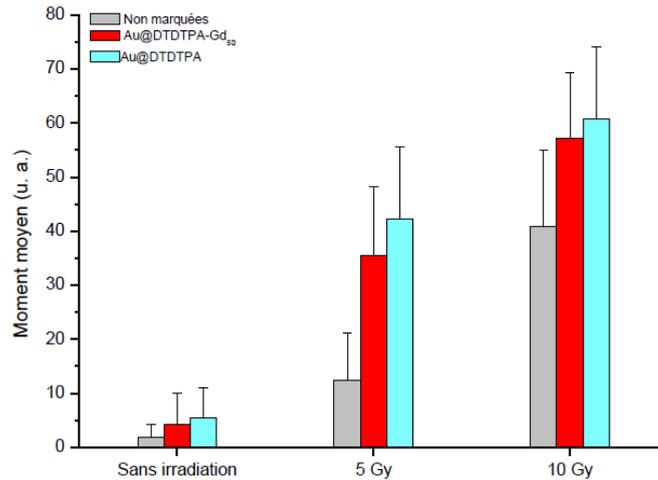


Figure 4.4 Evolution du moment moyen des comètes sans nanoparticules (en gris) ou avec les nanoparticules Au@DTDTPA-Gd (en rouge) et Au@DTDTPA (en bleu) pour différentes conditions (sans irradiation, 5 Gy, 10 Gy)

Il semblerait que l'étude *in vitro* réalisée ne soit pas des plus adaptées. De plus, les études *in vitro* en général ne rendent pas forcément compte de ce qui se produira avec une étude *in vivo*. En effet, il reste difficile de simuler parfaitement une étude médicale en ne travaillant que sur des cellules. Pour évaluer l'aptitude des suspensions colloïdales de nanoparticules, l'expérience *in vivo* est indispensable.

4.3. Etude *in vivo* par MRT

Les études de l'effet radiosensibilisant *in vivo* ont été réalisées à l'ESRF sur la ligne ID 17 dédiée aux recherches biomédicales. Le rayonnement employé, de type synchrotron, sous forme de microfaisceaux (MRT) permet d'exploiter l'effet dose-volume important de cette technique.

Après avoir étudié l'effet du rayonnement sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, l'effet radiosensibilisant par MRT a été évalué sur deux types de tumeurs. La première est un mélanome A375 chez la souris permettant dans un premier temps une injection des différentes suspensions par voie intratumorale de manière à s'affranchir des effets de biodistribution. La deuxième tumeur est un gliosarcome. Dans ce deuxième cas, l'injection des suspensions colloïdales a lieu par voie intraveineuse.

Ces études à l'ESRF sont réalisées en collaboration avec les Docteurs Géraldine Le Duc, Elke Braüer-Krisch, Herwig Requardt et Sandrine Dufort (Nano-H SAS).

4.3.1. Etude de la dégradation des nanoparticules après MRT

L'utilisation de doses extrêmement élevées (plusieurs centaines de Gy) pour effectuer les études de l'effet radiosensibilisant des suspensions colloïdales de nanoparticules nécessite de s'assurer que le rayonnement ne va pas induire une dégradation des nano-objets et ainsi perturber leur élimination.

La suspension de nanoparticules Au@TADOTA (1 mL) a été irradiée dans les conditions expérimentales (400 Gy) dans un eppendorf. Les nanoparticules, suite à l'irradiation, présentent un diamètre hydrodynamique identique aux nanoparticules avant irradiation de l'ordre de 6,3 nm (tableau 4.1). De plus le potentiel Zêta avant et après irradiation semble similaire aux incertitudes près (environ -8,8 mv). Nous pouvons remarquer que cette valeur est inférieure aux mesures réalisés dans le chapitre 2 à pH 7. Cela s'explique par la présence du gadolinium et des ajouts d'Hepes/NaCl pour respecter l'isotonicité biologique.

Tableau 4.1 Mesures des diamètres hydrodynamique et potentiel zêta avant et après irradiation

Au@TADOTA	Témoin	MRT
Diamètre (nm)	6,4	6,3
ζ (mv)	-9,7	-7,87

De plus, des clichés TEM ont été réalisés avant et après irradiation (figure 4.5) de manière à comparer les diamètres des cœurs d'or. Nous retrouvons la même valeur aux alentours de 2,2 nm de diamètre aux incertitudes près (2,3 nm avant irradiation et environ 2,2 après irradiation).

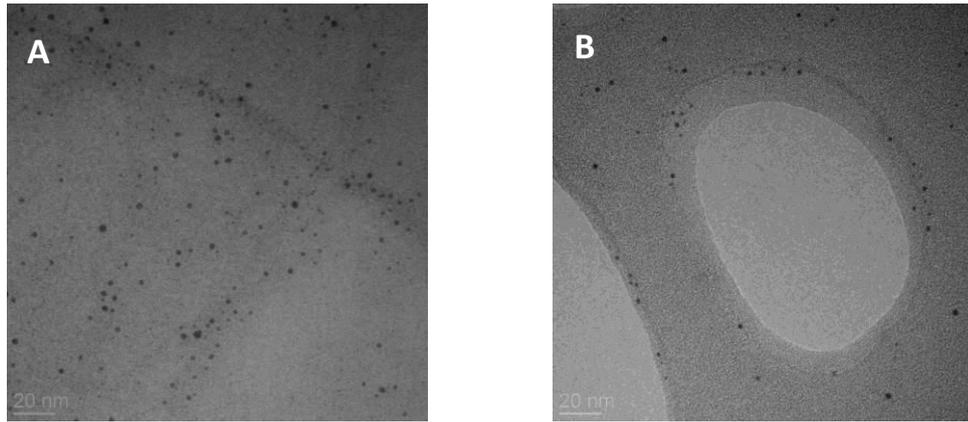


Figure 4.5 Images TEM des nanoparticules Au@TADOA avant (A) et après irradiation (B)

Il semblerait donc que l'utilisation du rayonnement MRT de la ligne ID 17 ne modifie pas les nanoparticules. Le cœur d'or et la couche organique ne semblent pas altérés par l'exposition au rayonnement synchrotron.

4.3.2. Injection intratumorale

L'aptitude des nanoparticules à engendrer un effet radiosensibilisant est évaluée tout d'abord par injection par voie intratumorale. Cela permet de s'affranchir de la biodistribution et ainsi vérifier qu'en dehors des considérations d'accumulation dans la tumeur, l'effet radiosensibilisant est bien présent.

4.3.2.1. Protocole

Des souris NMRI nude femelles âgées de six semaines sont utilisées pour cette étude. Des cellules tumorales A375 (mélanome malin) sont implantées par injection sous-cutanée sur le flanc, à raison de $3 \cdot 10^7$ cellules (dans 200 μ L de PBS). L'implantation est réalisée sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4% pour l'induction puis 2%). Après 21 jours de croissance tumorale, les souris reçoivent soit une injection intratumorale (IT) de 40 μ L, soit une injection intraveineuse (IV) de 100 μ L d'une suspension de nanoparticules Au@X-Gd³⁺. La coloration marron foncé des suspensions (pour les injections IT) permettent de vérifier la présence des nanoparticules dans la tumeur (figure 4.6).



Figure 4.6 Photo de la tumeur avant et après injection des nanoparticules par voie intratumorale

La souris est ensuite placée sur un support spécifique (figure 4.7B), monté sur un goniomètre (figure 4.7A) piloté par ordinateur de manière à positionner la souris, et plus particulièrement la zone à irradier, de manière extrêmement précise par rapport au faisceau. La souris est positionnée sur le ventre, avec la patte portant la tumeur écartée de l'axe de l'animal pour éviter d'irradier la colonne vertébrale comme le montre la figure 4.7C (le laser représentant la zone tumorale et donc la zone d'irradiation).

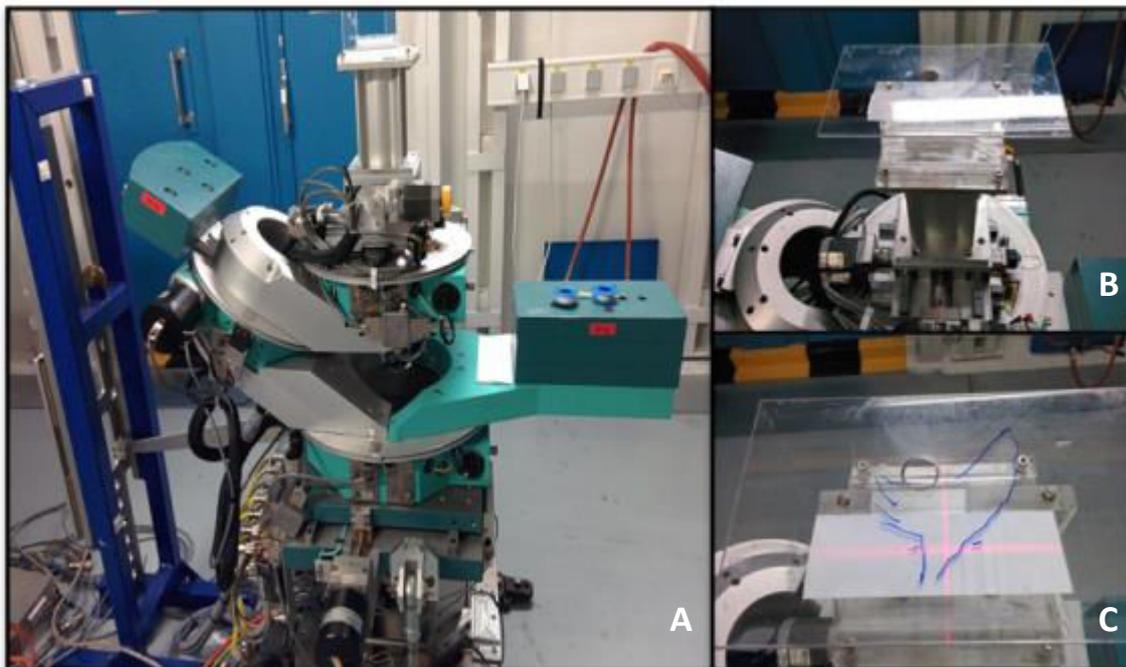


Figure 4.7 Photographies représentant le goniomètre (A), le support (B), et la position de la souris (C) pour l'irradiation

L'irradiation unidirectionnelle MRT (dose entrée 400 Gy, dose vallée 20 Gy) est réalisée 15 minutes après les injections IT ou cinq heures après les injections IV. Le champ d'irradiation mesure 7 mm de hauteur et 11 mm de large. Les microfaisceaux qui le constitue, mesurent 50 micromètre de large et sont espacés de 400 micromètre (de centre à centre). Lors de l'irradiation, les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange Médétomidine (0,2 µg/g) / Kétamine (0,1 mg/g).

Suite à l'irradiation, les tumeurs sont mesurées trois fois par semaine. Le volume tumoral est calculé, en considérant les tumeurs comme des ellipses, d'après l'équation 4.1 (la longueur et la largeur sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse).

Équation 4.1 Calcul du volume de la tumeur

$$V = 0,52 \times \text{largeur}^2 \times \text{longueur}$$

4.3.2.2. Résultats et discussion

La première expérimentation comportait cinq groupes de souris, un groupe témoin non traité, un groupe traité uniquement par MRT et trois autres groupes traités par MRT 15 minutes après injection d'une des trois suspensions colloïdales (Au@TADOTAGA, Au@TADOTA) à 10g/L en or.

La figure 4.8 montre dans un premier temps que les souris non traitées présentent une croissance tumorale très rapide quasi exponentielle. Nous pouvons noter ensuite que les souris du groupe ayant reçu un traitement par MRT, voient leurs tumeurs croître de manière beaucoup moins importante. Enfin, la combinaison de l'irradiation et des nanoparticules réduit encore considérablement la croissance tumorale par rapport au traitement par MRT seul. La croissance tumorale est ralentie d'un facteur 6 au dernier jour de l'étude (J+75) grâce à l'effet des nanoparticules. Sans surprise, cet effet radiosensibilisant des nanoparticules ne semble pas dépendre du type de nanoparticules (Au@TADOTAGA, Au@TADOTA).

En effet, la teneur en or et le diamètre des nanoparticules étant quasiment identique, aucune différence sur l'effet radiosensibilisant n'était attendue. En outre, il est intéressant de remarquer que les trois groupes ayant reçu une irradiation MRT montrent une fonte de la

tumeur suite au traitement. Néanmoins, la repousse de celle-ci est différée selon le traitement réalisé. En effet, la tumeur repousse après environ six jours concernant les souris traitées par MRT alors que la repousse survient après une dizaine de jours pour les souris traitées par MRT après injection intratumorale des nanoparticules.

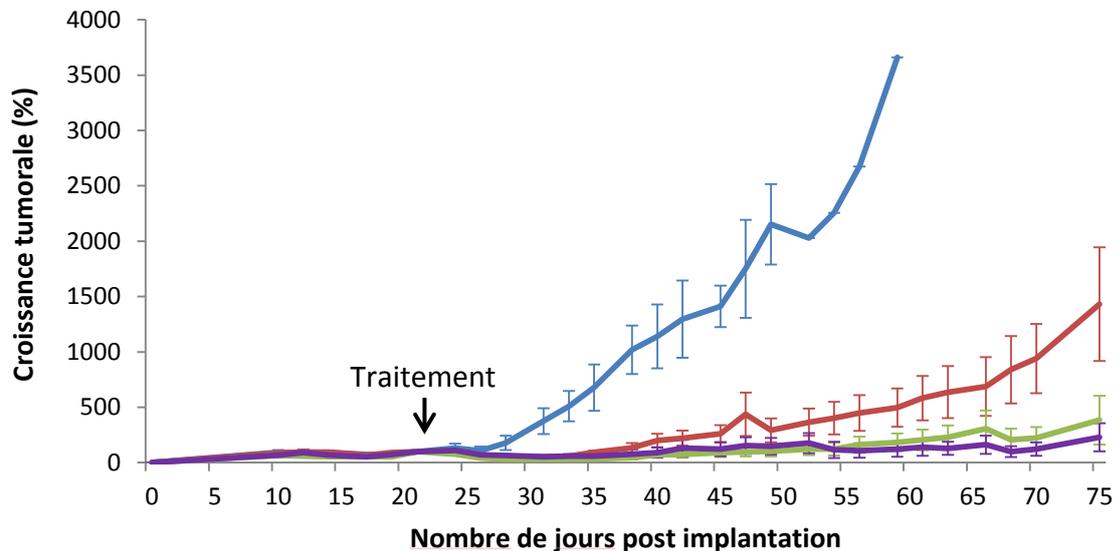


Figure 4.8 Suivi de la croissance de tumeurs A375 implantées en sous cutanée à des rats : non traités(en bleu), traités par MRT seul (en rouge) ou par MRT 15 minutes après injection intratumorale des nanoparticules Au@TADOTA (en vert) ou Au@TADOTAGA (en violet).

Contrairement aux résultats *in vitro*, l'effet radiosensibilisant des suspensions de nanoparticules est clairement observé *in vivo*. Cet effet est, de surcroît, très important comme le montrent le ralentissement de la croissance tumorale par rapport aux souris traitées par MRT seul (facteur 5) et l'augmentation significative du délai de repousse. Ces données mettent en relief le fait que les tests *in vitro* ne sont pas forcément représentatifs et qu'une étude *in vivo* par injection intratumorale représente un meilleur indicateur.

L'effet de la concentration a ensuite été testé en utilisant le même protocole. En raison de l'effet similaire entre les nanoparticules, lors d'une injection intratumorale, un seul type de nanoparticules a été testé (Au@TADOTAGA). Pour cette nouvelle expérimentation, quatre groupes ont été étudiés. Un groupe de souris non traitées, un groupe traité par MRT, un groupe traité par MRT 15 minutes après l'injection de la suspension de nanoparticules

Au@TADOTAGA à 5g/L en or et enfin un dernier groupe traité par MRT 15 minutes après l'injection de la suspension de nanoparticule à 1g/L en or.

Les courbes de la figure 4.9 montrent un comportement différent, comparé aux résultats précédents. En effet, l'effet des traitements sur la croissance tumorale semble moindre. La croissance de la tumeur est plus importante et le délai de repousse est diminué. En effet, la repousse a lieu trois jours après pour tous les groupes alors qu'on atteignait 6 jours pour le groupe traité par MRT seule, lors de la première étude, et dix jours pour les groupes traités par MRT/nanoparticules (10 g/L). Cela s'explique par le fait que les volumes tumoraux au moment du traitement sont très différents de l'étude précédente (120 mm³ pour la première étude et 350 mm³ pour celle-ci). Le volume de suspension colloïdale injecté étant le même (40 µL), le ratio entre le volume des tumeurs et le volume de particules n'est pas le même. Il y a donc une répartition différente des particules dans la tumeur au moment de l'irradiation. Nous ne pouvons donc malheureusement pas comparer l'effet radiosensibilisant à 5 g/L et 1 g/L à celui observé à 10 g/L lors de l'étude réalisée précédemment.

Malgré un traitement avec un volume tumoral plus important, nous pouvons remarquer un effet significatif de la combinaison irradiation par microfaisceaux/nanoparticules. L'effet radiosensibilisant se trouve être plus important pour les souris ayant reçu l'injection de la suspension à 5g/L que celles ayant reçu l'injection à 1g/L. Ce résultat n'est pas vraiment étonnant : plus la concentration en agent radiosensibilisant dans la tumeur est élevée, plus l'effet tumoricide est important. Nous ne pouvons pas comparer avec les courbes de l'étude précédente (10g/L) du fait d'un volume tumoral différent. Néanmoins, il semble tout de même que la concentration de 10 g/L en or soit la plus adaptée.

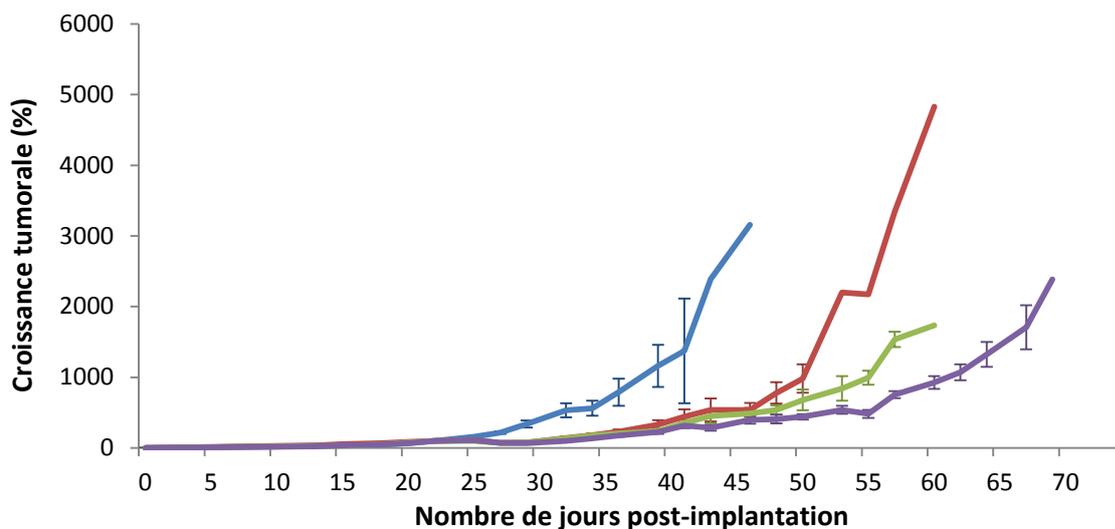


Figure 4.9 Suivi de la croissance de tumeurs A375 implantées en sous cutanée à des rats : non traités (en bleu), traité par MRT seul (en rouge) ou par MRT 15 minutes après injection intratumorale des nanoparticules Au@TADOTAGA à 1 g/L (en vert) ou 5g/L (en violet)

Pour conclure l'étude de radiosensibilisation des suspensions de nanoparticules par injection intratumorale, cinq nouveaux groupes ont été étudiés : un groupe témoin non traité, un groupe traité uniquement par MRT, un groupe traité par MRT 15 minutes après injection IT de la suspension Au@TADOTAGA, un groupe traité deux fois par MRT (deuxième irradiation 3 jours après la première) et un groupe traité deux fois par MRT 15 minutes après l'injection de la suspension Au@TADOTAGA (injection avant chaque MRT).

La figure 4.10 confirme dans un premier temps les résultats obtenus précédemment. Le groupe traité par MRT 15 minutes après injection intratumorale de la suspension Au@TADOTAGA présente un ralentissement de la croissance tumorale important par rapport au groupe ayant reçu uniquement la MRT, comparable aux études précédentes.

Concernant les deux derniers groupes ayant reçu une ré-irradiation (délai de trois jours entre les deux traitements MRT), nous pouvons observer un ralentissement de la croissance tumorale encore plus prononcé par rapport au traitement avec qu'une seule irradiation. Nous observons à nouveau un effet important de ralentissement lorsque les souris ont reçu une injection de nanoparticules avant les deux irradiations. Le traitement comprenant deux irradiations est très intéressant. En effet, celui-ci retarde nettement le délai de repousse de la tumeur qui est d'environ 15 jours dans le cas d'une double irradiation contre 7 jours pour une seule irradiation.

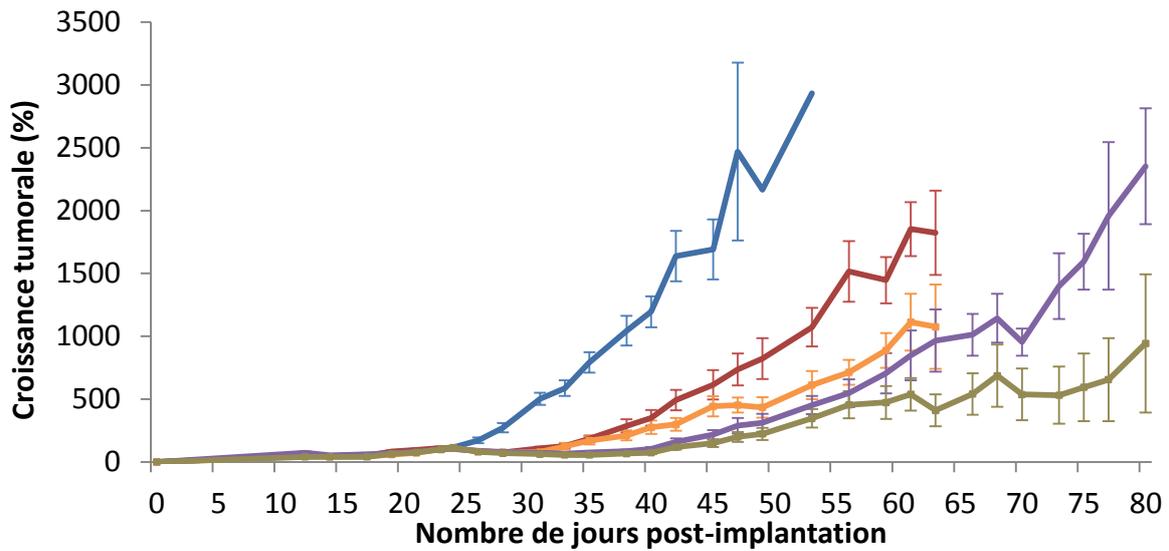


Figure 4.10 Suivi de la croissance de tumeurs A375 implantées en sous cutanée à des rats : non traités (bleu), traité par MRT seul (rouge), par MRT 15 minutes après injection intratumorale des nanoparticules Au@TADOTAGA (orange), par deux irradiation (3 jours d'intervalles) MRT (violet), ou par deux irradiations MRT (3 jours d'intervalles) après injection intratumorale des nanoparticules Au@TADOTAGA (brun)

En permettant de s'affranchir de la biodistribution des nanoparticules, ces études montrent clairement l'existence d'un effet radiosensibilisant important des nanoparticules d'or à 10g/L lorsqu'elles sont injectées par voie intratumorale. Cet effet est présent également pour de faibles concentrations (1 g/L). De plus, la réalisation d'un traitement comportant une ré-irradiation trois jours après la première couplée à une injection avant chaque irradiation diminue significativement la croissance tumorale et augmente considérablement le délai avant la repousse de la tumeur (facteur 2 par rapport à une seule irradiation). Néanmoins, ce mode d'injection qui peut se révéler utile pour la thérapie de tumeurs cutanées, se trouve moins adapté pour le traitement d'autres tumeurs comme le gliosarcome. L'effet radiosensibilisant après injection intraveineuse nécessite d'être évalué car la biodistribution des nanoparticules peut minimiser le potentiel dévoilé par les expériences réalisées après injection intratumorale.

4.3.3. Injection intraveineuse

Le traitement par radiothérapie après injection des nanoparticules d'or par voie intraveineuse se rapproche plus de la réalité clinique. En effet l'injection intratumorale est peu pratiquée en raison du risque de dissémination des cellules cancéreuses. Cependant l'administration des nanoparticules par voie intraveineuse nécessite une biodistribution adaptée (accumulation dans la tumeur, absence de nanoparticules dans les tissus sains, élimination par voie rénale). Même si les nanoparticules d'or Au@TADOTAGA présentent une biodistribution adaptée, l'effet thérapeutique risque d'être amoindri car l'accumulation dans la tumeur des nano-objets circulant dans le système sanguin est nettement plus faible que la quantité introduite par injection intratumorale.

4.3.3.1. Protocole

Les animaux utilisés pour cette étude sont des rats mâles Fisher âgés de 10 semaines. Des cellules tumorales 9LGS (gliosarcome de rat) sont implantées par injection stéréotaxique de 10^4 cellules (dans $1\mu\text{l}$ de DMEM + 1% pénicilline/streptomycine) dans le noyau caudé (3,5 mm à droite de la Bregma, 6 mm de profondeur). Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange Ketamine (5,4 mg/kg) / xylazine (64,5 mg/kg) [14][15]. Les rats reçoivent, 9-10 jours après l'implantation, une injection intraveineuse (veine saphène) de suspensions de nanoparticules Au@X-Gd³⁺ (0,7 mL à 50 mM en or et 5 mM en gadolinium).

Suite à l'anesthésie et l'injection de la suspension de nanoparticules, l'animal est positionné à plat ventre sur le support comportant un barreau de manière à y coincer ces dents afin de conserver une position adéquate. Le rat est face à la source du rayonnement. L'irradiation se fait en tir croisé, c'est-à-dire que le rat reçoit deux irradiations dans des directions perpendiculaires l'une de l'autre avec un croisement de celles-ci aux coordonnées de la tumeur. La première irradiation a lieu en direction antéropostérieure et suite à une rotation du goniomètre de 90°, la deuxième irradiation se fait latéralement (figure 4.11). Des caméras permettent de contrôler son positionnement correct sur le support et d'ajuster sa position via le goniomètre extrêmement précisément pour centrer le rayonnement sur la zone tumorale supposée.

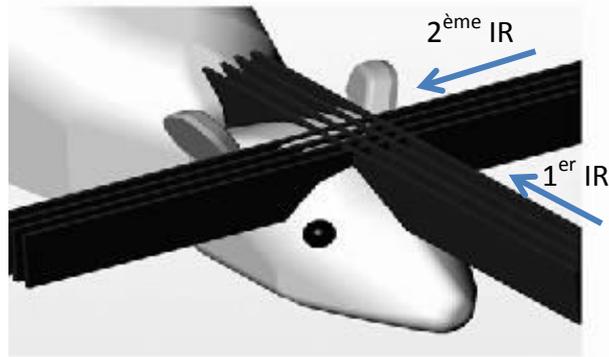


Figure 4.11 Schéma représentant l'irradiation en tir croisé du gliosarcome

Le champ d'irradiation correspond à des dimensions de 10 sur 8 millimètres. Les microfaisceaux qui le constitue, mesurent 50 micromètres de large et sont séparés par 200 micromètres (de centre à centre). La dose de rayonnement à l'entrée dans la peau, pour chaque irradiation, est de 400 Gy concernant le pic et d'environ 20 Gy dans la vallée.

Suite à l'irradiation, les rats retournent à l'animalerie et sont contrôlés quotidiennement, notamment au niveau du poids, de manière à relever de potentiels signes cliniques inquiétants. Si cela est justifié, les rats sont euthanasiés pour éviter la souffrance animale à l'aide de Doléthol. Le nombre de jours entre l'implantation de la tumeur et la mort du rat (dans le cas de l'euthanasie, un jour supplémentaire est compté) constitue la durée de survie de l'animal. A partir de ces valeurs, des courbes de survie (type Kaplan-Mayer) sont tracées, représentant le taux de survie en fonction du temps afin de comparer l'efficacité des différents traitements.

4.3.3.2. Résultats et discussion

Pour cette étude sur l'effet radiosensibilisant des nanoparticules en termes de survie sur les rats portant un gliosarcome, quatre groupes ont été étudiés. Le premier comporte les rats contrôle non traités, le deuxième comprend les rats traités uniquement par MRT, le troisième est composé de rats traités par MRT 10 minutes après l'injection de la suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA et le dernier groupe est similaire au troisième à la différence que le temps entre l'injection et l'irradiation est de 24h.

Le type de nanoparticules utilisé reste le même. En effet, d'après les résultats précédents, il s'avère que ce sont les nanoparticules Au@TADOTAGA qui présentent le plus fort potentiel pour la radiothérapie guidée par imagerie. En effet, les études IRM ont révélé que ces nanoparticules s'accumulent de manière modeste au sein du gliosarcome contrairement aux nanoparticules Au@TADOTA. Le paramètre étudié est le délai entre l'injection et la MRT, c'est-à-dire la biodistribution des nano-objets au moment de l'irradiation.

A l'aide des courbes de survie (figure 4.12) représentant le taux de survie en fonction du temps pour les différentes conditions, les médianes de survie (MeS) représentant le délai au bout duquel la moitié des animaux sont décédés et les moyennes de survie (moyenne des durées de survie totale des rats d'un groupe) sont calculées. A partir des médianes de survie, l'ILS (Increase In Lifespan), qui correspond à l'augmentation de la durée de vie en pourcentage par rapport au groupe contrôle, est calculé ainsi : $(MeS_i - MeS_{\text{contrôle}}) / MeS_{\text{contrôle}}$. Ces valeurs sont répertoriées dans le tableau 4.2. Dans un premier temps, nous pouvons noter une augmentation considérable de la survie pour les rats traités par MRT. En effet, la médiane de survie des rats contrôle n'ayant reçu aucun traitement est seulement de 22 jours, montrant la mortalité rapide induit par ce type de tumeur, alors que la médiane de survie des rats traités par MRT est de 71 jours. Ce gain sur la survie est bien visible d'après le décalage important des deux courbes. Cette augmentation de survie (ILS) s'élève à 222,7 %. Cela montre bien l'intérêt du traitement par MRT pour éradiquer des tumeurs agressives et difficile à soigner.

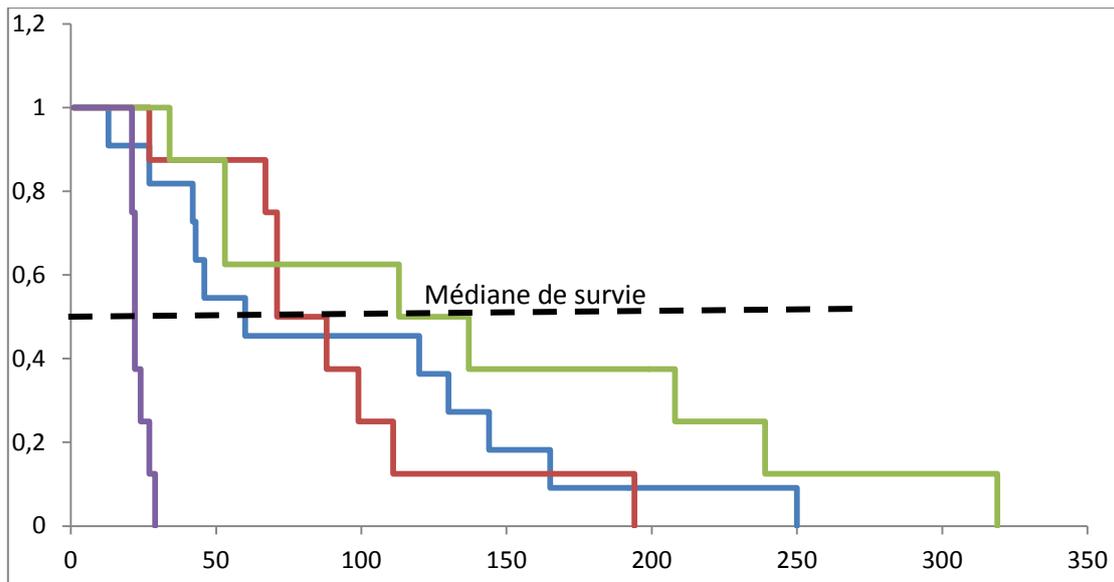


Figure 4.12 Courbes de survie pour les rats contrôle (en violet), traités par MRT seul (en rouge), par MRT 10 minutes (en bleu) et 24h (en vert) après l'injection des nanoparticules Au@TADOTAGA par voie intraveineuse

Tableau 4.2 Valeur des moyennes et médiane de survie ainsi que l'ILS pour les différents groupes

Groupes	Moyenne de survie	Médiane de survie	ILS (%)
1 : Contrôle	22,8	22	X
2 : MRT	91,4	71	222,7
3 : MRT (10 minutes) + Au@TADOTAGA	104	60	172,7
4 : MRT (24h) + Au@TADOTAGA	144,5	113	413,6

Concernant les groupes traités par la combinaison MRT/nanoparticules à différents temps, nous pouvons observer deux tendances en raison d'une biodistribution différente. Bien que la moyenne de survie soit légèrement plus importante pour le groupe 3 (MRT 10 minutes après injection) par rapport au groupe ayant reçu uniquement la MRT (groupe 2), la médiane de survie est inférieure. Cela implique une mortalité prématurée de certains rats. L'ILS se trouve donc être inférieure à celle du groupe 2.

Par contre, les résultats du dernier groupe représentant les rats avant reçu la MRT 24h après l'injection des nanoparticules diffèrent. En effet, nous pouvons remarquer un décalage significatif de la courbe du groupe 4 par rapport à celle du groupe 3 (MRT seul). La médiane de survie s'en trouve largement améliorée, s'élevant à 113 contre 71 pour le groupe traité par MRT seule. Ce qui représente une amélioration de la durée de survie par rapport aux rats contrôle d'environ 414% (contre 223% pour le groupe 2). De plus, sur les 8 rats du dernier groupe, cinq sont encore en vie après 100 jours et trois après 200 jours. Ces résultats, pour une irradiation 24h après l'injection intraveineuse des nanoparticules Au@TADOTAGA, montrent bien l'aptitude de ces nano-objets à jouer le rôle d'agent radiosensibilisant pour la radiothérapie et à améliorer considérablement le traitement par MRT bien que nous soyons dans le cas d'une tumeur extrêmement difficile à traiter.

La différence notable entre le traitement 10 minutes ou 24 heures après injection justifie l'importance de la biodistribution des nanoparticules au moment de l'irradiation. En effet, les morts prématurés du groupe 3 peuvent s'expliquer par la présence de nanoparticules en quantité significatives dans la circulation sanguine, et donc dans les tissus sains autour de la tumeur, 10 minutes après l'injection. Il est donc possible que l'irradiation, dans ce cas, occasionne des dégâts non désirés. Cela montre la nécessité de réaliser une thérapie guidée par imagerie afin de déterminer le moment opportun pour activer l'effet tumoricide des nanoparticules et ainsi occasionner des dégâts importants à la tumeur tout en préservant les tissus sains.

4.4. Bilan

Bien que les nanoparticules se soient montrées non toxiques pour les cellules lorsque celles-ci ne sont pas exposées au rayonnement, un effet radiosensibilisant modéré a été observé. Cependant, cet effet *in vitro* se trouvait en dessous de nos attentes.

Néanmoins la présence d'un effet radiosensibilisant significatif *in vivo*, en s'affranchissant des effets de la biodistribution, après l'injection intratumorale des suspensions de nanoparticules, a été observée.

L'aptitude *in vivo* des nanoparticules Au@TADOTAGA, suite à leur injection par voie intraveineuse pour traiter un gliosarcome 9L (tumeur extrêmement agressive et difficile à soigner en raison de son caractère radiorésistant et sa localisation dans un organe radiosensible), s'est révélée extrêmement prometteuse. En effet, le traitement par MRT 24h après injection des nanoparticules Au@TADOTAGA par voie intraveineuse, a induit une augmentation de la survie par rapport aux rats contrôle de 413,6 %. Ce résultat extrêmement encourageant met en relief le potentiel de ces objets pour améliorer le traitement par MRT afin de traiter ce type de tumeur.

Le taux de survie des rats traités par MRT 10 minutes après l'injection des nanoparticules Au@TADOTAGA, est inférieur à celui des rats traités uniquement par MRT. L'influence du délai entre irradiation et injection sur la survie plaide donc en faveur du suivi de l'agent thérapeutique par imagerie médicale. Il est en effet important lorsque les nanoparticules se trouvent en quantité significative dans les tissus cancéreux et sont absentes des tissus sains.

Références

- [1] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 352 (2005) 987–996.
- [2] P.Y. Wen, S. Kesari, Malignant Gliomas in Adults, *N. Engl. J. Med.*, 359 (2008) 492–507.
- [3] Glioblastome Association Michèle Esnault; Glioblastome/glioblastoma, origine, causes, diagnostic, pronostic, traitements <http://gfme.free.fr/maladie/glioblastome.html> Consulté le 01/08/2014, (n.d.).
- [4] O.L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A.F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A.A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, T. Cloughesy, Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 370 (2014) 709–722.
- [5] W. Thomlinson, P. Suortti, D. Chapman, Recent advances in synchrotron radiation medical research, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.*, 543 (2005) 288–296.
- [6] K.-J. Kim, Characteristics of synchrotron radiation, in: *AIP Conf. Proc.*, AIP Publishing, 1989: pp. 565–632.
- [7] Têteschercheuses Soleil et batteires <http://www.tetes-chercheuses.fr/magazines/numero-5/dossier/la-matiere-eclairée-272/> Consulté le 01/08/2014, (n.d.).
- [8] ESRF Microbeam Radiation Therapy (MRT) <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/Imaging/ID17/mrt-1> Consulté le 01/08/2014, (n.d.).
- [9] J.A. Laissue, H. Blattmann, H.P. Wagner, M.A. Grotzer, D.N. Slatkin, Prospects for microbeam radiation therapy of brain tumours in children to reduce neurological sequelae, *Dev. Med. Child Neurol.*, 49 (2007) 577–581.
- [10] F.A. Dilmanian, G.M. Morris, N. Zhong, T. Bacarian, J.F. Hainfeld, J. Kalef-Ezra, L.J. Brewington, J. Tammam, E.M. Rosen, Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy, *Radiat. Res.*, 159 (2003) 632–641.
- [11] A. Uyama, T. Kondoh, N. Nariyama, K. Umetani, M. Fukumoto, K. Shinohara, E. Kohmura, A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an *in vivo* study using implanted human glioma cells, *J. Synchrotron Radiat.*, 18 (2011) 671–678.
- [12] J.A. Laissue, G. Geiser, P.O. Spanne, F.A. Dilmanian, J.O. Gebbers, M. Geiser, X.Y. Wu, M.S. Makar, P.L. Micca, M.M. Nawrocky, D.D. Joel, D.N. Slatkin, Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, 78 (1998) 654–660.
- [13] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Bilotey, M. Janier, P. Perriat, G.

Le Duc, S. Roux, O. Tillement, The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 10 (2014) 1116–1124.

- [14] P. Regnard, G. Le Duc, E. Bräuer-Krisch, I. Troprès, E.A. Siegbahn, A. Kusak, C. Clair, H. Bernard, D. Dallery, J.A. Laissue, A. Bravin, Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing, *Phys. Med. Biol.*, 53 (2008) 861–878.
- [15] A. Bouchet, M. Bidart, I. Miladi, C. Le Clec’h, R. Serduc, C. Coutton, P. Regnard, E. Khalil, S. Dufort, B. Lemasson, J. Laissue, L. Pelletier, G. Le Duc, Characterization of the 9L gliosarcoma implanted in the Fischer rat: an orthotopic model for a grade IV brain tumor, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, 35 (2014) 6221–6233.

Conclusion générale

L'objectif de cette étude consistait à développer des nanoparticules d'or qui présentent les mêmes caractéristiques prometteuses, pour la radiothérapie guidée par imagerie, des nanoparticules Au@DTDTPA élaborées par l'équipe. La principale modification consiste à remplacer le ligand linéaire DTDTPA, qui constitue la couche organique de ces nanoparticules, par un ligand macrocyclique. L'utilisation de ce type de ligand présente l'intérêt de limiter le relargage du gadolinium, utilisé pour le suivi par IRM.

Différents ligands, comportant tous un macrocycle de type DOTA et une fonction disulfure endocyclique ont été synthétisés : le DTDOTA, TADOTA et TADOTAGA. Les légères différences (taille du cycle, nature du bras espaceur ou présence d'une fonction acide carboxylique supplémentaire) de ces molécules ont engendré des disparités notables entre les trois types de nanoparticules obtenus. La caractérisation poussée des différentes suspensions a permis d'éliminer les nanoparticules Au@DTDOTA en raison d'une taille trop importante et d'une stabilité colloïdale limitée. Entre les deux nanoparticules restantes, la suspension de nanoparticules Au@TADOTAGA s'est montrée la plus intéressante au niveau de son comportement après injection.

Les nanoparticules Au@TADOTAGA ont pu être suivies par différentes techniques d'imagerie médicale (SPECT, IRM et PET/IRM) en complexant différents ions (Gd^{3+} , ^{111}In , ^{64}Cu) au sein de la couche organique. Le comportement de ces nano-objets après injection intraveineuse s'est révélé prometteur. Ils circulent librement dans l'organisme et s'éliminent par voie rénale avec néanmoins une légère rétention hépatique. Malgré ces deux caractéristiques, les nanoparticules Au@TADOTAGA parviennent à s'accumuler au sein de certaines tumeurs comme le gliosarcome 9L et le carcinome mammaire TSA.

Les propriétés radiosensibilisantes des nanoparticules Au@TADOTAGA mise en évidence par des expériences de radiothérapie après injection intratumorale des nano-objets, ont été exploitées avantageusement après injection à des rats porteurs d'un gliosarcome 9L (tumeur radiorésistante au sein d'un organe radiosensible). Les rats traités par MRT 24h après l'injection des nanoparticules ont présenté une augmentation de survie d'un facteur 5 par rapport aux rats non traités et d'un facteur 2 par rapport aux rats traités uniquement par MRT.

Les nanoparticules Au@TADOTAGA se révèlent donc être extrêmement prometteuses pour la radiothérapie guidée par imagerie car elles combinent effet radiosensibilisant et plusieurs modalités d'imagerie médicale.

Cependant, ces nano-objets nécessitent quelques améliorations au niveau de la biodistribution, notamment, une diminution de la captation hépatique et une augmentation de l'accumulation au sein du gliosarcome. Pour ce faire, l'utilisation de PEG semble intéressante. Nous avons entrepris des études de greffage de différents PEG sur les nanoparticules Au@TADOTAGA ainsi qu'une étude d'imagerie IRM du cerveau de rats portant un gliosarcome après injection de ces nano-objets fonctionnalisés. Néanmoins, les résultats se trouvent en dessous de nos attentes et difficiles à exploiter sans expérimentation complémentaire. Cette stratégie reste donc à être approfondie. De plus, le greffage de peptides se révèle être une voie particulièrement intéressante pour améliorer l'accumulation tumorale. En effet, un peptide tel que le RGD va permettre un ciblage actif des vaisseaux qui irriguent la tumeur en raison de son affinité avec les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ présents en grande quantité au niveau des néovaisseaux.

Une autre perspective consisterait à comprendre le mécanisme de radiosensibilisation, notamment en réalisant de l'imagerie haute résolution afin de connaître la localisation des nanoparticules au sein des cellules. De plus, des analyses histologiques des organes d'intérêt (foie, reins) et de la tumeur se montreraient extrêmement intéressantes afin de localiser précisément les nano-objets.

Enfin, nous avons mis en évidence un effet radiosensibilisant significatif en combinant les nanoparticules avec la MRT. Il serait intéressant d'évaluer cet effet en utilisant un irradiateur d'hôpital classique qui présente l'avantage de permettre une thérapie plus simple à mettre en œuvre et plus réaliste.

Résumé

Mots-clés : Nanoparticules, oncologie, agent de contraste, radiosensibilisant, radiothérapie guidée par imagerie

Afin d'améliorer la sélectivité de la radiothérapie dans le cadre du traitement de certains cancers, nous proposons l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes fonctionnalisées pour le suivi par imagerie médicale. Ces objets dont la composition permet de combiner imagerie multimodale et activité thérapeutique télécommandée ouvrent la voie vers la thérapie guidée par imagerie. L'effet radiosensibilisant pourra être généré au moment le plus opportun, déterminé à partir des données fournies par l'imagerie. Ce travail de thèse consistait à concevoir, synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques, connus pour leur fort pouvoir complexant d'ions d'intérêt pour l'imagerie (Gd^{3+} pour l'IRM, $^{111}In^{3+}$ pour la TEMP et $^{64}Cu^{2+}$ pour la TEP). Le potentiel des différentes nanoparticules, à jouer le rôle d'agent de contraste multimodal (IRM, imagerie nucléaire) et d'agent radiosensibilisant a été évalué.

L'étude de biodistribution par imagerie TEMP/CT chez des souris a montré une libre circulation des nanoparticules et une élimination rénale avec une présence modérée des nanoparticules dans le foie qui n'est, cependant, pas due à un phénomène d'opsonisation. L'étude par IRM du cerveau de rats portant un gliosarcome a indiqué une accumulation significative des nanoparticules $Au@TADOTAGA-Gd^{3+}$ au sein de la tumeur. Enfin le co-marquage des nanoparticules d'or par Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$ (complexées par les ligands macrocycliques) a permis de suivre ces objets, chez le même animal, après injection intraveineuse, à la fois par TEP et IRM dont la combinaison bien que très recherchée est rarement mise en œuvre. Cette étude a confirmé la libre circulation, l'élimination rénale, la légère capture hépatique et l'accumulation au sein de la tumeur (carcinome mammaire).

Le caractère radiosensibilisant de la suspension de nanoparticule $Au@TADOTAGA$ a été confirmé par le suivi de croissance tumorale après traitement par irradiation MRT (microfaisceaux) 15 minutes après l'injection des nanoparticules par voie intratumorale. Le gain thérapeutique de la mise en œuvre de ce traitement a ensuite été validé par une irradiation MRT 24 heures après l'injection intraveineuse des nanoparticules à des rats portant un gliosarcome (tumeur radiorésistante dans un organe radiosensible).

Ce travail a montré que les nanoparticules d'or recouvertes de ligands macrocycliques de type DOTA présentent un fort potentiel pour la radiothérapie guidée par imagerie.

Abstract

Keywords : Nanoparticles, oncology, contrast agent, radiosensitizing agent, image guided therapy

The original properties of nanoparticles make them extremely attractive in the field of oncology. In fact, nanoparticles can be designed for combining imaging and therapy with only one object. Therefore, multifunctional platforms are very promising for image-guided therapy, which constitutes an important step towards personalization of treatment. This consists of stimulating the therapeutic activity of the nanoparticles when their accumulation is high within the tumor zone and low in healthy tissues. A higher selectivity of the treatment is therefore expected. The aim of this PhD work was to synthesize gold nanoparticles coated by macrocyclic ligands, known for their high complexing aptitude of ions widely used for imaging (Gd^{3+} for MRI, $^{111}In^{3+}$ for SPECT and $^{64}Cu^{2+}$ for PET). The potential of those nanoparticles to combining imaging multimodalities and radiosensitization was evaluated.

Biodistribution study by SPECT/CT has shown free circulation, renal elimination and a moderate retention by the liver of the nanoparticles. However, this retention is not due to the opsonisation processus. The MRI study of rats' brain carrying a gliosarcoma has shown an accumulation of nanoparticles $Au@TADOTAGA-Gd^{3+}$ in the tumor. Moreover, the co-labeling of these nanoparticles by Gd^{3+} and $^{64}Cu^{2+}$ was successfully performed. As a result, PET/MRI images, a much researched combination but rarely achieved, were acquired on the same animal after intravenous injection of the co-labeled nanoparticles. This study has confirmed the free circulation, renal elimination, low hepatic capture and tumor accumulation (carcinoma).

The radiosensitizing character of nanoparticles $Au@TADOTAGA$ was confirmed by the follow up of tumor growth after a treatment by MRT (microbeam irradiation) 15 minutes after intratumoral injection of nanoparticles. The therapeutic gain of this treatment has been validated by MRT 24 hours after intravenous injection of nanoparticles to rats carrying gliosarcoma (radioresistant tumor in radiosensitive organ).

Owing to their composition, these gold nanoparticles coated by macrocyclic ligand (DOTA-like) exhibit therefore a high potential for image-guided radiotherapy