



HAL
open science

Nanotubes de titanate comme nanovecteurs polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et sondes pour l'imagerie nucléaire

Alexis Loiseau

► To cite this version:

Alexis Loiseau. Nanotubes de titanate comme nanovecteurs polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et sondes pour l'imagerie nucléaire. Radiochimie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCK012 . tel-01799566

HAL Id: tel-01799566

<https://theses.hal.science/tel-01799566>

Submitted on 24 May 2018

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

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

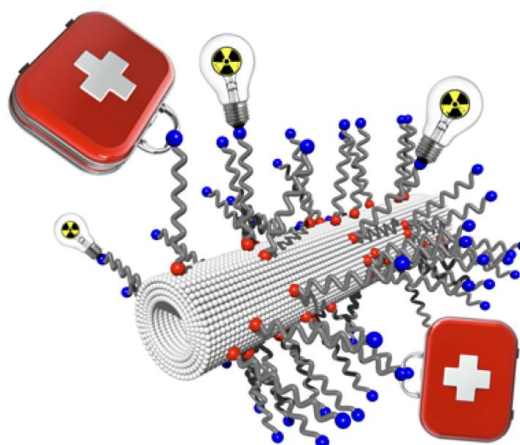
**THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT
UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ**

Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
UMR 6303 CNRS/Université Bourgogne Franche-Comté
École Doctorale Carnot-Pasteur

Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne
Mention Sciences, Spécialité Chimie-Physique

Par

Alexis LOISEAU



**Nanotubes de titanate comme nanovecteurs
polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et
sondes pour l'imagerie nucléaire**

Soutenue le 15 novembre 2017 à Dijon

Composition du Jury :

M. Jean-Luc BLIN
Mme Fabienne GAUFFRE
M. Olivier SANDRE
Mme Céline MIRJOLET
M. Stéphane ROUX
Mme Nadine MILLOT
M. Julien BOUDON

Prof. à l'Université de Lorraine, Président de la section CNU 31
Directrice de recherche CNRS à l'Université de Rennes
Directeur de recherche CNRS à l'Université de Bordeaux
Ingénieure de recherche au CGFL à Dijon
Prof. à l'Université de Franche-Comté
Prof. à l'Université de Bourgogne
Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne

Président
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe « (Bio)-Hybrid Nanoparticles and Nanostructures (BH2N) », animée par le Prof. Nadine Millot de l'axe Nanosciences du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS-Université Bourgogne Franche-Comté, à Dijon. Je tiens à remercier le Prof. Alain Dereux, actuel directeur du laboratoire ICB, et le Prof. Guy Millot, actuel directeur du conseil scientifique du laboratoire ICB, pour m'avoir accueilli au sein de cette structure.

L'ensemble de ces travaux de thèse, présentés dans ce manuscrit, a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). Les deux principaux projets scientifiques, dont cette thèse fait l'objet, ont été rendus possibles grâce au soutien financier incontournable de la Ligue contre le cancer Grand-Est (2012-2014) et du Cancéropôle Grand-Est (2015-2017), en collaboration avec le service de radiothérapie du centre anti-cancéreux de Bourgogne (Centre Georges-François Leclerc, CGFL), en particulier, pour les études biologiques réalisées. Merci également au soutien financier du conseil régional de Bourgogne Franche-Comté et du Fond Européen de Développement Régional (FEDER). Je tiens donc à remercier tout particulièrement ces organismes, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu aboutir.

Je suis aussi très reconnaissant envers les membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.

Mes plus sincères remerciements vont à Mme Fabienne Gauffre, directrice de recherche CNRS à l'Université de Rennes, et à M. Olivier Sandre, directeur de recherche CNRS à l'Université de Bordeaux, pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail de thèse et pour l'intérêt qu'ils ont montré à juger cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à M. Jean-Luc Blin, Prof. à l'Université de Lorraine et Président de la section CNU 31, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et de présider mon jury de thèse.

Je souhaite exprimer une reconnaissance particulière à Mme Céline Mirjolet, ingénieure de recherche au CGFL à Dijon, pour avoir pris le temps de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice et d'avoir été l'investigatrice des études in vitro et in vivo pour évaluer biologiquement les deux nanohybrides finaux sur des souris au sein du CGFL, sans qui l'aboutissement complet de ce projet n'aurait jamais pu avoir lieu. Merci aussi de m'avoir prodigué de nombreux et précieux conseils ainsi que d'avoir pris le temps de m'expliquer les phénomènes et les processus biologiques que j'ai rencontrés au cours de ces trois années de thèse, domaine qui m'était peu familier avant. Je tiens à vous remercier également de m'avoir laissé la chance d'assister à ces tests biologiques lors des injections intratumorales, aux séances de radiothérapie et d'imagerie nucléaire SPECT/CT.

Je tiens à remercier M. Stéphane Roux, Prof. à l'Université de Franche-Comté, pour être venu examiner ma thèse. Merci également de m'avoir fourni des échantillons de nanoparticules d'or modifiés par le DTDTA dans le cadre du projet NanoRadioPro, ainsi qu'à M. Nasser Mohamed Said, et pour votre expertise, les discussions et les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de cette thèse.

J'aimerais exprimer ma plus profonde gratitude à deux personnes en particulier pour leurs qualités professionnelles et humaines complémentaires. Cela m'a permis de m'améliorer chaque jour. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Mme Nadine Millot, Prof. à l'Université Bourgogne Franche-Comté, et à mon co-directeur de thèse Mr. Julien Boudon, Maître de

Conférences à l'Université Bourgogne Franche-Comté. Merci à vous deux d'avoir été présents tous les jours et à toute heure. Ce fut trois excellentes années passées à vos côtés.

Un grand merci à Mme Nadine Millot pour m'avoir donné la chance de réaliser mon stage de Master 2 sous sa direction au sein de son équipe et de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche scientifique. Grâce à votre dynamisme et à votre passion pour votre travail sur les nanotechnologies et le domaine biomédical, vous avez su me transmettre cette passion lors de vos enseignements pendant ma Licence et mon Master. Vous avez cru en mes capacités notamment durant mon stage de Master 2 pour ensuite me proposer ce sujet de thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir ouvert les portes du doctorat et je vous serai toujours reconnaissant de m'avoir donné goût à la recherche. Durant ces trois années de thèse, vous m'avez toujours soutenu pour réaliser ce sujet de thèse très prometteur, innovant, motivant, pluridisciplinaire tout en m'offrant une structure dans laquelle j'ai pu me former sur de nombreux appareils et procédés, qui seront un avantage certain pour mon avenir. Je tiens également à vous remercier pour votre enthousiasme, votre pédagogie, votre ouverture d'esprit, votre disponibilité et surtout votre honnêteté qui sont des qualités que j'ai fortement appréciées. De plus, vous m'avez accordé votre confiance en me laissant une parfaite autonomie de travail qui a été très enrichissante pour mon épanouissement professionnel. J'ai aussi eu la chance de pouvoir encadrer des travaux pratiques de céramique de 4^{ème} année d'École d'Ingénieur (ESIREM) durant mon monitorat dont vous étiez la responsable de ce module. Ce fut une expérience très enrichissante de pouvoir travailler avec vous.

J'exprime aussi mes plus sincères remerciements à M. Julien Boudon pour avoir cru également en moi durant mon stage de Master 2 et au cours de ces trois années de thèse. Je tiens particulièrement à vous remercier pour votre grande disponibilité et de m'avoir accordé votre précieux temps à chacune des difficultés que j'ai pu rencontrées durant ce travail de thèse. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos encouragements, votre patience, vos très bons conseils et votre intérêt pour les investigations scientifiques poussées. J'ai beaucoup appris à vos côtés surtout sur la synthèse, notamment sur la chimie organique ainsi que d'avoir confiance en mes capacités pour être un élément moteur de l'équipe et de savoir démonter, réparer et comprendre le fonctionnement d'un appareil qui est un élément essentiel dans la recherche scientifique. Vous avez une grande soif de connaissance et êtes un élément indispensable au laboratoire. Je tiens aussi à vous féliciter, ainsi que votre conjointe, pour la naissance de votre deuxième enfant, Esther, quelques jours avant ma soutenance de thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à tous les membres du CGFL ayant participé de près ou de loin aux projets pour réaliser les études biologiques in vitro et in vivo (injection intratumorale, radiothérapie, imagerie nucléaire SPECT/CT,...), sans qui l'aboutissement complet de ce projet n'aurait jamais pu avoir lieu, avec en particulier le Prof. Gilles Créhange, Céline Mirjolet, Véronique Morgand ainsi que Bertrand Collin, Romain Boidot, Alexandra Oudot, Mélanie Guillemain, Mathieu Moreau, Sandy Chevrier et Camille Drouet. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Un grand Merci à l'équipe du Prof. Laurence Motte, ainsi qu'au Prof. Erwann Guénin, qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire LVTS à l'Université Paris XIII pour réaliser des expériences de greffage concernant des phosphonates (acide alendronique et un poly(éthylène) glycol de type phosphonate) sur les nanotubes de titanate et qui m'ont apporté toute leur expertise.

Je remercie l'entreprise CheMatech pour m'avoir fourni l'agent macrocyclique, le DOTA, pour radiomarquer l'indium afin de réaliser de l'imagerie nucléaire SPECT/CT.

J'adresse également mes remerciements au Prof. Frédéric Bernard pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe MaNaPI au début de ma thèse et pour son dynamisme communicatif qui est essentiel à l'animation de cette équipe.

J'exprime ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe BH2N qui a participé de près comme de loin à mes travaux de thèse. Je remercie en particulier Lionel Maurizi pour son dynamisme, son savoir scientifique, et sa bonne humeur, à Lucien Saviot qui a toujours été présent, quel que soit le sujet, et de m'avoir permis de réaliser les caractérisations par spectroscopie Raman, ainsi qu'à Frédéric Bouyer pour sa connaissance scientifique. Je remercie également Yasmine Saibi et Sruthi Sudhakaran pour avoir réalisé des tests in vitro en amont sur des nanotubes de titanate modifiés. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de m'apporter des compétences supplémentaires dans le domaine biologique.

Un grand merci à l'ensemble des personnes du Département Technique d'Analyses – Instrumentation (DTAI) qui m'a permis de caractériser pleinement mes échantillons. Vous avez su partager vos connaissances, vos compétences et trouver des réponses sur les difficultés rencontrées au cours de cette thèse : Olivier Heintz (XPS), Rémi Chassagnon (MET) et Maxime Guérineau (BET).

De la même manière, je tiens à remercier pleinement Marie-Laure Léonard pour m'avoir permis de réaliser des caractérisations par spectroscopie IR au sein de l'ESIREM. J'ai eu le plaisir de travailler avec toi pendant mon monitorat lorsque j'ai encadré des groupes d'élèves à l'ESIREM. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je souhaite également remercier tous les enseignants qui ont cru en moi et avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces trois années de monitorat à l'ESIREM : Gille Caboche, Ioana Popa, Nadine Millot, Sandrine Gauffinet, Sophie Le Gallet, Marie-Laure Léonard, Lionel Combemale, Frédéric Désévéday. Ce fut très formateur et merci de m'avoir accompagné pour que je puisse encadrer dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'axe PMDM (Procédés Métallurgiques, Durabilité, Matériaux). Je remercie Florence Baras pour sa sagesse et pour les sujets très intéressants autour d'un café. Merci également à Sophie Le Gallet pour sa bonne humeur, pour les partages mais aussi pour nous rappeler qu'il y a une cotise café (pas de spam, promis). Comme déjà dit, je tiens aussi à te remercier pour l'aide que tu m'as apportée afin de réaliser au mieux les enseignements. Je tiens à remercier en particulier Ludivine Minier pour ta gentillesse, ta sportivité et ta motivation. Ce fut un grand plaisir de partager les repas du midi, les rires et les petites pauses quand tu venais nous rendre visite au bureau. Je remercie également Clémentine Madec pour son dévouement et ses intentions chaleureuses malgré son fort caractère ainsi que Yacine Kchaou pour sa gentillesse, ses bons gâteaux et les fous rires (dommage que nous ne nous sommes pas connus plus tôt). J'adresse également mes remerciements à Jean-Claude Nièpce, Olivier Bidault, Frédéric Demoisson, Olivier Politano et Foad Naimi (pour les échanges sportifs).

Je tiens à remercier tous les étudiants que j'ai pu avoir en travaux pratiques ainsi que tous les étudiants que j'ai pu encadrer au cours de mon doctorat. Parmi eux, Romain Civioc et Margaux Desseigne qui ont tous deux apporté une atmosphère chaleureuse, des sourires et une motivation pour le domaine scientifique qui ne fait aucun doute. J'ai eu un grand plaisir à travailler avec vous.

De très chaleureux remerciements pour tous ceux avec qui j'ai pu partager mon bureau. Désolé, cela n'a pas dû être facile pour tout le monde, surtout pour ceux qui avaient leur bureau à côté du mien.

Tout d'abord, j'exprime mes plus sincères remerciements à Fadoua Sallem qui est d'une extrême gentillesse et d'une très grande rigueur. Je n'oublierai pas tous ces moments passés avec toi que ce soit sur le plan scientifique par le biais de nos sujets de thèse similaires à base de nanotubes de titanate ou sur le plan humain avec tous tes petits gâteaux tunisiens ainsi que les rires que nous avons partagés. Tu as toujours été présente en prenant soin de nous. Désolé d'avance si nous t'avons pervertie.

Je remercie également Romaric Collet, le bodybuilder, pour sa sincérité, son franc-parler, ses musiques et son rire inégalable (bisous sur ton muscle), Guillaume Thomas pour les moments détentes, sa culture musicale, son aide scientifique ainsi que tous les bons moments passés au sein du bureau.

Merci également à Annette Luce pour sa sympathie et sa bonne humeur, ainsi que ses connaissances qui m'ont été d'une aide précieuse pour la compréhension des phénomènes biologiques.

Je tiens à remercier Arnaud Bolsonella, Gautier Laurent, Thomas Courant et Florent Crevat qui ont apporté une bonne convivialité, des sourires et une bonne ambiance même s'ils n'ont pas été officiellement dans le bureau.

Je tiens à remercier Adrien Fourmont, le petit nouveau, pour tous ces sujets intéressants, ta gentillesse et ton savoir (surtout en informatique). Ce fut également un plaisir d'avoir été ton moniteur en 3^{ème} et 4^{ème} année de l'ESIREM. J'espère que ce ne fut pas trop douloureux !!

Monsieur le Docteur Sylvain Lorand, mon grand acolyte, je tiens à te remercier pour tous ces incalculables fous rires et tous ces bons moments passés ensemble durant ces huit années à l'Université de Bourgogne. D'ailleurs, nous avons partagé le même bureau côte à côte lors des deux dernières années de thèse. Ce ne fut pas de tout repos entre l'atmosphère chaleureuse (et pas uniquement...) et l'albatros (spéciale dédicace). Tu es devenu plus qu'un ami au fil des années. Tu as toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. J'espère que j'aurai toujours le droit à tes gâteaux car ils ne sont quand même pas trop mal (on peut toujours faire mieux). Heureusement que tu étais là pour arrêter nos soirées FIFA à base de fromages et de vins. J'ai plaint les voisins à t'entendre perdre !! Tu es une personne sur qui je pourrai toujours compter et désolé si cela n'a pas toujours été simple avec mon tempérament. Encore merci pour tout ce que tu m'as apporté.

Je tiens également à remercier mes proches. Merci à ma mère et à mon père pour m'avoir donné la chance de réaliser ces études et pour le soutien pendant mes années de thèse car sans vous, je ne serai pas là à écrire ces lignes... Je profite aussi de cette occasion pour vous remercier pour ces vingt-six années et les autres à venir parce que je n'ai pas toujours l'occasion de le faire. J'ai été très heureux et touché de partager ce jour particulier en votre présence. Encore une fois, merci à tous d'avoir participé, de près ou de loin, à cette journée. Merci à mon frère qui lui aussi a été présent durant toutes ces années. Je suis admiratif de ton parcours et de tes capacités même si ce n'est pas toujours simple pour t'expliquer les choses !! Je tiens à faire un remerciement spécial pour mes grands-parents qui ont toujours été intéressés que ce soit sur le plan professionnel ou humain.

Merci également à mes amis que je n'ai pas eu l'occasion de remercier pour m'avoir toujours épaulé et soutenu jusqu'à ce jour : Dorian Chaumartin, Alexandre Samson, Florian Martiré, Jérémy Dumet et Enzo Bernard.

Un remerciement particulier à mon amie, Pauline Fromonteil, pour m'avoir soutenu jusqu'au bout. Merci d'avoir fait ce long voyage à partir de Glasgow pour assister à ma soutenance de thèse et pour tout ce que tu m'apportes et ce que tu m'apporteras jour après jour.

J'aurais souhaité vous remercier davantage et remercier d'autres personnes encore mais il m'aurait fallu écrire un autre mémoire pour cela.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION	13
CHAPITRE 1. CONTEXTE BIOMEDICAL ET STRATEGIE DE L’ETUDE	21
I. DEVELOPPEMENTS DES NANOMATERIAUX POUR LES TRAITEMENTS ANTI-CANCEREUX.....	23
I.1. <i>Challenges lors du ciblage et de la délivrance des médicaments</i>	23
I.1.1. Le principe de ciblage des nanomatériaux dans les tumeurs.....	23
I.1.2. Interaction synergique entre le ciblage tumoral et la chimio-radiothérapie	24
I.1.3. L’injection intratumorale : la voie la plus développée pour l’heure en nanomédecine.....	25
I.2. <i>Les nanovecteurs, une plateforme polyvalente en théranostique.....</i>	26
I.2.1. Généralités sur la notion de théranostique	26
I.2.2. Les nanomatériaux pour délivrer des médicaments dans les sites malades.....	28
I.2.3. Les nanomatériaux, de nouveaux outils de diagnostic pour l’imagerie guidée	29
I.3. <i>Impact des propriétés physico-chimiques des nanomatériaux sur leur internalisation, leur biodistribution et leur biocompatibilité</i>	30
I.3.1. Toxicité des nanomatériaux	30
I.3.2. Influence de la taille des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution	31
I.3.3. Influence de la morphologie des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution	32
I.3.4. Influence de la chimie et de la charge de surface des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution	33
II. LES NANOTUBES DE TITANATE ET LES NANOPARTICULES D’OR POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES	35
II.1. <i>Les nanotubes de titanate (TiONts).....</i>	35
II.1.1. Élaboration des nanotubes de titanate.....	35
II.1.2. Mécanisme de formation et morphologie des nanotubes de titanate.....	36
II.1.3. Les diverses applications des nanotubes de titanate.....	38
II.1.4. Les nanotubes de titanate, de nouveaux outils pour le secteur biomédical	39
II.2. <i>Les nanoparticules d’or (AuNPs).....</i>	45
II.2.1. Généralités sur les nanoparticules d’or	45
II.2.2. Synthèse des nanoparticules d’or utilisée dans cette étude.....	46
II.2.3. L’utilisation de nanoparticules d’or pour délivrer des substances actives de médicaments	47
II.2.4. Les nanoparticules d’or comme agents radiosensibilisants	48
II.2.5. Imagerie médicale à partir de nanoparticules d’or	49
II.3. <i>Conclusions</i>	51
III. MODIFICATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES POUR AMELIORER LEUR STABILITE COLLOÏDALE EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE	51
III.1. <i>Stabilisation par voie électrostatique</i>	53
III.2. <i>Stabilisation par voie stérique : choix du polyéthylène glycol</i>	54
III.3. <i>Stabilisation par voie électro-stérique.....</i>	55
IV. FONCTIONNALISATION DES NANOMATERIAUX PAR UNE MOLECULE D’INTERET	55
IV.1. <i>Greffage d’un agent thérapeutique à la surface de nanoparticules</i>	56
IV.1.1. Généralités sur l’utilisation combinée de plusieurs médicaments et/ou de plusieurs types de thérapie. L’intérêt des nanoparticules.	56
IV.1.2. La famille des taxanes comme agents chimiothérapeutiques.....	59
IV.1.3. Conclusions	61
IV.2. <i>Fonctionnalisation des nanoparticules pour l’imagerie médicale</i>	61
IV.2.1. Généralités.....	61
IV.2.2. Les agents chélatants de type acyclique	62

IV.2.3. Les agents chélatants de type macrocyclique	63
IV.2.4. Conclusions	64
V. LE MODELE DE CANCER CHOISI POUR CETTE ETUDE : LE CANCER DE LA PROSTATE.....	65
V.1. Données épidémiologiques.....	65
V.2. Les traitements actuels.....	67
V.3. Le traitement novateur proposé dans cette étude	68
VI. CONCLUSIONS.....	68
CHAPITRE 2. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL THERANOSTIQUE A BASE DE NANOTUBES DE TITANATE POUR LE TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE	71
I. SYNTHÈSE HYDROTHERMALE DES NANOTUBES DE TITANATE DANS NOTRE LABORATOIRE	73
I.1. Protocole expérimental de synthèse et de purification des nanotubes de titanate	73
I.2. Caractérisations des nanotubes de titanate.....	75
I.2.1. Étude morphologique et structurale des nanotubes de titanate.....	75
I.2.2. Composition chimique des nanotubes de titanate	77
I.2.3. Stabilité colloïdale en suspension des nanotubes de titanate	79
I.3. Conclusions.....	81
II. PRE-FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES NANOTUBES DE TITANATE PAR DES AGENTS DE COUPLAGE EN VUE DE LES STABILISER EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE	82
II.1. Modifications de surface par un agent de couplage électrostatique (alcoxysilane) aminé et par un agent stérique polymérique.....	82
II.1.1. Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) : un agent stabilisant électrostatique	82
II.1.2. Protocole expérimental du greffage du poly(éthylène) glycol : un agent stabilisant stérique	85
II.2. Caractérisations des TiONts pré-fonctionnalisés par les agents stabilisants	87
II.2.1. Confirmation du greffage de l'APTES et du PEG ₃₀₀₀ à la surface des TiONts	87
II.2.2. Estimation du taux de greffage de l'APTES et du PEG ₃₀₀₀ à la surface des TiONts.....	89
II.2.3. Influence du greffage sur la stabilité colloïdale	91
II.2.4. Conclusions	93
II.3. Tests biologiques <i>in vitro</i> des TiONts-APTES sur deux lignées cellulaires (BV2 et HepG2) et via différents tests	94
II.3.1. Tests biologiques <i>in vitro</i> des TiONts-APTES sur des cellules gliales de souris (BV2).....	94
II.3.2. Évaluation de la cytotoxicité des TiONts-APTES sur la lignée cellulaire humaine du cancer du foie (HepG2)	96
II.3.3. Évaluation du stress oxydant et d'une éventuelle génotoxicité créés par les TiONts-APTES.....	97
II.4. Conclusions.....	98
III. GREFFAGE D'UN AGENT THERAPEUTIQUE A LA SURFACE DES NANOTUBES DE TITANATE : LE DOCETAXEL	99
III.1. Stratégie utilisée pour le greffage du DTX sur les TiONts-PEG ₃₀₀₀	99
III.1.1. Utilisation d'un agent de couplage : le PMPI	99
III.1.2. Activation du DTX par le PMPI	100
III.1.3. Mise en évidence de l'activation du DTX par le PMPI	100
III.2. Fonctionnalisation des nanotubes de titanate par le DTX-PMPI.....	103
III.2.1. Synthèse des TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX.....	103
III.2.2. Caractérisations et validation du greffage de l'agent thérapeutique	104
III.2.3. Accroche partielle du DTX-PMPI <i>via</i> les fonctions amines de l'APTES et/ou adsorption à la surface du nanohybride.....	107
III.3. Conclusions.....	109
IV. GREFFAGE D'UN MACROCYCLE EN VUE DE LA DETECTION DU NANOHYBRIDE EN IMAGERIE MEDICALE.....	110
IV.1. Greffage d'un agent chélatant sur les amines libres à la surface des nanotubes de titanate : DOTA-NHS	110
IV.1.1. Protocole de synthèse des TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX-DOTA	110

IV.1.2. Mise en évidence et quantité de DOTA greffée	110
IV.2. Radiomarquage par l'indium 111 des TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX-DOTA.....	112
IV.3. Conclusions.....	112
V. ÉTUDES <i>IN VITRO</i> ET PRECLINIQUES AFIN D'ÉVALUER LE NANOHYBRIDE SUR DES TUMEURS DE PROSTATE	113
V.1. Tests de cytotoxicité du DTX-PMPI et du nanohybride final sur des lignées cellulaires de cancer de prostate	113
V.1.1. Lignée cellulaire 22Rv1.....	113
V.1.2. Lignée cellulaire PC-3	114
V.1.3. Conclusions	115
V.2. Études <i>in vivo</i> sur des souris Swiss nude mâles après injection intratumorale des TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX(-DOTA- ¹¹¹ In) (PC-3).....	115
V.2.1. Étude de biodistribution du nanohybride radiomarqué par l' ¹¹¹ In	116
V.2.2. Étude de l'évolution de la croissance tumorale de prostate sans et avec un traitement radiothérapeutique	118
V.3. Conclusions.....	120
VI. CONCLUSIONS.....	120
CHAPITRE 3. FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE TITANATE PAR DIVERS AGENTS STABILISANTS EN VUE D'AMÉLIORER LEUR STABILITÉ COLLOÏDALE DANS LES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES.....	123
I. PRE-FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE TITANATE PAR DIFFÉRENTES MOLECULES	125
I.1. Choix des agents de couplage	126
I.2. Agents de couplage siloxaniques en vue d'améliorer la stabilité colloïdale.....	127
I.2.1. Tentative d'optimisation du greffage de l'APTES sur les TiONts.....	127
I.2.2. Choix du N-(6-aminohexyl)aminométhyltriéthoxysilane (AHAMTES)	132
I.3. Modification de surface des TiONts par un catéchol.....	136
I.3.1. Généralités sur les catéchols.....	136
I.3.2. Choix de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA), de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique (DHCA) et de la nitrodopamine (NDOPA) pour stabiliser les suspensions de TiONts.....	138
I.4. Modification de surface des TiONts par des agents de couplage de type phosphonate	146
I.4.1. Généralités sur les agents de couplage de type phosphonate.....	146
I.4.2. Choix de l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA), de l'acide alendronique (ALD) et d'un poly(éthylène) glycol de type phosphonate ((HO) ₂ -(O)P-PEG-NH ₂).....	148
I.4.3. Conclusions sur les greffages des agents de couplage de type phosphonate, à la surface des TiONts	158
I.5. Conclusions sur les greffages de divers agents de couplage à la surface des TiONts.....	158
II. INFLUENCE DE LA LONGUEUR DE CHAÎNE ET DU MODE DE COUPLAGE PEPTIDIQUE SUR LE GREFFAGE DU PEG _N A LA SURFACE DES NANOTUBES DE TITANATE (HS-PEG _N -COOH ; N = 3000 ; 5000 OU 10 000).....	159
II.1. Influence du greffage de différents PEG _n à la surface des TiONts en milieu aqueux : EDC/NHS (HS-PEG _n -COOH ; n = 3000 ; 5000 ou 10 000).....	159
II.1.1. Mise en évidence du PEG _n à la surface des nanotubes de titanate	160
II.1.2. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur les propriétés de TiONts	160
II.2. Greffage des PEG _n sur les nanotubes de titanate en milieu organique (HS-PEG _n -COOH ; n = 3000 ; 5000 ou 10 000)	162
II.2.1. Couplage peptidique par le PyBOP	163
II.2.2. Synthèse des TiONts-APTES-PEG _n (n = 3 000, 5 000 ou 10 000) avec le PyBOP	163
II.2.3. Mise en évidence du PEG _n à la surface des nanotubes de titanate	164
II.2.4. Influence de la longueur de la chaîne carbonée sur les propriétés des TiONts	167
II.3. Conclusions sur l'influence de la longueur de chaîne PEGylée et du mode de couplage peptidique à la surface des TiONts	172

III. CONCLUSIONS.....	173
CHAPITRE 4. COUPLAGE DES NANOTUBES DE TITANATE AVEC DES NANOPARTICULES D'OR POUR AMELIORER L'EFFET RADIOSENSIBILISANT EN PRESENCE DE DOCETAXEL	177
I. GREFFAGE DES NANOPARTICULES D'OR SUR LES NANOTUBES DE TITANATE.....	180
I.1. <i>Greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES via les agents de couplage peptidique : EDC/NHS</i> 180	
I.1.1. Détermination préliminaire du nombre de DTDTPA à la surface des AuNPs	180
I.1.2. Protocole de greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES	181
I.2. <i>Mise en évidence des AuNPs-DTDTPA à la surface des nanotubes de titanate.....</i>	182
I.3. <i>Étude de la stabilité colloïdale des TiONts-APTES fonctionnalisés par les AuNPs-DTDTP</i>	184
I.4. <i>Estimation du taux de greffage des nanoparticules d'or à la surface des TiONts</i>	186
I.5. <i>Conclusions sur le greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES.....</i>	187
II. GREFFAGE DU HS-PEG ₃₀₀₀ -COOH A LA SURFACE DES TiONts-AUNPs.....	187
II.1. <i>Synthèse des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ via le PyBOP.....</i>	188
II.2. <i>Confirmation de la présence du PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts-AuNPs.....</i>	189
II.3. <i>Détermination de la quantité de PEG₃₀₀₀ greffé à la surface des TiONts-AuNPs.....</i>	191
II.4. <i>Influence du greffage des PEG₃₀₀₀ sur la dispersion et la stabilité colloïdale des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀</i>	192
II.5. <i>Conclusions sur le greffage d'un PEG hétérobifonctionnel à la surface des TiONts-AuNPs.....</i>	194
III. FONCTIONNALISATION DES TiONts-AUNPs-PEG ₃₀₀₀ PAR LE DOCETAXEL A DES FINS THERAPEUTIQUE	195
III.1. <i>Conditions de greffage du DTX sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀</i>	195
III.2. <i>Estimation de la quantité d'agent thérapeutique sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX.....</i>	196
III.3. <i>Étude de la stabilité colloïdale des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX</i>	197
III.4. <i>Conclusions sur le greffage du DTX à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀</i>	198
IV. TESTS DE CYTOTOXICITE DES TiONts-AUNPs-PEG ₃₀₀₀ ET DES TiONts-AUNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX SUR DES CELLULES PC-3	199
V. PRESENTATION DES ETUDES PRE-CLINIQUES APRES INJECTION INTRATUMORALE DANS DES TUMEURS PC-3 DES NANOHYBRIDES TiONts-AUNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX.....	200
V.1. <i>Présentation de l'étude de biodistribution des nanohybrides radiomarqués par l'¹¹¹In et premières images SPECT/CT.....</i>	200
V.2. <i>Présentation de l'étude de l'évolution de la croissance tumorale de prostate sans et avec un traitement radiothérapeutique.....</i>	202
VI. CONCLUSIONS.....	203
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	207
ANNEXES	I
REFERENCES	XXIII

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AHAMTES	<i>N</i> -(6-Aminoheptyl)aminométhyltriéthoxysilane
ALD	Acide alendronique
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane
ATG	Analyse thermogravimétrique
AuNPs	Nanoparticules d'or
BET	Brunauer Emmett Teller
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
CT	Tomodensitométrie X (Computed tomography)
DHCA	Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DOTA-NHS	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique possédant un ester activé
DTDTPA	Acide dithiolate diéthylènetriaminepentaacétique
DTG	Dérivée thermogravimétrique (dérivée en masse)
DTPA	Acide éthylènediaminetétraacétique
DTX	Docétaxel
EDC	1-Éthyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPR	Enhanced permeability and retention effect
EtOH	Éthanol
FWHM	Largeur à mi-hauteur (full width half maximum)
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICP	Spectrométrie à plasma induit (inductively coupled plasma)
IR	Spectroscopie infrarouge
IR-TF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IT	Intratumorale
ITLC	Instant thin layer chromatography
IV	Intraveineuse
LDOPA	<i>L</i> -3,4-Dihydroxyphénylalanine
MDR	Résistance multiple aux médicaments (multidrug resistance)
MES	Acide 2-(<i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique
MET	Microscopie électronique en transmission
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NDOPA	Nitrodopamine
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide

NODAGA	Acide 2-2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidine-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazononane-1-4-diyl) diacétique
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PEG _n	Poly(éthylène) glycol avec n défini comme le poids moléculaire (n = 3 000, 5 000, 10 000)
PEI	Polyéthylènimine
PIE	Point isolélectrique
PMPI	<i>p</i> -Maléimidophénylisocyanate
PET	Tomographie par émission de positrons (positron émission tomography)
PHA	Acide 6-phosphonohexanoïque
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species)
RT	Radiothérapie
SIRNA	Petits ARN interférents (small interfering RNA)
SPECT	Tomographie par émission monophotonique (Single-photon emission computed tomography)
SPIONs	Nanoparticules d'oxyde de fer (superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
SRE	Système réticulo-endothélial
STEM-HAADF	Microscopie électronique en transmission à balayage (en champ sombre)
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TDM	Tomodensitométrie X (Computed tomography)
TEP	Tomographie par émission de positrons (positron emission tomography)
TIONts	Nanotubes de titanate
UF	Ultrafiltration
UV-visible	Spectroscopie Ultraviolet-visible
VdW	Forces attractives de van der Waals
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X (X-ray photoelectron spectroscopy)

Introduction

Le cancer a un impact majeur sur la société d'aujourd'hui. Le cancer est le nom donné pour définir une multitude de maladies correspondant à une prolifération cellulaire incontrôlée échappant à tout mécanisme de défense de l'organisme. Ces cellules supplémentaires peuvent former des amas localisés appelé tumeurs. Il est l'une des causes principales de décès dans le monde avec plus de 8,2 millions de décès en 2012. Selon le *National Cancer Institute*, le nombre de nouveaux cas était de 14,1 millions en 2012 et devrait passer à 22 millions dans les deux prochaines décennies [1]. Rien qu'en France, avec 385 000 nouvelles personnes atteintes du cancer, il est la première cause de mortalité avec 149 500 décès en 2015 [2].

Le traitement de cette maladie est au cœur de thématiques interdisciplinaires associant la médecine, la pharmacie, la biologie cellulaire, la chimie et la physique et impliquant une cohésion au sein de la communauté scientifique. En effet, l'élimination de la tumeur doit être complète car la moindre cellule anormale suffit pour qu'une nouvelle tumeur se développe. En clinique, les principaux moyens utilisés pour éradiquer une tumeur sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans le cas de tumeur solide, la chirurgie s'adresse aux formes localisées de cancers à un stade précoce et elle reste le traitement le plus utilisé. Elle peut être combinée avec d'autres voies de traitements comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. La radiothérapie est aussi utilisée pour un traitement local et invasif vis-à-vis des cellules saines proches des cellules tumorales. Alors que la chimiothérapie repose sur l'administration de médicaments par voie systémique. Cette technique agit alors sur l'ensemble de l'organisme, ce qui engendre des effets secondaires avec l'apparition de phénomènes de résistance multiple aux médicaments [3].

De plus en plus d'études visent à localiser le traitement directement dans les zones requises par différentes stratégies afin d'amplifier son efficacité et limiter les effets secondaires. En effet, l'introduction d'un principe actif dans l'organisme peut voir ses effets limités soit par des barrières naturelles ou parce qu'il est hydrophobe par exemple [4]. De plus, souvent, ces molécules sont stockées dans différents organes ou éliminées trop rapidement par différents mécanismes. Ces problèmes majeurs ont pour conséquence une activité thérapeutique insuffisante sur la zone ciblée, impliquant des injections plus concentrées en médicaments qui conduisent à une toxicité importante pour l'organisme [5]. Les nanotechnologies appliquées à la santé ont pour principal objectif de remédier à ces problèmes.

Après être devenues incontournables dans divers secteurs comme celui de l'électronique ou de l'énergie [6], l'essor des nanotechnologies s'est aussi tourné vers des applications biomédicales ces dernières années [7]. Les propriétés remarquables des structures nanométriques (mécaniques, magnétiques, optiques, thermiques, chimiques, réactivité de surface) ont permis aux nanoparticules d'être exploitées en santé, notamment pour l'imagerie et/ou la thérapie. En effet, elles peuvent s'accumuler sur les sites tumoraux en raison de l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*, discuté mais avéré dans de nombreux cas) et passer de nombreuses barrières biologiques [8, 9]. Les nanoparticules offrent donc de nouvelles possibilités de traitement et de détection de maladies avec des tailles semblables aux macromolécules biologiques [10]. Pour l'heure, l'injection intratumorale est la technique la plus utilisée en clinique pour concentrer au maximum les nanoparticules dans les tissus malades tout en limitant leur diffusion dans l'organisme [11]. Les recherches actuelles visent à développer des nanoparticules théranostiques pour avoir à la fois des propriétés thérapeutiques et diagnostiques [12].

Cependant, les nanoparticules « nues » ne sont pas directement utilisables pour une application biomédicale. Elles ont tendance à s'agglomérer, pour minimiser l'énergie de surface, au détriment de leur stabilité colloïdale. Des fonctionnalisations par des molécules organiques sont alors nécessaires pour les rendre biocompatibles, éviter leur sédimentation dans les conditions physiologiques et maîtriser les interactions avec les organismes biologiques (effet d'opsonisation par exemple) [13-15]. D'autre part, ces modifications de surface permettent de greffer des agents thérapeutiques ou chélatants aux nanoparticules afin de leur ajouter des propriétés complémentaires [15, 16]. Des éléments, tels que l' ^{111}In ou le Gd^{3+} , peuvent être captés par des macrocycles en vue de mettre en œuvre des techniques d'imagerie adéquates [17]. On parle alors de nanohybride théranostique, *i.e.* alliant à la fois propriétés thérapeutiques et de diagnostic (Figure 1).

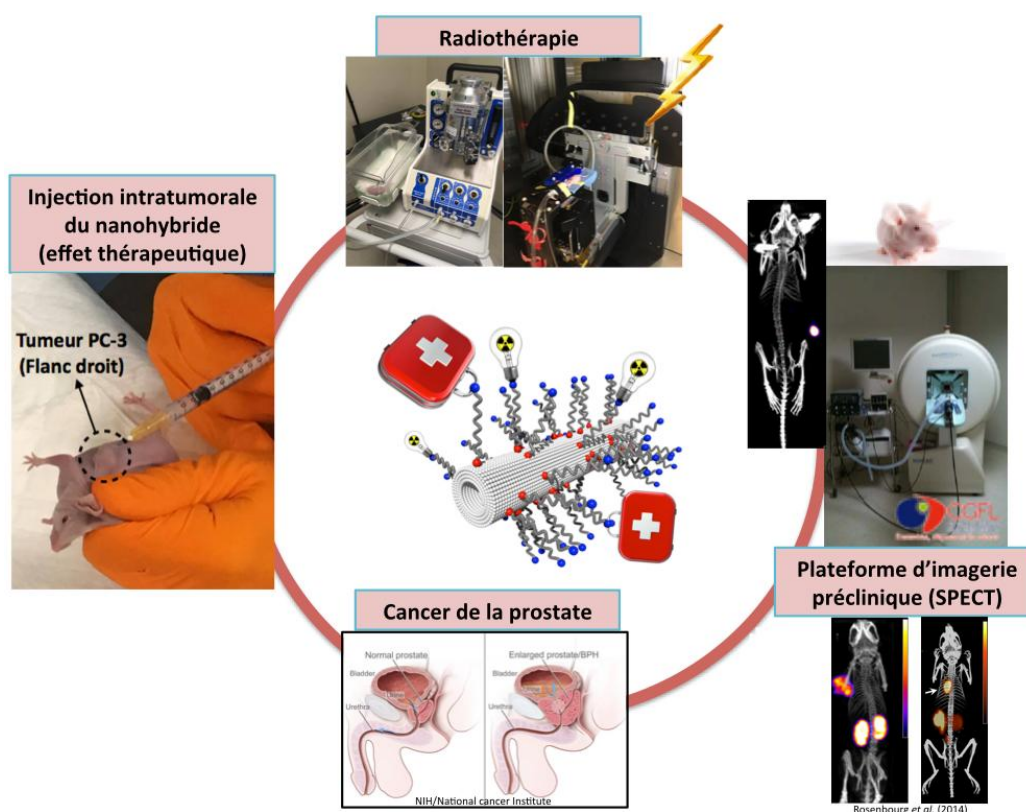


Figure 1 : Présentation d'un nanohybride théranostique multifonctionnels pour des applications thérapeutiques, radiothérapeutiques et d'imagerie médicale dans le cas d'un traitement pour le cancer de la prostate.

Les nanoparticules ont déjà fait leur preuve comme agents de contraste pour l'imagerie médicale. C'est particulièrement le cas des oxydes de fer, qui deviennent superparamagnétiques lorsque la taille des cristallites est inférieure à 20 nm, pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) [18] ou encore des nanoparticules d'or, avec leur forte capacité d'absorption des rayons X pour la tomodensitométrie X [19]. Outre l'aspect diagnostique, les nanoparticules possèdent des propriétés thérapeutiques intrinsèques selon leur taille, leur forme et leur composition chimique [10, 20]. Ainsi, les oxydes de fer sont utilisés pour l'hyperthermie [21] alors que les nanoparticules d'or et d'oxydes d'hafnium ou de gadolinium possèdent un effet radiosensibilisant [22, 23]. Une nouvelle approche thérapeutique consiste également à délivrer le principe actif en l'associant à un nanovecteur. Le rôle de ce dernier est alors de véhiculer le médicament au sein de l'organisme jusqu'à sa cible, d'où la nécessité d'équiper le nanovecteur de nombreuses fonctionnalités pour contourner les résistances aux médicaments, améliorer le ciblage, augmenter la concentration en principe actif dans les cellules

malades et conserver l'activité du produit [24]. Le choix du nanovecteur est alors important quant à sa biocompatibilité et à son internalisation dans les cellules.

Dans ce cadre, les thèses d'Anne-Laure Papa (2009) et de Jérémy Paris (2013), au sein du département Nanosciences du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, ont conduit au développement d'un nouveau nanovecteur à base de nanotubes de titanate (TiONts). Leur taille et leur morphologie atypique conduisent à une très bonne internalisation dans les cellules, à l'instar des nanotubes de carbone qui ont déjà fait leurs preuves [23, 25, 26]. Les TiONts possèdent également un effet radiosensibilisant et n'induisent pas de cytotoxicité aux doses étudiées [23, 26].

Durant ce travail de thèse, une attention particulière s'est portée sur le cancer de la prostate car il est le deuxième cancer le plus diagnostiqué chez l'homme. 30 à 50% des patients atteints du cancer de la prostate, à un stade avancé, ont une rechute locale après un traitement radiothérapeutique. Ce type de cancer requiert à ce jour des solutions thérapeutiques nouvelles, notamment en cas de récurrence et pour des cancers radiorésistants.

L'objectif de ces travaux est donc d'élaborer des nanohybrides théranostiques, à base de nanotubes de titanate (TiONts), pour vectoriser et immobiliser des agents radiosensibilisants, ceci afin de lutter contre le cancer de la prostate, après injection intratumorale et ainsi pouvoir réduire les effets secondaires néfastes par rapport aux traitements actuels. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de la conception de ce nanohybride comme sa taille, sa composition chimique, sa stabilité colloïdale et les modifications de sa surface. Pour ce faire, ce nouveau nanovecteur a été développé étape par étape avec plusieurs objectifs à atteindre (Figure 2).

- 1) La maîtrise et la reproductibilité de la synthèse des nanotubes de titanate sont incontournables pour obtenir la morphologie, la biocompatibilité et la composition chimique désirées.
- 2) Une des étapes clés est la modification de surface du nano-objet par des molécules organiques. Le but est d'apporter des fonctions plus réactives en surface et d'améliorer à la fois la biocompatibilité et la stabilité colloïdale en suspension, dans des conditions physiologiques.
- 3) Ensuite, des molécules d'intérêts biologiques comme des agents thérapeutiques, radiosensibilisants ou chélatants sont aussi accrochées à la surface des TiONts. Leurs propriétés sont utilisées pour des applications en thérapie et en imagerie.
- 4) La dernière étape constitue la validation des nanohybrides par des tests biologiques (*in vitro* et *in vivo*) sur des modèles de cancer de prostate. Ces essais permettent d'une part, d'évaluer la toxicité des nanohybrides et d'autre part, il s'agit aussi d'évaluer l'impact et l'influence du traitement après injection intratumorale sur des souris, tout en étudiant la biodistribution des nanotubes dans l'organisme.

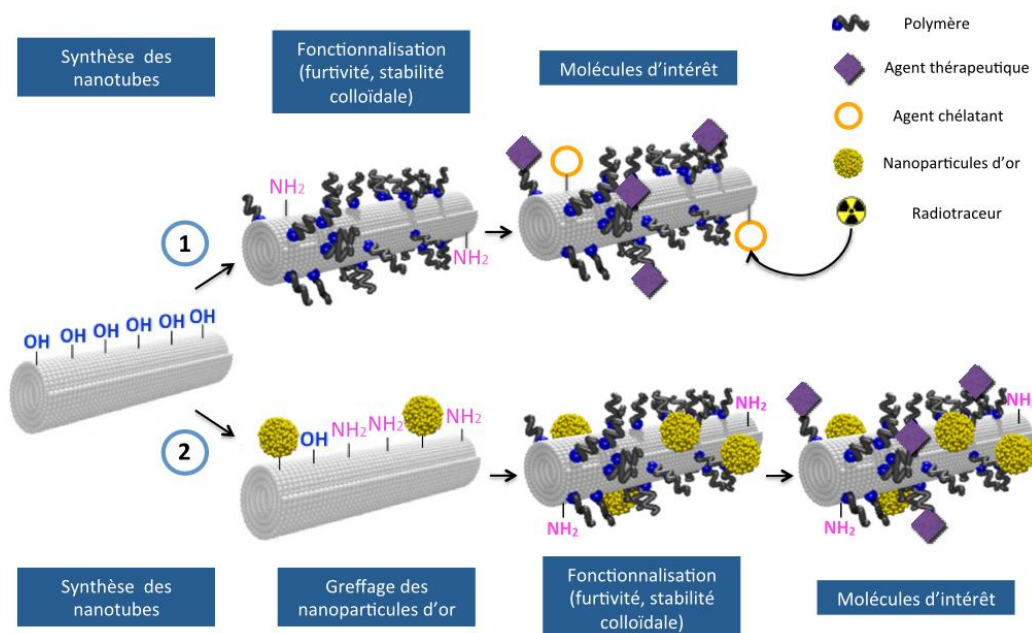


Figure 2 : Illustration des deux stratégies d'élaboration étape par étape du nanohybride à base de nanotubes de titanate pour des applications biomédicales.

Ce manuscrit de thèse est décliné en quatre chapitres pour comprendre les stratégies mises en place et le développement du nanohybride à base de TiONts.

La première partie s'intéresse aux enjeux et à la place que prennent les nanomatériaux dans le secteur biomédical. Ce chapitre se focalise particulièrement sur les nanotubes de titanate pour leur propriété de vectorisation mais aussi sur les nanoparticules d'or et le docétaxel (un agent thérapeutique) pour leur effet radiosensibilisant. Enfin, le dernier point abordé dans cette section détaille la stratégie d'élaboration des nanohybrides qui est menée dans cette étude, afin d'améliorer les traitements actuels.

Le second chapitre porte tout d'abord sur la synthèse et les caractérisations des nanotubes de titanate développés au sein du laboratoire. Dans un second temps, la surface des TiONts est modifiée par un agent de couplage de type électrostatique (alcoxysilane : APTES) et un agent de couplage de type stérique (poly(éthylène) glycol : HS-PEG₃₀₀₀-COOH). Ces modifications de surface sont nécessaires pour améliorer la biocompatibilité, la stabilité colloïdale et pour apporter des fonctions plus réactives en surface des TiONts. La partie suivante expose la stratégie mise en place pour accrocher un agent thérapeutique, le docétaxel (DTX), cliniquement bien établi pour traiter le cancer de la prostate. Il s'agit de le modifier par un linker, le *p*-maleimidophenyl isocyanate (PMPI) avant de le greffer sur le polymère hétérobifonctionnel, en surface des nanotubes. La fonctionnalisation des nanotubes de titanate par un agent chélatant est aussi abordée en vue de la détection du nanohybride en imagerie médicale. Enfin, la dernière partie traite des tests biologiques *in vitro* pour évaluer la cytotoxicité des nanohybrides développés, sur deux lignées cellulaires de prostate (22Rv1 et PC-3). Puis, des études *in vivo* de biodistribution du nanohybride et d'évolution de croissance tumorale (avec et sans radiothérapie), sur un modèle murin, sont présentées.

Le troisième chapitre traite des modifications possibles à la surface des TiONts pour améliorer la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des nanotubes. La première partie de ce chapitre consiste à décrire la fonctionnalisation des TiONts nus par différentes molécules organiques : AHAMTES, catéchols

(LDOPA, DHCA et NDOPA), phosphonates (PHA, ALD et $(HO)_2-(O)P-PEG-NH_2$). La seconde partie est consacrée au greffage d'un PEG avec différentes longueurs de chaîne de polymère ($HS-PEG_n-COOH$, $n = 3000, 5000, 10000$) par deux voies : utilisation d'agents de couplage peptidique EDC/NHS (milieu aqueux) ou PyBOP (milieu organique). L'objectif est d'améliorer la biocompatibilité de notre nanohybride et d'observer l'influence de la longueur de chaîne du polymère sur les taux de greffage et sur la stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Enfin, des résultats *in vitro* sur des cellules PC-3 sont présentés pour montrer l'influence de la longueur de chaîne de PEG vis-à-vis de l'activité du DTX une fois greffé à l'extrémité du polymère.

Le quatrième et dernier chapitre s'inscrit dans la continuité des deux précédents avec ici comme objectif d'accroître l'effet radiosensibilisant du nanohybride, en le couplant avec des nanoparticules d'or, elles-mêmes modifiées par le DTDTPA. Cette nouvelle combinaison a pour objectif le maintien des AuNPs par les TiONts dans la tumeur, afin d'améliorer l'effet de la radiothérapie. Grâce aux AuNPs modifiées par le DTDTPA, le nanohybride est également détectable par SPECT/CT. Le greffage des AuNPs, formant un nouveau nanohybride théranostique à base de TiONts, est décrit et prouvé par différentes caractérisations. Enfin, l'évaluation de ce deuxième nanohybride est effectuée par des premiers tests biologiques de cytotoxicité sur des cellules PC-3 et des essais précliniques, en cours.

Pour finir, la conclusion de ce manuscrit regroupe les résultats essentiels et met en avant le potentiel des nanohybrides élaborés lors de ces travaux de thèse. Des perspectives envisageables pour continuer l'évaluation biologique des nanohybrides et optimiser les différentes étapes de greffage, ainsi que l'efficacité thérapeutique, sont aussi présentées.

Chapitre 1. Contexte biomédical et stratégie de l'étude

L'objectif de ce premier chapitre est de présenter les notions nécessaires à l'élaboration de nouveaux nanomatériaux pour les traitements anti-cancéreux. Les principales propriétés physico-chimiques des nanotubes de titanate (TiONts) et des nanoparticules d'or (AuNPs) sont également décrites afin de comprendre l'intérêt de ces nanomatériaux pour ces applications biomédicales. Ainsi, les modifications de surface nécessaires pour ces nanomatériaux sont expliquées, afin de contrôler la chimie de leur surface et leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Ces fonctionnalisations ont aussi pour but d'apporter *in situ* des agents radiosensibilisants/chimiothérapeutiques pour obtenir un effet thérapeutique et des agents chélatants pour les rendre détectables par imagerie médicale. Enfin, la dernière partie de ce chapitre traite du modèle de cancer choisi, celui du cancer de la prostate, constituant la finalité de ces travaux de thèse.

I. Développements des nanomatériaux pour les traitements anti-cancéreux

Face à la difficulté de traiter certains types de cancer, l'intérêt pour les nanomatériaux s'est accru pour ces applications depuis deux décennies. En effet, leurs dimensions intéressantes et leurs propriétés physico-chimiques ont fait l'objet de multiples travaux montrant leur capacité à éradiquer des cellules tumorales [20]. Il est alors possible d'entrevoir des stratégies afin d'avoir à la fois un aspect thérapeutique et un aspect d'imagerie (théranostique) [4, 12] en profitant des caractéristiques de l'environnement tumoral et en contrôlant différents paramètres physico-chimiques des nanoparticules [27].

I.1. Challenges lors du ciblage et de la délivrance des médicaments

I.1.1. Le principe de ciblage des nanomatériaux dans les tumeurs

Une tumeur correspond à une prolifération excessive et incontrôlée de cellules anormales sans se soumettre aux mécanismes de contrôle du système immunitaire. De la même manière qu'une cellule saine, la cellule tumorale se développe en créant de nouveaux vaisseaux sanguins permettant d'assurer sa croissance. Ce phénomène est alors appelé la néoangiogenèse [28]. La vascularisation des tissus tumoraux comporte des pores de diamètres plus élevés et ces tissus sont donc plus perméables que les tissus sains. Ceci, ajouté à un faible drainage lymphatique, conduit à une hausse de l'accumulation sélective dans les cellules tumorales de nanoparticules injectées par voie systémique. Ce phénomène est appelé l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) [9, 28]. Cet effet permet d'envisager des stratégies intéressantes à partir de nanoparticules pour augmenter la concentration de l'agent thérapeutique vers la tumeur car les molécules utilisées actuellement pour le traitement anti-cancéreux ont tendance à diffuser dans tout l'organisme [29, 30].

Les nano-objets sont de plus en plus utilisés pour vectoriser des principes actifs de médicaments [31, 32], ils sont dans ce cas appelés nanovecteurs. Cette méthode alternative aux traitements actuels de chimiothérapie permet de pallier leurs inconvénients en ciblant plus spécifiquement les cellules malades, pour diminuer les effets secondaires [29, 33, 34]. La nanovectorisation permet donc de concentrer un agent thérapeutique sur la zone à traiter afin d'améliorer son efficacité, sans agir sur les cellules saines. Elle permet également d'éviter des phénomènes de résistances aux médicaments développés par les cellules malades, provoquant une rechute locale [4, 35, 36]. Lorsque seul l'effet EPR est mis à profit, le ciblage est alors qualifié de passif (Figure 3) [29]. De plus en plus, il est possible d'améliorer l'efficacité du traitement avec un ciblage actif (Figure 3) [29]. L'idée est alors de greffer sur les nanoparticules des molécules qui se lient spécifiquement à des récepteurs exprimés par les cellules malades ; ce qui favorise l'internalisation du nanovecteur dans ce type de cellules [37].

En ce qui concerne le cas des tumeurs solides (qui représentent 90% des cancers humains avec deux types tumoraux : les carcinomes, issus de cellules épithéliales et les sarcomes, issus de cellules des tissus conjonctifs) [29], il est préférable que l'internalisation ne se fasse pas trop rapidement afin que la diffusion de l'anticancéreux, se trouvant sur le nanovecteur, soit optimale sur tout le volume de la tumeur. Le ciblage passif est donc privilégié dans ce cas.

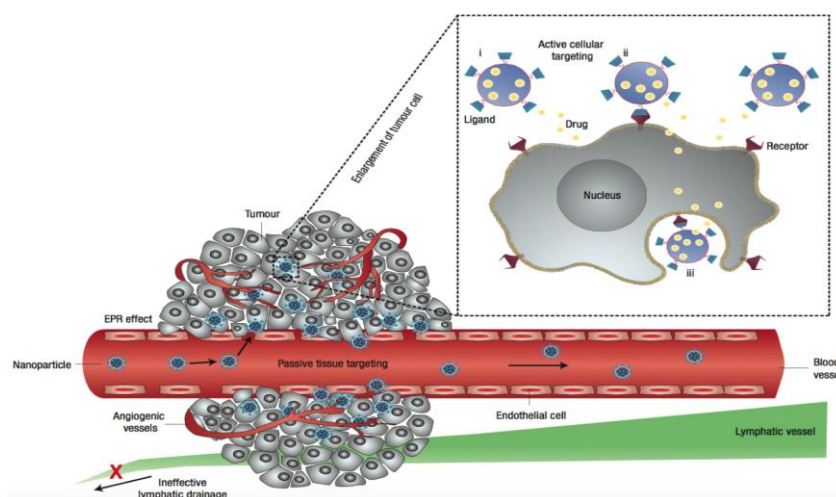


Figure 3 : Illustration du ciblage passif et actif dans les cellules tumorales par des nanoparticules [29].

I.1.2. Interaction synergique entre le ciblage tumoral et la chimio-radiothérapie

Actuellement, les techniques les plus utilisées pour les traitements anticancéreux sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans le cas de la radiothérapie, de fortes doses d'irradiation ne sont pas toujours possibles ; notamment dans le cas de sites malades se trouvant en profondeur, les tissus sains environnants étant alors fortement touchés lors du traitement [38]. Elle est très souvent associée à la chimiothérapie afin d'amplifier le pouvoir radiosensibilisant sur le site tumoral, tout en réduisant les doses de radiations. De plus, la chimio-radiothérapie est bénéfique par rapport à la chirurgie seule [39].

Le développement des nanovecteurs a permis une nouvelle approche du traitement des tumeurs. En améliorant le ciblage thérapeutique, comme expliqué précédemment, les nanoparticules permettent alors d'améliorer la délivrance d'agents chimiothérapeutiques mais aussi d'accroître

spécifiquement les radiations directement dans la tumeur, tout en diminuant les doses de radiations appliquées, à l'aide d'un agent radiosensibilisant [19, 40]. Par ailleurs, l'effet radiosensibilisant peut être induit directement par des nanoparticules inorganiques du fait de leurs propriétés intrinsèques (voir paragraphe I.2.1.1.) [19, 30]. Actuellement, des essais cliniques sont en cours en France sur des nanoparticules d'oxyde d'hafnium (Nanobiotix) [41] et d'oxyde de gadolinium (TherAguix)¹. Avec cette approche, les doses d'irradiations appliquées aux tumeurs solides peuvent garder leur efficacité thérapeutique tout en épargnant les organes sains [42]. Les nanovecteurs apportent donc de nouvelles voies de développement pour améliorer l'efficacité des traitements actuels en créant une cohésion entre le ciblage tumoral et une synergie de propriétés chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques.

I.1.3. L'injection intratumorale : la voie la plus développée pour l'heure en nanomédecine

A ce jour, l'administration d'un agent chimiothérapeutique ou d'un agent radiosensibilisant peut se faire de façon cutanée, orale, pulmonaire et par voie intraveineuse (IV) ou intratumorale (IT). La voie IV 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. Cependant, pour maîtriser leur biodistribution et leur bioélimination, il est nécessaire de réaliser différentes modifications de surface sur les nanoparticules. La voie IT est donc pour l'heure privilégiée dans le cas des essais cliniques réalisés sur des nanoparticules inorganiques. Malgré tout, l'injection en IT de principes actifs n'est pas encore établie comme une alternative à l'administration d'agents thérapeutique dans les pratiques cliniques courantes. Même si ce mode d'injection est pratiqué dans le cas de tumeur solide avec une taille suffisante, les limitations de cette technique concernent les faibles tailles de tumeur, les cancers sanguins et métastatiques. D'autres limitations proviennent de l'élimination relativement rapide des principes actifs lors de leur administration en IT, de leur grande toxicité dans les tissus environnant et de la disponibilité d'autres traitements standardisés et qui ont déjà fait leur preuve (radiothérapie et chirurgie) par rapport aux types de tumeurs accessibles par injection IT (tumeurs cutanées ou peu profondes) [31, 43].

L'association des nanoparticules avec l'injection en IT fait de plus en plus l'objet d'études car elle permet de concentrer davantage le principe actif dans la tumeur et la biodistribution des nanoparticules se trouve limitée [40]. Ainsi, concernant des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un macrocycle (DOTA) radiomarké par du cuivre 64, une plus forte accumulation dans les tumeurs et une plus faible concentration dans les tissus sains ainsi que dans les organes environnants a été observée en IT contrairement à l'injection IV [43]. Surtout, l'administration IT a permis aux équipes concernées de bénéficier de la réglementation liée aux Dispositifs Médicaux (DM) lors de leurs essais cliniques et non à celle plus contraignante liée aux médicaments, ce qui est le cas des essais cliniques en cours autour du produit de la société Nanobiotix¹.

¹ <https://www.clinicaltrials.gov/> consulté le 25 août 2017.

I.2. Les nanovecteurs, une plateforme polyvalente en théranostique

I.2.1. Généralités sur la notion de théranostique

Malgré les grandes avancées technologiques en diagnostic, une quantité non négligeable de patients atteints de cancers sont encore diagnostiqués avec des stades avancés (métastases) en raison des limitations en matière de sélectivité et de sensibilité. Pour remédier à ces problèmes, plusieurs stratégies ont été élaborées, certaines basées sur la nanovectorisation multifonctionnelle, dans laquelle la détection de maladie et la thérapie peuvent être combinées [20, 44]. Cette notion, appelée théranostique, définit un système contenant à la fois un agent thérapeutique et d'imagerie ayant plusieurs objectifs (Figure 4). Les nano-objets apparaissent comme une plateforme polyvalente en théranostic afin d'amener ces agents directement dans les sites tumoraux [32].

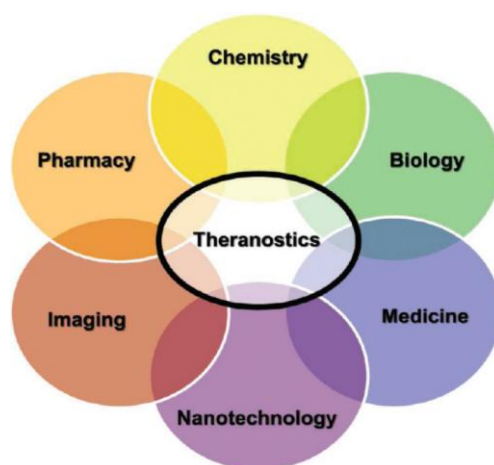


Figure 4 : Représentation schématique de la pluridisciplinarité du mot théranostic [34].

De plus en plus d'études visent à exploiter l'énorme potentiel des nanoplateformes pour cibler le diagnostic et la thérapie afin d'obtenir des images de grande qualité et de pouvoir améliorer l'efficacité thérapeutique sans toucher les cellules saines [12, 33, 45] (Figure 5). D'un côté, la fonctionnalisation des nanovecteurs par des agents thérapeutiques, incluant des principes actifs chimiques ou biologiques (protéines et peptides) [25] et par des agents chélatants (acyclique ou macrocycle) [46, 47], capables de piéger des éléments lourds ou des radioéléments [48], est un élément essentiel pour apporter des fonctionnalités complémentaires pour la notion de théranostic [12, 45]. Et d'un autre côté, les nanomatériaux avec leurs propriétés intrinsèques peuvent être utilisés pour l'imagerie comme les nanoparticules à base d'oxyde de fer, d'or ou de *quantum dots* [10, 32, 47] et pour le volet thérapeutique grâce à leurs propriétés intrinsèques conduisant à de l'hyperthermie ou à une radiothérapie exacerbée [34] (voir paragraphe I.2.1.1.).

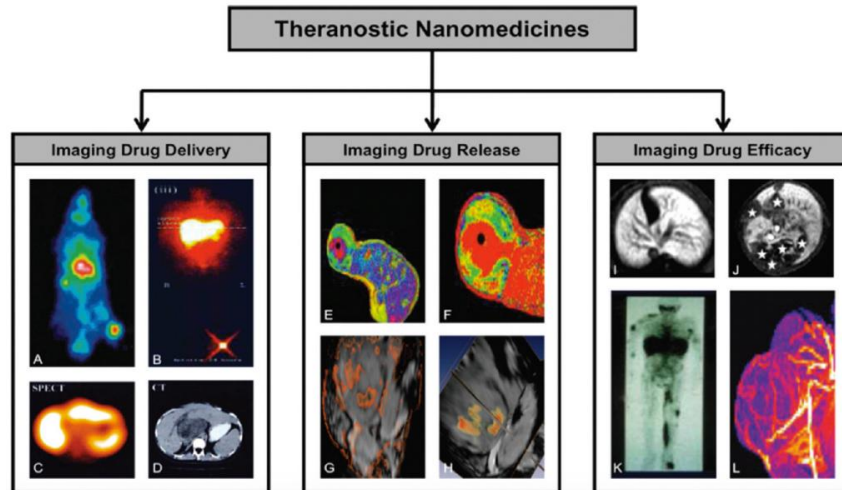


Figure 5 : Utilisation de la nanomédecine théranostique pour imager (A-D) l'administration de médicaments, (E-H) la libération de médicaments et (I-L) pour observer l'efficacité des médicaments [34].

I.2.1.1. Les nanomatériaux comme nouveaux nanomédicaments *via* leurs propriétés intrinsèques

Le domaine des nanoparticules inorganiques a été exploré pour un grand nombre de matériaux et de tailles diverses pour des applications en biologie et en médecine allant de la nanoparticule établie pour la thérapie [49], aux biocapteurs [50]. Les propriétés des particules varient drastiquement lorsqu'elles deviennent nanométriques. Les principaux paramètres de ces changements sont un rapport surface sur volume élevé et un effet de confinement [51].

Ainsi, les nanoparticules présentent des interactions avec l'utilisation d'une source lumineuse pour offrir de nouvelles opportunités pour des techniques d'imagerie. C'est le cas des *quantum dots* (photoluminescence) [52] ou encore des nanoparticules d'or (résonance plasmonique de surface) [53, 54]. De plus, ces interactions peuvent permettre des traitements thérapeutiques notamment avec la thérapie photodynamique, menant à une modification biochimique d'une fonction cellulaire qui va inciter la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS en anglais) par action de la lumière [7, 55], et la thérapie photothermique, qui génère de la chaleur à partir d'un champ électromagnétique, dégradant les sites ciblés [16]. Pour ce dernier cas, appelé aussi, hyperthermie, les nanoparticules les plus développées sont les oxydes de fer en raison de leur composition chimique et leur propriété magnétique unique [56]. Des résultats prometteurs ont été obtenus sur des cancers de prostate ou des glioblastomes [13, 57]. Une des plus importantes applications des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIONs) est par ailleurs leur utilisation comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) [18]. En effet, des nanoparticules d'oxyde de fer sont déjà commercialisées pour des applications en IRM [58].

Certaines nanoparticules sont de plus en plus étudiées pour leur effet radiosensibilisant en émettant des rayonnements par des interactions rayonnement-matière (électrons ou rayons X) créant des radicaux libres pour causer des dégâts sur les sites d'accumulation des nanoparticules. Le concept consiste en l'utilisation de matériaux avec un numéro atomique élevé pour optimiser les interactions rayonnement/matière à l'intérieur des tumeurs, augmentant ainsi localement les doses de radiations [30, 59, 60] (Figure 6). Après que Matsudaira a observé cet effet radiosensibilisant de l'iode sur des cultures cellulaires [61], de nombreuses études se sont intéressées aux particules d'or qui semblent les

plus prometteuses. En effet, elles ont un numéro atomique plus élevé que l'iode, une meilleure biocompatibilité pour l'organisme et elles paraissent intéressantes pour des applications impliquant l'imagerie X incontournable en imagerie médicale [22]. Dans notre équipe, une étude publiée en 2013 avait montré que les nanotubes de titanate possèdent intrinsèquement un effet radiosensibilisant sur des lignées cancéreuses de glioblastomes [23] malgré un numéro atomique plus faible que l'or ou l'iode, 22 contre 79 ou 53 respectivement.

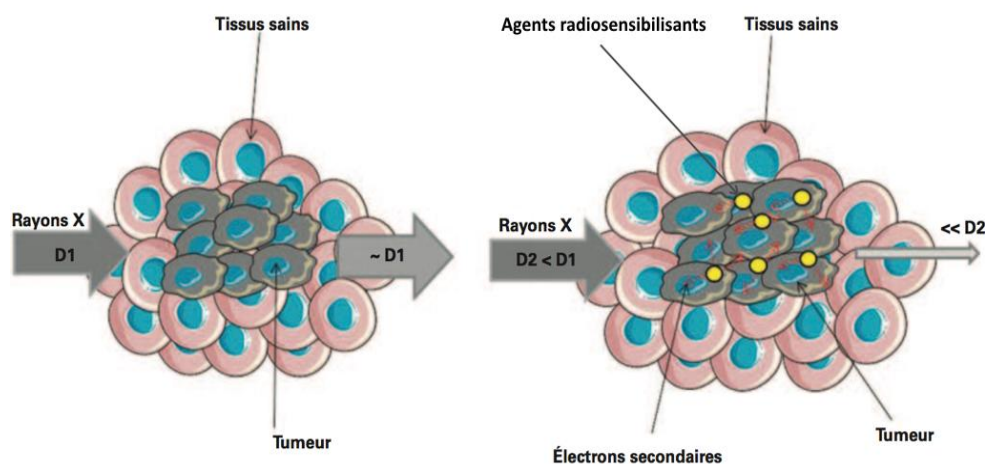


Figure 6 : Principe de l'utilisation d'agents radiosensibilisants pour la radiothérapie [60]. $D1$ et $D2$ correspondent aux doses de radiations envoyées sans et avec des agents radiosensibilisants respectivement ($D1 > D2$). Copyright 2014, Techniques de l'Ingénieur.

Par conséquent, le développement de nanomatériaux avec des propriétés appropriées qui peuvent être activées à distance par un stimulus extérieur 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 nanomatériaux peut alors être commandée et contrôlée à distance par une interaction avec un stimulus aux caractéristiques physiques connues et maîtrisées.

I.2.2. Les nanomatériaux pour délivrer des médicaments dans les sites malades

De nos jours, le ciblage spécifique de médicaments et la délivrance de gène dans les sites malades sont des domaines très porteurs dans lesquels les nanoparticules jouent un rôle essentiel. La nanomédecine offre d'énormes avantages pour la délivrance de médicaments qui sont fortement insolubles dans l'eau et instables dans les conditions biologiques [62]. Elle permet alors de réduire le dosage, d'améliorer les effets et de limiter les effets secondaires [63]. Cette technologie peut permettre de protéger les médicaments contre la dégradation lorsqu'ils sont encapsulés [64]. Le rapport élevé entre la surface active et le volume des nanomatériaux ainsi que la relative facilité de fonctionnalisation de leur surface chimique [65], permettent d'encapsuler ou d'attacher de grandes quantités de médicaments incluant des agents de chimiothérapie, des plasmides et des petits ARN interférents,

siRNA² [10, 30, 33]. Les nanomatériaux peuvent améliorer significativement le temps de circulation dans le sang pour distribuer efficacement les principes actifs avec un délai d'élimination rénale contrôlé. Ils sont aussi capables de délivrer des médicaments aux cellules cancéreuses en utilisant sélectivement la physiopathologie des tumeurs, tels que l'effet EPR et le microenvironnement tumoral [7, 36]. Ce système combine simultanément, avec efficacité, la survie du patient et la qualité de vie, en augmentant la concentration intracellulaire des médicaments et en réduisant les doses des injections. Les propriétés de surface du nanovecteur jouent alors un rôle central dans l'influence de ces processus [66]. En conséquence, il y a un intérêt croissant dans l'élaboration des nanovecteurs pour leurs caractéristiques de surface, afin d'éviter la reconnaissance rapide par les phagocytes et par le système réticulo-endothélial (SRE³) [8]. Les modifications de surface sont principalement réalisées par PEGylation⁴ pour rendre les nanovecteurs furtifs et agir préférentiellement sur les sites infectieux [67]. D'autres polymères comme le PVA [68], le chitosan [36] ou le dextran [36] sont également utilisés.

I.2.3. Les nanomatériaux, de nouveaux outils de diagnostic pour l'imagerie guidée

L'imagerie devient un élément incontournable du développement des médicaments aussi bien pour contrôler la délivrance du principe actif que pour évaluer la réponse à la thérapie ciblée [44] (Figure 7). L'imagerie permet en effet de contrôler si le principe actif a bien été libéré à l'endroit visé [69]. De plus, l'inclusion d'un agent imageant peut aider dans la détermination de la cinétique d'élimination et de la distribution tissulaire des médicaments en utilisant de manière non invasive des techniques d'imagerie telles que la SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography en anglais ou Tomographie par Emission MonoPhotonique en français), la PET (Positron Emission Tomography en anglais ou Tomographie par Emission de Positrons, TEP en français), la CT (Computed Tomography en anglais ou TomoDensitoMétrie, TDM en français), l'IRM ou encore les méthodes optiques [70].

L'agent de contraste en imagerie peut aussi être utilisé pour déterminer la probabilité du médicament à atteindre la tumeur et dans quelle teneur. Ainsi, le traitement devient plus efficace et rentable. De plus, la FDA⁵ (Food and Drug Administration) exige la disponibilité d'un test de détection de maladie afin de choisir les patients pour des thérapies ciblées et dans de nombreux cas, ces tests de diagnostic sont fondés sur des observations à l'aide d'agents imageants [71]. Les médicaments à base de nanomatériaux ont un avantage supplémentaire sur des médicaments libres avec leur potentiel pour être des transporteurs multifonctionnels capables de vectoriser aussi bien des agents d'imagerie pour le diagnostic que des agents thérapeutiques [72]. Un certain nombre de nanomatériaux, tels que des nanoparticules d'or, des *quantum dots* et des nanoparticules d'oxyde de fer, ont été testés en combinant une thérapie (chimiothérapie et radiothérapie) et de l'imagerie guidée pour améliorer

² Les petits ARN interférents (*small interfering RNA* dont l'abréviation est siRNA en anglais) sont de petits ARN double brin composés de plusieurs nucléotides. Ils peuvent se lier à une séquence d'ARN messagers (copie d'une portion d'ADN lors de l'expression des gènes) pour empêcher ou inhiber l'expression de gènes et rompre le codage de la nouvelle traduction de la protéine.

³ SRE : Ensemble de cellules disséminées dans l'organisme (foie, lymphatiques, moelle osseuse, rate,...) qui vont jouer le rôle d'épuration en absorbant les corps étrangers mais aussi de participer aux défenses immunitaires.

⁴ La PEGylation désigne une réaction chimique entre des chaînes de poly(éthylène) glycol et ici la surface des nanoparticules.

⁵ FDA : Cet organisme américain autorise, entre autres, la commercialisation des denrées alimentaires et des médicaments sur le territoire des Etats-Unis.

significativement le potentiel de la thérapie sur des tumeurs solides et obtenir un meilleur ciblage du traitement [42, 44, 55].

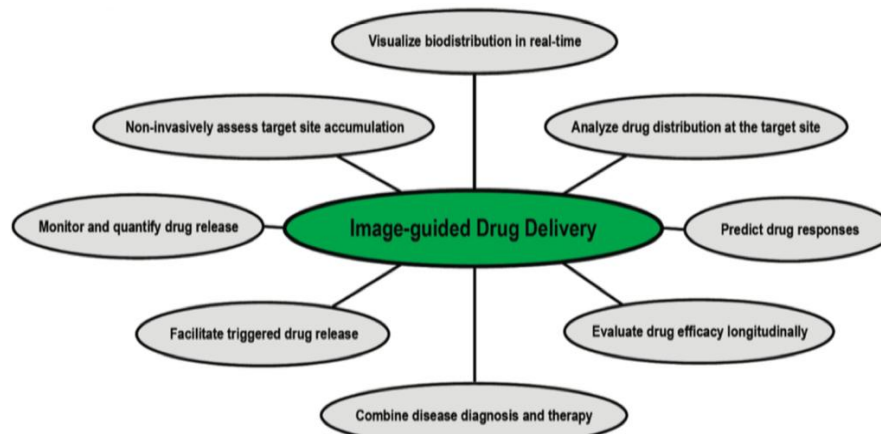


Figure 7 : Représentation des différentes applications de l'imagerie guidée pour la thérapie [44]. Copyright 2010, Elsevier Ltd.

I.3. Impact des propriétés physico-chimiques des nanomatériaux sur leur internalisation, leur biodistribution et leur biocompatibilité

Les nanoparticules doivent présenter des propriétés physico-chimiques adéquates pour garantir leur stabilité colloïdale en suspension lors de leur injection ainsi que pour contrôler leur internalisation et/ou leur maintien dans les tumeurs, ceci afin de jouer pleinement leur rôle thérapeutique et/ou de diagnostic. Ces caractéristiques sont la taille, la chimie de surface, la morphologie et la charge de surface des nanoparticules. Ces paramètres physico-chimiques ont des implications significatives dans l'internalisation cellulaire, la biodistribution et dans les processus biologiques engendrés par les nanoparticules [73]. La connaissance de ces paramètres permet aussi d'évaluer le danger potentiel des nanoparticules sur l'environnement et la santé humaine [74].

I.3.1. Toxicité des nanomatériaux

Les possibilités offertes par les applications en médecine des nanoparticules suscitent de nombreux débats, éthiques et sanitaires. Les effets induits par des nanomatériaux sur l'organisme et sur l'environnement font de plus en plus l'objet d'études pour déterminer leur toxicité et leur biodistribution [75]. Des études épidémiologiques sur l'exposition aux particules ultrafines ont démontré que les nanomatériaux respirables peuvent engendrer diverses maladies aux poumons, au système cardiovasculaire et au système nerveux par rapport aux particules de plus grandes dimensions et de composition similaire [75]. En effet, les suies de combustion utilisées au quotidien sont composées principalement d'agrégats de nanotubes, de nanofibres et de nanoparticules de carbones et même l'air ambiant en contient [76]. Par exemple, l'exposition par inhalation aux nanotubes de carbone chez l'animal induit des effets génotoxiques, des réponses inflammatoires ainsi que des troubles cardiovasculaires [77]. Des études ont montré que la toxicité des nanomatériaux est dépendante de leur taille, de leur forme, de leur composition chimique, de leur surface spécifique, de leur structure, de leur fonctionnalisation de surface, de leur stabilité colloïdale, ainsi que de la concentration administrée, du

temps d'exposition et du type de cellules utilisées [77]. Pour toutes ces raisons, il n'y a pas un modèle unique, pour évaluer la toxicité des nanomatériaux et chaque type d'application ou chaque type de nanoparticule développé, doit conduire à des études de cytotoxicité spécifiques. La fonctionnalisation des nanomatériaux est alors importante pour transformer un potentiel risque de toxicité en un système biologiquement favorable.

Quelques études de toxicité sur des nanoparticules quasi-sphériques de TiO₂ ainsi que sur des nanotubes de titanate existent. Une étude *in vivo* a montré que les nanoparticules de TiO₂ ont induit des inflammations respiratoires, de la cytotoxicité, du stress oxydant et de la génotoxicité dans les poumons chez le rat après plusieurs expositions respiratoires [78]. Cependant, ces nanoparticules n'ont pas montré d'effet cytotoxique ou de génotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires lors des études *in vitro* [76]. Il est à noter que tous ces travaux n'ont pas utilisé la même taille ou la même phase cristalline des nanoparticules de TiO₂. Concernant les nanotubes de titanate (TiONts), peu d'études relatent leur toxicité *in vitro* ou *in vivo*. Néanmoins, les TiONts n'ont pas montré de cytotoxicité particulière sur les types cellules étudiées [26, 76] (voir paragraphe II.1.4.).

I.3.2. Influence de la taille des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution

La plupart des nano-objets sont internalisés dans les cellules à travers des processus d'endocytose au contact de la membrane cellulaire (Tableau 1) [27, 79]. Leur taille doit être contrôlée car ce paramètre clé affecte le taux d'accumulation dans les cellules et les mécanismes d'internalisation. Chithrani a montré que pour des nanoparticules d'or sphériques dont la taille varie de 10 à 100 nm, l'internalisation dans des cellules HeLa⁶ a été optimale avec une taille de 50 nm [80, 81]. Il a aussi été démontré que la cinétique d'internalisation et la concentration de saturation varient selon les tailles des nanoparticules : la taille de 50 nm était la plus efficace pour ce type de nanomatériau alors que pour les nanobâtonnets d'or, plus la longueur est faible et plus l'internalisation cellulaire est favorisée [80, 81].

Type d'endocytose	Brève description	Taille des vésicules formées
1) Phagocytose	Intervention de protéines particulières (opsonines) pour marquer les éléments étrangers afin de favoriser ce processus d'élimination par l'action des phagocytes	0 - 10 µm
2) Pinocytose	Internalisation d'un petit volume extracellulaire. Plusieurs voies pinocytaires sont possibles	100 nm
3) Macropinocytose	Internalisation d'un grand volume extracellulaire	> 1 µm
4) Endocytose dépendante de clathrine	Formation de puits qui permettent de récupérer des molécules spécifiques	≈ 120 nm
5) Endocytose assistée par les cavéoles	Formation de cavéoles à revêtement de cavéoline pour l'accumulation de molécules extracellulaire dans la cellule par les récepteurs d'un ligand de liaison spécifique.	≈ 50 - 60 nm

Tableau 1 : Une brève description des principales voies endocytaires [27].

⁶ Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse humaine provenant de métastase d'un cancer du col de l'utérus.

La taille des pores endothéliaux des tissus tumoraux peut être comprise entre 100 nm et 1 µm alors que ceux des tissus sains sont de l'ordre de 5 nm [4, 82]. Pour optimiser le temps de circulation des nanoparticules dans l'organisme et favoriser l'effet EPR, la taille minimale des particules est de 5 nm afin d'éviter également la filtration rénale [7, 80]. De plus, l'effet EPR favorise l'accumulation passive des nano-objets dont la taille est inférieure à 500 nm [83]. Une troisième limite est imposée par le SRE, les mécanismes de phagocytoses et les capillaires sinusoides de la rate et du foie. Pour toutes ces raisons, la taille hydrodynamique optimale des nanoparticules devrait être comprise entre 50 et 150 nm [84-86].

Des formulations de nanoparticules contre le cancer ont été déjà approuvées en encapsulant le principe actif (Doxil : PEGylated liposomal doxorubicin, DaunoXome : Liposomal Daunorubicin, Abraxane : 130-nm Paclitaxel-albumin nanoparticle et Marqibo : vincristine sulfate liposome) avec des tailles variant de 80 à 130 nm de diamètre [86]. Toutefois, l'utilisation de plus petites particules a montré une distribution plus uniforme dans les tissus [85]. Plus important, la quantité de principes actifs encapsulés dans de petits nano-objets reste deux fois plus importante après 24 h dans la tumeur en comparaison de nanoparticules de taille deux à trois fois plus importante [73]. Ceci pourrait être dû à une densité de poly(éthylène) glycol (PEG) greffée (paragraphe I.3.4. et III.2.) plus importante pour de petites particules que pour des tailles de particules plus importantes (pour une même quantité de PEG en surface des particules) [84].

I.3.3. Influence de la morphologie des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution

La forme des nanoparticules est un élément essentiel à prendre en compte pour l'internalisation, la cytotoxicité, la biodistribution et les échanges intracellulaires des nano-objets dans l'organisme [86]. Les principales morphologies utilisées en nanomédecine sont montrées en Figure 8.

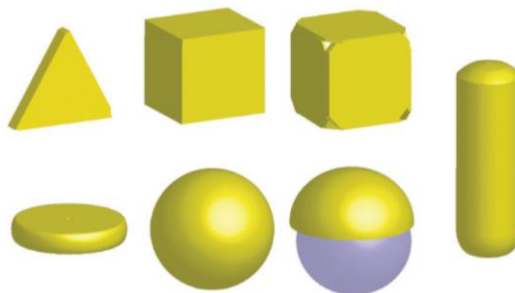


Figure 8 : Les différentes formes de nanoparticules utilisées en nanomédecine : prismes à triangle, cubes, cages tronquées, disques, sphères, structure « cœur-enveloppe » et cylindrique [7].

Plusieurs études ont exploré l'influence de la morphologie sur la biodistribution et l'internalisation surtout avec des nano-objets en formes de bâtonnet en comparaison avec des formes sphériques [80]. Les nanoparticules de forme sphérique ont tendance à avoir un temps de circulation plus élevé et à s'accumuler davantage dans la plupart des organes alors que ceux possédant une forme cylindrique ont tendance à se déposer majoritairement dans le foie [85]. Concernant l'internalisation cellulaire, dans la plupart des cas, la forme tubulaire des nanoparticules facilite leur internalisation par rapport aux formes sphériques pour un volume et une surface spécifique similaire [26]. De manière contradictoire, il a été montré que des nanoparticules d'or sphériques sont plus internalisées par endocytose que les nanobâtonnets d'or [27, 80]. Cependant, certaines contradictions peuvent être expliquées par des paramètres non identiques entre les études, comme la chimie de surface ou la

surface développée. Par ailleurs, une étude a montré que la forme des nanoparticules de TiO_2 (nanosphère, nanobâtonnet et nanotube) joue un rôle important sur l'adsorption de protéine à leur surface dictant ainsi leur biocinétique et leur comportement *in vivo* [87].

I.3.4. Influence de la chimie et de la charge de surface des nanoparticules sur leur internalisation et leur biodistribution

Les propriétés de surface des nanoparticules conditionnent fortement leur cheminement dans l'organisme. Or, pour la plupart des nanoparticules inorganiques, il est nécessaire d'apporter des modifications de surfaces à l'aide de molécules organiques afin d'améliorer leur biocompatibilité et d'éviter leur sédimentation dans les conditions physiologiques [14, 88, 89] (voir paragraphe III.). Ces modifications permettent également d'ajouter de nouvelles fonctionnalités aux nanoparticules en vue de l'imagerie et/ou de la thérapie [15, 16, 36, 90].

Les nanoparticules chargées négativement, positivement ou hydrophobes sont rapidement piégées par le SRE *via* des interactions non spécifiques avec les opsonines pour être éliminées de l'organisme [33]. Des preuves d'absorption de nanoparticules chargées négativement par les cellules ont été reportées, malgré l'interaction défavorable entre les nanoparticules et la membrane cellulaire chargée négativement elle aussi [90]. Par rapport aux nanoparticules de charges neutres et négatives, celles chargées positivement sont les plus efficaces pour la pénétration et l'internalisation cellulaire (Figure 9) [27]. Cependant, il a été montré que les nanoparticules chargées positivement à leur surface ont une activité cytotoxique plus importante et favorisent la production de ROS endommageant les cellules [91]. Des résultats sur des cellules HeLa ont montré que les nanoparticules chargées, soit négativement soit positivement, n'affectent pas seulement les capacités d'internalisation mais aussi les mécanismes endocytaires [92]. De plus, les nanoparticules chargées négativement montrent un taux inférieur d'endocytose et délaissent les voies endocytaires assistées par la clathrine. Alors que les nanoparticules chargées positivement s'internalisent très rapidement *via* la voie endocytairienne indépendante de la clathrine.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la surface des nanomatériaux est couverte par une couche d'adsorption de protéines lors de leur pénétration dans le milieu biologique appelée « couronne protéique » [93]. Elle influence fortement la reconnaissance des nanoparticules par les cellules, ainsi que leur comportement *in vitro* et *in vivo* [41]. La charge de surface des nanoparticules est l'un des principaux facteurs influençant l'adsorption des protéines formant la corona protéique [93] : les protéines préfèrent se lier sur des surfaces chargées positivement. Cependant, la nature du matériau a également montré son importance sur l'adsorption des protéines puisque elles ont tendance à s'attacher préférentiellement sur un substrat de silice enrobé de nanoparticules de TiO_2 ou d'or, même chargée négativement par rapport au substrat composé seulement de silice [68].

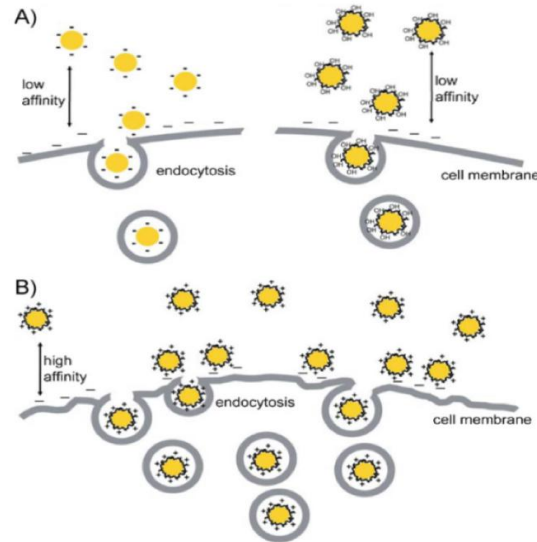


Figure 9 : Illustration schématique sur l'influence des charges à la surface des nanoparticules concernant l'internalisation dans les membranes cellulaires [27]. Copyright 2009, American Chemical Society.

Pour augmenter leur temps de circulation, la charge de surface est aussi essentielle. Les nanoparticules chargées négativement présentent une forte interaction avec le SRE. Tandis que les nanoparticules chargées positivement induisent l'adsorption de protéine sérique sur leur surface causant l'agglomération des particules et favorisant leur élimination *via* l'opsonisation. Les nanoparticules chargées peuvent ainsi être inaptes à délivrer les principes actifs directement aux sites malades [27]. Pour éviter cela, les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées avec des ligands neutres tel que le poly(éthylène) glycol (PEG) ou l'un de ses dérivés, qui sont tous des polymères hydrophiles, accrochés par adsorption ou de manière covalente [86]. Les PEG ont déjà été utilisés sur différents types de nanoparticules incluant les liposomes, les nanoparticules polymériques et les nanoparticules hybrides [94]. Ce type de polymère réduit l'adsorption de protéines sur les nanoparticules, améliore leur stabilité colloïdale et minimise l'opsonisation non seulement par encombrement stérique mais aussi en masquant les charges à la surface des nanoparticules [89, 95]. Ceci évite l'élimination rapide des nanovecteurs modifiés par ces ligands neutres et contribue à augmenter leur transport cytoplasmique [73, 96]. En effet, des études ont montré que la PEGylation permettait de réduire les mécanismes d'interaction réticulo-endothéliale et d'augmenter l'internalisation dans les cellules tumorales, favorisant l'efficacité thérapeutique [97]. Il a aussi été montré que le greffage de PEG à la surface de nanoparticules d'oxyde de fer réduit l'agglomération dans un milieu de culture cellulaire et l'internalisation non spécifique par les macrophages (Figure 10) [27]. Par ailleurs, le poids moléculaire des PEG et les quantités utilisées jouent un rôle déterminant sur l'internalisation des nanoparticules [98]. Par conséquent, ces nano-objets circulent jusqu'à trois fois plus longtemps que leur homologue chargé et sont distribués de manière plus homogène dans les divers tissus [86]. La charge neutre sur la surface des nanoparticules peut aussi être obtenue par des modifications de surface avec des ligands zwitterioniques (autant de charges positives que négatives) [99].

La charge des nanoparticules influence donc grandement la pénétration tumorale. Il est alors indispensable de contrôler les propriétés de surface des nanoparticules pour optimiser l'impact biologique des nanomédicaments.

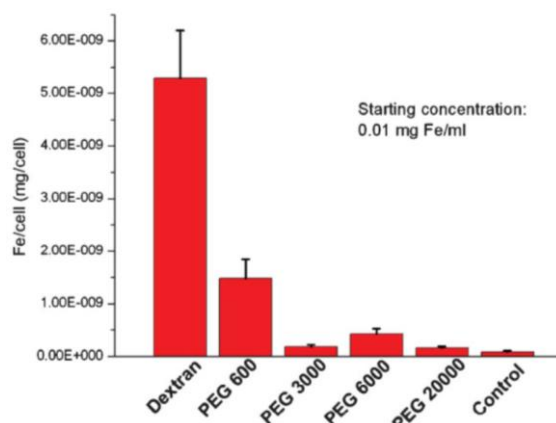


Figure 10 : Analyse ICP-AES de l'adsorption des nanoparticules d'oxyde de fer en présence de dextran ou de poly(éthylène) glycol selon les différentes longueurs de chaînes par les macrophages [27].

II. Les nanotubes de titanate et les nanoparticules d'or pour des applications biomédicales

Cette partie est dédiée spécifiquement aux deux types de nanomatériaux dont ces travaux de thèse font l'objet. Une présentation générale des nanotubes de titanate (TiONts) est effectuée, matériau au cœur de cette thèse, mais également de celle des nanoparticules d'or (AuNPs) qui seront greffées à la surface des nanotubes, approche décrite dans le Chapitre 4. Leurs méthodes de synthèse et leurs applications, notamment pour le domaine biomédical sont ici présentées.

II.1. Les nanotubes de titanate (TiONts)

II.1.1. Élaboration des nanotubes de titanate

Depuis l'observation des nanotubes de carbone par Iijima en 1991 [100], les nanotubes de titanates (TiONts) ont été étudiés de façon approfondie [101, 102] à la suite de leur découverte en 1998 par Kasuga [103]. Plusieurs études décrivent la synthèse des nanotubes à base de titane à partir de différentes méthodes (Tableau 2).

Méthodes	Nature	Longueur	Diamètre externe	Références
Sol-gel	TiO ₂	8 µm	200 nm	[104]
	TiO ₂	-	70 – 100 nm	[105]
Traitement électrochimique (anodisation)	TiO ₂	250 nm	25 – 65 nm	[106]
	TiO ₂	200 nm	100 nm	[107]
	TiO ₂	100 nm	20 nm	[108]
Micro-ondes	TiO ₂	200 – 1000 nm	8 – 12 nm	[109]
Hydrothermal	TiONts	100 nm	8 nm	[103]
	TiONts	100 nm	9 nm	[110]
	TiONts	-	7 nm	[111]
	TiONts	-	6,4 – 9,3 nm	[112]
	TiONts	100 – 200 nm	10 – 20 nm	[101]

Tableau 2 : Recensement des différentes voies de synthèses de nanotubes à base de titane selon la littérature.

Pour les applications en biologie, les méthodes qui permettent d'obtenir des dimensions élevées des TiONts ne les rendent pas utilisables pour des injections *in vivo*. En effet, les nano-objets de grandes tailles sont filtrés mécaniquement par les sinusoides et éliminés par le SRE du foie et de la rate [113]. Par conséquent, une voie de synthèse de nanotubes de titanate avec des dimensions plus faibles est préférée en biologie. C'est donc la synthèse hydrothermale qui est privilégiée. La taille des TiONts obtenue par cette voie semble la plus adaptée en vue des applications visées avec quelques centaines de nanomètre de longueur et une dizaine de nanomètre de diamètre. Toutes les études ont utilisé un précurseur à base de TiO₂ (rutile [114], anatase [110, 111, 115, 116], Degussa P25 [117] ou amorphe [118]) dans un milieu fortement basique (5 M à 10 M en NaOH) pour former des TiONts lors du traitement hydrothermal. Globalement, la gamme de température se situe entre 100°C et 180°C avec des temps de réaction variant de 2 h à 72 h selon la teneur en soude utilisée et la vitesse d'agitation [119]. D'autres paramètres importants lors de cette synthèse peuvent avoir une influence sur le rendement en nanotubes obtenus comme la taille des grains du précurseur de TiO₂ [120], sa structure [101], un prétraitement aux ultrasons [117] ou encore le type de lavage acide après synthèse [121]. L'optimisation des paramètres est complexe et la variation d'un seul de ces facteurs entraîne des sous-produits tels que des nanorubans ou des nanofeuillets et modifie grandement le rendement de synthèse [101, 122]. Depuis plusieurs années, notre équipe a su optimiser les paramètres de synthèse des TiONts *via* différents travaux de thèses [76, 123, 124].

II.1.2. Mécanisme de formation et morphologie des nanotubes de titanate

La clé pour développer et exploiter de nouveaux matériaux est liée à la compréhension des conditions de synthèses qui affectent les propriétés de ces nanostructures. Selon la littérature, quatre formes peuvent être obtenues à l'issue du traitement hydrothermal comme l'illustre la Figure 11 [122]. Les différentes appellations sont nanotubes (a₁ et a₂) avec différentes couches, nanobâtonnets ou encore nanofibres (b) nanorubans (c) et enfin, nanofeuillets (d).

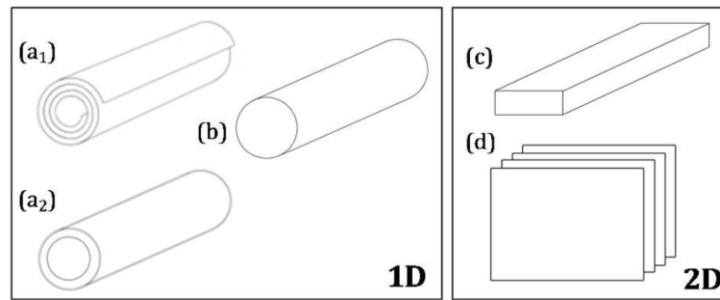


Figure 11 : Schéma des différentes morphologies de titanate rencontrées dans la littérature : (a1 et a2) nanotubes, (b) nanobâtonnets ou encore nanofibres, (c) nanorubans et (d) nanofeuilles [122].

Les travaux de Kasuga [103] ont suggéré que la morphologie tubulaire se formait durant le processus de lavage acide après traitement hydrothermal [125]. Cependant, d'autres études ont clairement démontré qu'en lavant la suspension à l'éthanol ou à l'acétone, la forme tubulaire des titanates était présente et bien obtenue durant la synthèse hydrothermale [110, 126]. Des travaux ont essayé de comprendre les phénomènes de formation des nanotubes de titanate. Ainsi, Bavykin et ses collaborateurs ont largement étudié le mécanisme de formation des TiONts [102, 116]. Il est établi que la formation de TiONts passe par la formation de feuillets avant d'atteindre la forme tubulaire par enroulement. Cependant, la littérature n'est pas encore totalement claire et recense principalement deux cheminements pour former des TiONts à partir d'un précurseur de TiO_2 . La première hypothèse est la dissolution du précurseur de dioxyde de titane en octaèdres de TiO_6 pour reprécipiter en nanofeuillets composés de blocs de TiO_6 [127]. La seconde hypothèse consiste à exfolier le précurseur de TiO_2 pour former directement les nanofeuillets avant de s'enrouler pour former les nanotubes. Le processus d'enroulement permettrait de stabiliser le système en raison d'une déficience en liaisons hydrogène sur une des faces du nanofeuillet et à l'intercalation des ions sodium [111]. De plus, la cinétique de leur formation a montré qu'elle était surtout dépendante de la taille et de la nature du précurseur [128]. Dans le cas des synthèses réalisées par notre groupe, les TiONts sont définis par une morphologie tubulaire et peuvent être facilement identifiable par un enroulement de 2 à 10 couches pour former une spirale avec les deux extrémités ouvertes (Figure 11a1) [76, 124].

La composition chimique des TiONts dépend énormément de leur mécanisme de formation et des paramètres de synthèse. Il est difficile d'affirmer avec exactitude la reproductibilité des synthèses ce qui provoque des disparités entre les différentes études concernant la composition des nanotubes [110, 111, 126, 129]. Cependant, les TiONts sont constitués d'une composition intermédiaire à l'hydrogénéotitanate ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) et au titanate de sodium ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). Ainsi, une composition chimique des TiONts a été suggérée avec la formule $\text{Na}_{2-x}\text{H}_x\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1}$ ($0 < X < 2$), ou x dépend des conditions de lavages et des traitements acides [101, 129]. Ces formules ont été proposées en se basant notamment sur des décompositions thermiques [130].

Les TiONts ont attiré une grande attention en raison de la combinaison unique de leurs propriétés chimiques et physiques. Plusieurs travaux ont recensé une grande surface spécifique des TiONts pouvant atteindre $400 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ [103] avec une bonne stabilité thermique et chimique [131] et une haute capacité d'échange d'ions [115]. La surface de ces tubes présente des fonctions hydroxyles, qui les rendent particulièrement intéressants en vue de futures fonctionnalisations (Chapitre 2. I.2.) [132, 133].

II.1.3. Les diverses applications des nanotubes de titanate

La morphologie allongée, la surface spécifique élevée et les propriétés électroniques semi-conductrices font des titanates nanostructurés des matériaux prometteurs pour de nombreuses applications. Dans cette partie, la plupart des applications couvrant le domaine de la chimie, de la physique, de l'ingénierie, de la mécanique et la médecine sont passées en revue pour entrevoir le potentiel des TiONts et le grand intérêt que leur portent de plus en plus de groupes [102].

Une des applications les plus développées à ce jour concerne la conversion et le stockage de l'énergie. En effet, la recherche de solutions alternatives pour de nouvelles sources énergétiques constitue un enjeu majeur pour l'environnement et pour la pénurie de combustibles fossiles. Les TiONts ont déjà été établis comme un support technologique pour les énergies renouvelables [134] incluant des supports pour absorber la lumière dans les cellules solaires à colorant [135], des systèmes de détection d'hydrogène et de stockage [102], des batteries en lithium [134], des catalyseurs [136] et des composants de membranes pour piles à combustibles [137]. La surface des TiONts chargée négativement permet notamment d'être utilisée comme électrodes pour des cellules solaires en améliorant le phénomène d'absorption des colorants chargés positivement à partir de solution aqueuse (Figure 12a) [102] ou encore pour des batteries au lithium en améliorant le transport d'ions lithium [138].

Ils sont aussi étudiés comme photocatalyseurs pour l'oxydation de composés organiques [139] en raison de leur structure, de leur surface spécifique (pour l'accélération du taux de réaction interfaciale) et de la présence de groupement hydroxyles à leur surface (qui sont nécessaires pour former des radicaux libres durant les réactions photocatalytiques) (Figure 12b) [102]. D'autres études ont montré que les TiONts seuls ont des propriétés paramagnétiques [140] et en les dopant avec du cobalt, ils obtiennent des propriétés ferromagnétiques [141]. Ou encore, ils ont été testés comme écomatériaux pour améliorer la dégradation des colorants provenant des textiles [138]. La partie suivante détaille particulièrement une nouvelle zone active de recherche qui implique l'utilisation des TiONts pour des applications biologiques.

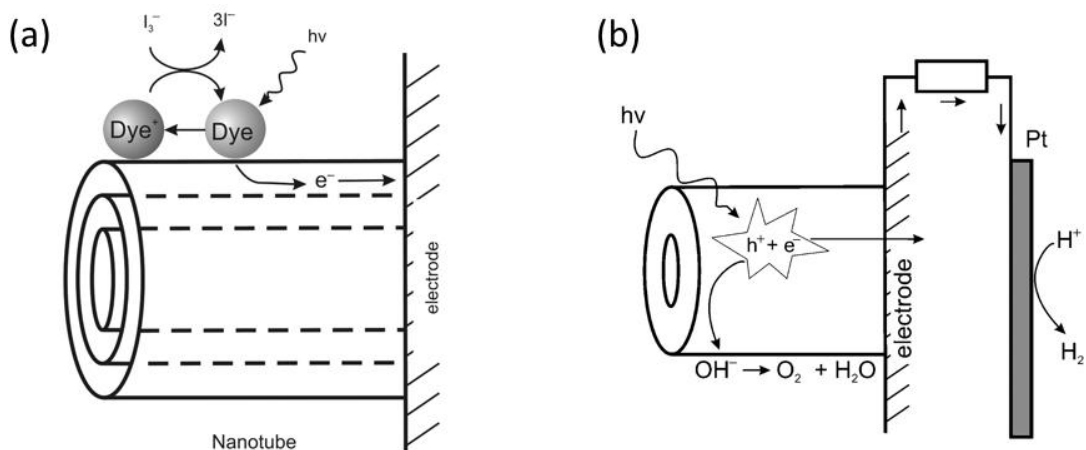


Figure 12 : Schéma (a) d'une cellule solaire photochimique à colorant organique et (b) d'un processus photocatalytique pendant le craquage de l'eau (water splitting en anglais) [102].

II.1.4. Les nanotubes de titanate, de nouveaux outils pour le secteur biomédical

II.1.4.1. Caractéristiques des TiONts en vue d'applications biomédicales

À l'instar des nanotubes de carbones, les TiONts se sont aussi tournés vers des applications biomédicales en incluant le marquage d'objets biologiques, la fabrication de tissus artificiels à partir de matériaux composites nanostructurés et la délivrance de substances actives contrôlée [102, 134].

Les TiONts peuvent être utilisés comme biocapteurs ampérométrique. Il a été montré que le Meldola blue [142] et les métalloprotéines (assurant le transport d'oxygène) comme l'hémoglobine [143] ou la myoglobine [144] peuvent être facilement immobilisés sur la surface des TiONts permettant de favoriser le transfert d'électrons entre des molécules biologiques et l'électrode artificielle. Ils ont aussi été étudiés comme biocapteurs électrochimiques pour la détection de dopamine dans le diagnostic de la maladie de Parkinson [145]. La biocompatibilité des TiONts a été par ailleurs démontrée pour remplacer l'hydroxyapatite dans la régénération osseuse parce qu'ils favorisent le développement plus rapide d'ostéoblastes [146]. Leur capacité à stimuler la cristallisation des hydroxyapatites sur la surface des titanates peut être due à leur bonne propriété d'échangeur d'ions.

L'utilisation des nanotubes de titanate comme capsules pour délivrer des médicaments et pour la libération contrôlée de substances actives s'appuie sur plusieurs propriétés des nanotubes [76]. Une surface spécifique élevée et un grand volume de pores (notamment en raison de la cavité interne des nanotubes) permettraient aux nanotubes d'avoir une grande capacité de stockage de médicaments. Enfin, la morphologie tubulaire est bénéfique pour amener ou maintenir les principes actifs dans les tissus ciblés [102]. Plusieurs études ont démontré le potentiel des TiONts pour améliorer l'internalisation dans les cellules du fait de leur morphologie tubulaire [26], pour vectoriser des nanoparticules d'oxydes de fer pour l'IRM [147], des molécules pour leur activité antitumorale ou encore pour la thérapie photodynamique [148, 149] en plus de leur effet radiosensibilisant intrinsèque [23]. Ces propriétés, qui font des TiONts un nouvel outil pour la nanovectorisation, sont détaillées davantage dans les parties qui suivent.

II.1.4.2. Études *in vitro* préliminaires utilisant des TiONts

L'étude biologique *in vitro* des nanoparticules est sujette à de nombreux travaux qui montrent des disparités selon la nature des nanoparticules, leur taille, leur facteur de forme ainsi que leurs propriétés de surface [150]. Ces paramètres ont une importance dans les mécanismes d'interaction avec les cellules [150]. Par ailleurs, les comportements cellulaires varient d'un type à l'autre et aucun modèle cellulaire n'émerge, ces derniers variant dans les études, selon les applications visées. Les parties qui suivent recensent plusieurs études *in vitro* relatives aux TiONts sur différentes lignées cellulaires.

II.1.4.2.1. Internalisation et cytotoxicité des TiONts sur des cellules intestinales, gliales et sur des cardiomyocytes

Des études d'internalisation ont été réalisées pour mettre en évidence le potentiel des TiONts à pénétrer les cellules. L'internalisation des TiONts a montré des résultats similaires sur des cellules intestinales (Caco-2), gliales (SNB19 et U87MG) ou sur des cardiomyocytes [23, 26, 89, 149, 151].

L'observation par microscope électronique en transmission (MET) a permis de prouver l'internalisation des TiONts dans les cellules mais aussi de les localiser principalement dans les vésicules et dans le cytosol (Figure 13) [23, 89]. De plus, deux voies d'internalisation ont été observées simultanément avec un processus endocyttaire par invagination de la membrane et un processus de diffusion.

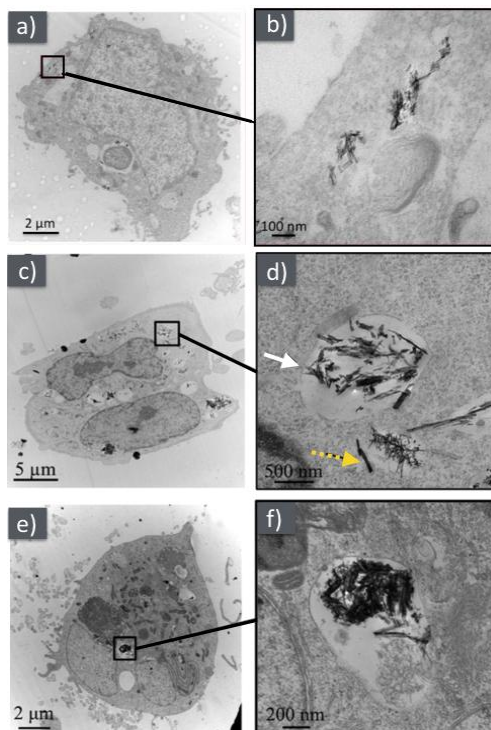


Figure 13 : Images MET montrant l'internalisation des TiONts (a-b) dans des cardiomyocytes après 5 h d'incubation [89] et dans des cellules gliales (c-d) SNB19 et (e-f) U87MG après 10 jours d'incubation [23]. L'image (d) permet notamment d'observer les TiONts à l'intérieur des vésicules (flèche blanche pleine) et dans le cytosol (flèche en pointillé jaune).

La capacité des TiONts à s'internaliser dans les cellules est surtout gouvernée par la concentration en TiONts et par leur morphologie davantage que par le taux de couverture de leur surface [26, 89]. En effet, des nanotubes de titanate fonctionnalisés par un polymère en présence d'un marqueur ont montré que l'internalisation des nanohybrides dans des cardiomyocytes suivait la même tendance pour une même concentration en TiONts avec des taux de greffage différents en polymère à leur surface (Figure 14). Cependant, la pénétration des nano-objets était favorisée en augmentant la concentration en TiONts [89].

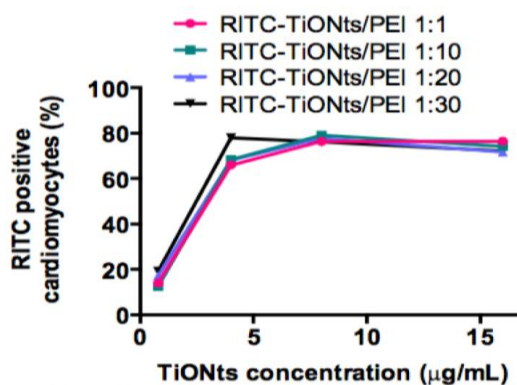


Figure 14 : Internalisation des nanohybrides dans des cardiomyocytes selon la concentration en TiONts et le taux de greffage de polymère analysée par cytométrie de flux [89].

De plus, le taux d'internalisation est dépendant de la morphologie et du temps d'incubation. A.-L. Papa a démontré que pour un même volume et une même surface spécifique, la morphologie tubulaire des TiONts facilite la pénétration cellulaire comparée à des nanoparticules de TiO_2 (Degussa P25) de forme sphérique [26]. Enfin, des observations MET ont permis d'observer que plus de 80% des cellules internalisent des TiONts après les 48 premières heures d'incubations [26, 149]. La Figure 15 évalue le degré d'internalisation selon le temps d'incubation dans des cellules gliales (U87MG).

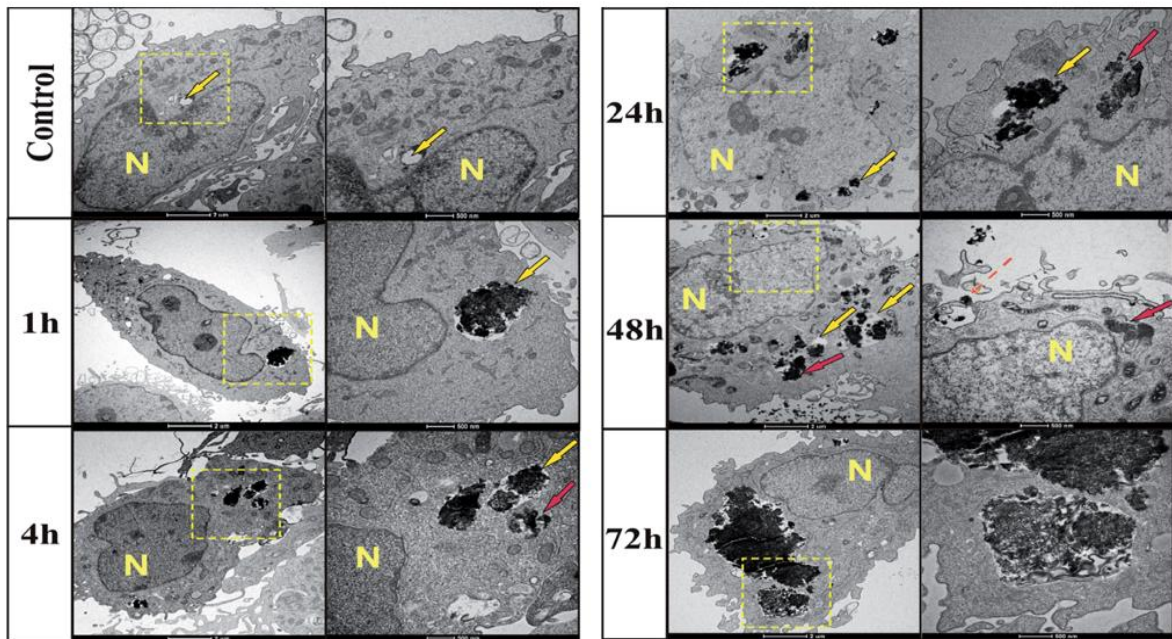


Figure 15 : Observation MET de l'internalisation des TiONts ($100 \mu\text{g/mL}$) en fonction du temps d'incubation dans des cellules gliales U87MG après 1 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h [149].

Par ailleurs, une des principales caractéristiques des TiONts est leur capacité à s'internaliser dans les cellules sans induire de cytotoxicité. Des profils cytotoxiques ont été établis en fonction de la concentration en TiONts sur les mêmes lignées cellulaires que celles étudiées pour l'internalisation cellulaire. Aucun signe d'activité cytotoxique n'a été observé pour les gammes de concentration étudiées pour des temps d'incubation compris entre 24 h et 72 h concernant les cellules SNB19 [23], U87MG [23, 149], Caco-2 [151] et pour les cardiomyocytes [26]. Par conséquent, la viabilité cellulaire au contact des TiONts est proche de 100% pour des doses allant de 0 à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les cellules SNB19, U87MG et les cardiomyocytes et allant jusqu'à $5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les cellules caco-2 (Figure 16).

Des résultats similaires ont été trouvés sur des cellules d'ovaires de hamster de chine (CHO) pour des concentrations en TiONts qui ne dépassent pas $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [89, 147]. Enfin, une étude a montré que la modification de surface des TiONts par PEGylation n'affecte pas son activité cytotoxique sur des cardiomyocytes [89]. Ces résultats suggèrent que les TiONts ne possèdent aucune cytotoxicité sur la gamme de concentration en TiONts qui serait potentiellement utilisée pour des études de vectorisation (en dessous de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Les TiONts sont par conséquent intéressants comme support pour la vectorisation.

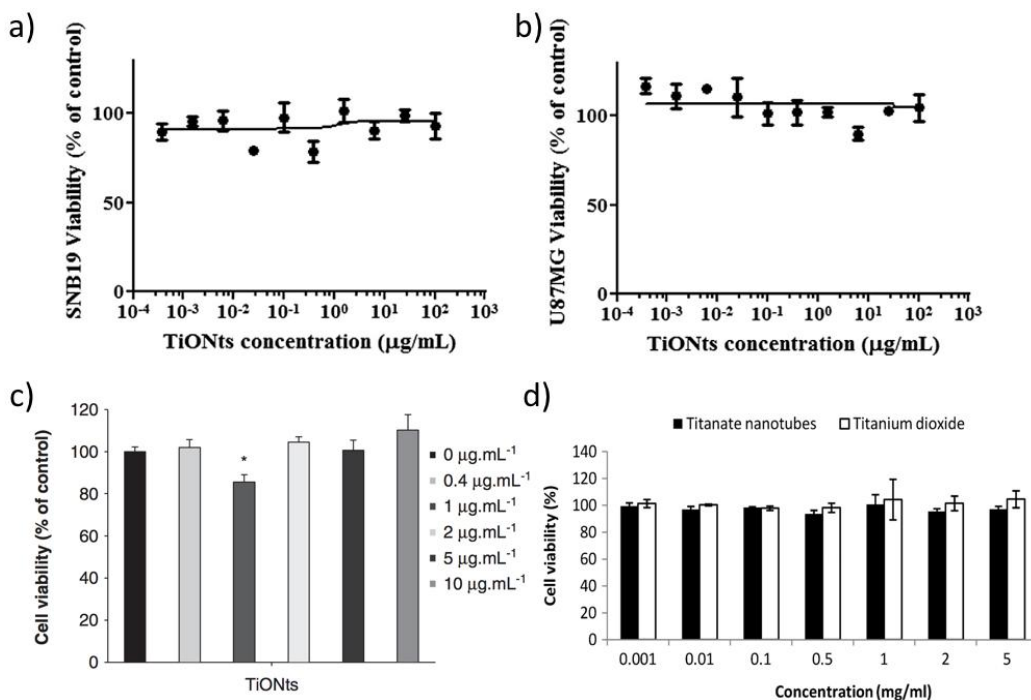


Figure 16 : Activité cytotoxique des TiONts sur des cellules gliales [23] (a) SNB19 et (b) U87MG, (c) sur des cardiomyocytes [26] et (d) sur des cellules intestinales Caco-2 [151] via des tests MTT.

II.1.4.2.2. Les TiONts : de potentiels candidats pour vectoriser des « molécules »

À ce jour, très peu d'études ont montré le potentiel des TiONts à vectoriser des molécules d'intérêts dans les sites ciblés. Pourtant, les caractéristiques des TiONts permettent à ce nanomatériau de remplir très bien les critères pour être un candidat avec un fort potentiel pour vectoriser des molécules pour un aspect thérapeutique ou d'imagerie.

La première étude de notre groupe sur les TiONts, a montré qu'ils pouvaient être utilisés comme de nouveaux agents de transfection d'ADN dans des cardiomyocytes. Il faut savoir que ce type cellulaire est difficilement transfectable et qu'à cette époque, aucun agent commercial ne le permettait. Le seuil de saturation en ADN et l'efficacité de transfection ont été évalués sur des TiONts fonctionnalisés par de la PEI (Figure 17) [26, 76]. Pour la première fois au monde, des cardiomyocytes, uniquement infectables (transfection *via* des virus) ont été transfectés, grâce aux TiONts/PEI, avec un taux approchant les 20%.

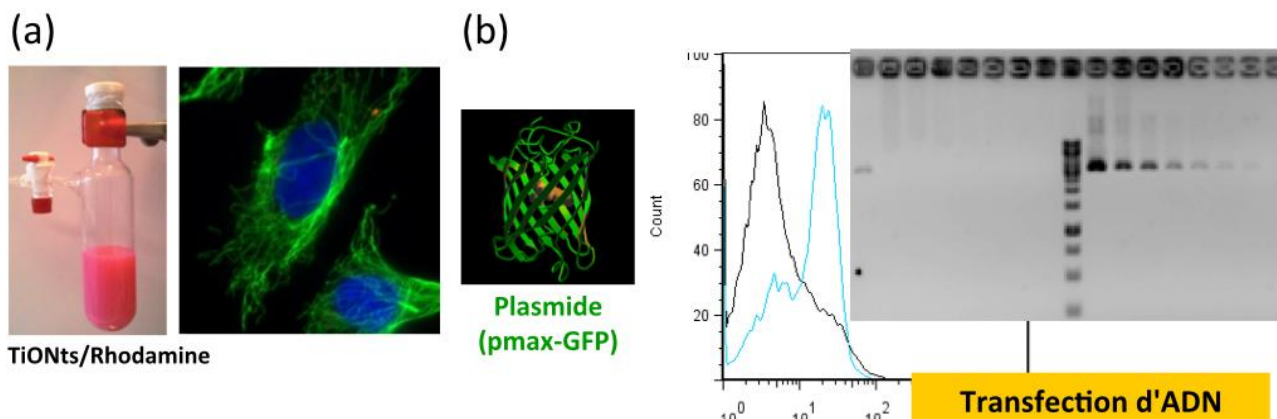


Figure 17 : (a) Marquage des TiONts-PEI à la rhodamine pour permettre de visualiser leur internalisation dans les cardiomyocytes. (b) Étude de la transfection du plasmide pmax-GFP par les TiONts/PEI dans les cardiomyocytes par cytométrie de flux et détermination du point de saturation de l'ADN par migration sur gel d'agarose. D'après [76].

Par ailleurs, toujours dans notre équipe, J. Paris et ses collaborateurs ont développé un nanohybride étape par étape à base de TiONts pour immobiliser sur sa surface un traceur optique [148]. Pour ce faire un fluorophore plus robuste que la rhodamine a été greffé sur les TiONts, une phtalocyanine de zinc aux propriétés optiques attrayantes (stabilité, rendement quantique de la fluorescence, émission dans le proche IR,...) [152], qui est aussi un agent photosensibilisant. Pour un autre type d'imagerie, des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide en anglais nommé USPIO) ont été couplées avec les TiONts afin de créer un nouveau nanovecteur détectable par IRM [147]. Ce nanocomposite a été évalué *in vitro* sur des cellules CHO *via* des tests MTT [147].

Enfin, l'aspect thérapeutique a commencé à être envisagé avec l'immobilisation de la génistéine sur les TiONts [149]. En effet, cette molécule a un potentiel thérapeutique contre les cellules cancéreuses pour induire l'apoptose des lignées cellulaires de glioblastomes humains T98G et U87MG en provoquant des dommages oxydatifs [153].

Toutes ces études ont démontré que la forme et la surface des TiONts rendent ce nanovecteur très prometteur pour des applications biologiques *in vitro* à la fois pour le volet diagnostique et pour entrevoir l'amélioration de l'aspect thérapeutique.

II.1.4.2.3. L'effet radiosensibilisant des TiONts sur des cellules gliales

Un des nouveaux challenges est d'apporter un effet thérapeutique par le nanovecteur lui-même (voir paragraphe I.2.1.1. et I.2.2.). L'effet radiosensibilisant des TiONts a été évalué par notre équipe lors d'analyses clonogéniques sur deux lignées cellulaires de glioblastome humain : SNB19 et U87MG [23]. L'absence d'activité cytotoxique des TiONts a pu mettre en évidence leur effet radiosensibilisant comme seul paramètre sur la mort cellulaire. Après 24 h d'incubation avec et sans TiONts, les systèmes ont été irradiés. Il a été démontré que pour une même dose de radiation, l'incubation des deux lignées cellulaires avec les TiONts a diminué le nombre de cellules cancéreuses (Figure 18a). Par ailleurs, les TiONts ont amplifié l'arrêt du cycle cellulaire G₂/M de ces cellules gliales (Figure 18b). Or, les cellules sont plus radiosensibles en G₂.

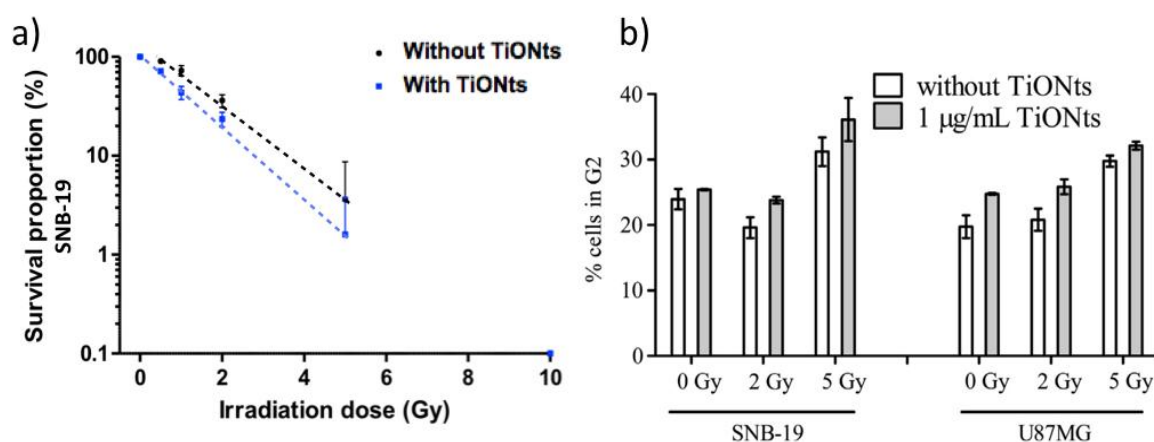


Figure 18 : (a) Viabilité des cellules SNB19 à l'exposition de rayons X en présence de TiONts (droite bleue) et sans TiONts (droite noire). (b) Pourcentage de cellules en phase G₂ sur des analyses du cycle cellulaire de SNB19 et U87MG, 24 h après irradiation avec et sans incubation des TiONts [23].

Même si le titane n'est pas un élément lourd, les interactions rayonnement/matière conduisent à l'émission d'électrons Auger lors du phénomène de désexcitation. Or, il a été montré que des éléments comme le phosphore et le calcium (très proches du titane dans le tableau périodique) peuvent causer des cassures simple et double brin de l'ADN quand ils sont soumis à des radiations, par déclenchement de cascades d'émission d'électrons Auger [154, 155]. Par ailleurs, la composition des TiONts montre qu'ils contiennent beaucoup d'eau, d'oxygène et d'hydroxyles dans leur structure [101]. C'est pourquoi, les radiations peuvent augmenter la production de radicaux libres au voisinage de ces TiONts, par libération de ces molécules. L'augmentation de l'effet radiosensibilisant peut aussi s'expliquer par un effet supplémentaire ou synergique en raison de l'internalisation des TiONts avant l'irradiation. Ces résultats indiquent que les TiONts peuvent devenir de nouveaux outils utiles pour la recherche et la thérapie clinique dans le domaine de l'oncologie.

II.1.4.3. Étude de la biodistribution des TiONts après injection intraveineuse

Le profil pharmacocinétique et la toxicité sont propres à chaque nanomatériau. La connaissance de ces paramètres est un facteur essentiel pour leur devenir, leur aptitude concernant des applications *in vivo* mais aussi sur les risques que peuvent engendrer les nanoparticules sur l'organisme [75]. Toujours dans notre équipe, Boudon *et al.* ont étudié la biodistribution des TiONts par une technique d'imagerie nucléaire (SPECT/CT) en utilisant un agent chélatant, le DOTA (l'acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique) [156]. Ce macrocycle a été utilisé pour complexer des radiométaux trivalents [157], ici l'indium ^{111}In , afin de détecter le nanohybride par marquage radioactif et évaluer son profil pharmacocinétique, en fonction du temps, par SPECT/CT et comptage gamma [46]. Les résultats de biodistribution ont montré qu'une heure après injection IV, les TiONts radiomarqués (TiONts-DOTA- ^{111}In) étaient principalement localisés dans les poumons et dans les urines. Après 24 h, seule une faible quantité de nanohybride n'était toujours pas éliminée et se trouvait dans la vessie (Figure 19) [156].

Cependant, la majorité de ce nanohybride a été éliminée du système sanguin dans les 4 h qui ont suivi l'injection comme cela a déjà été observé pour des nanotubes de carbone [158]. Notons que les TiONts-DOTA- ^{111}In n'ont pas été retrouvés dans les tissus osseux comparés aux nanotubes de carbone. Par ailleurs, des travaux ont déjà rapporté une accumulation temporaire dans les poumons par d'autres nanoparticules avant leur élimination [37, 46, 84]. Des nanoparticules de TiO_2 avaient été retenues dans différents organes, après injection IV, comme le foie et la rate jusqu'à 28 jours ou encore dans les reins et les poumons jusqu'à 14 jours [159]. *A contrario*, le DOTA- ^{111}In est rapidement éliminé par les urines au bout de quelques heures.

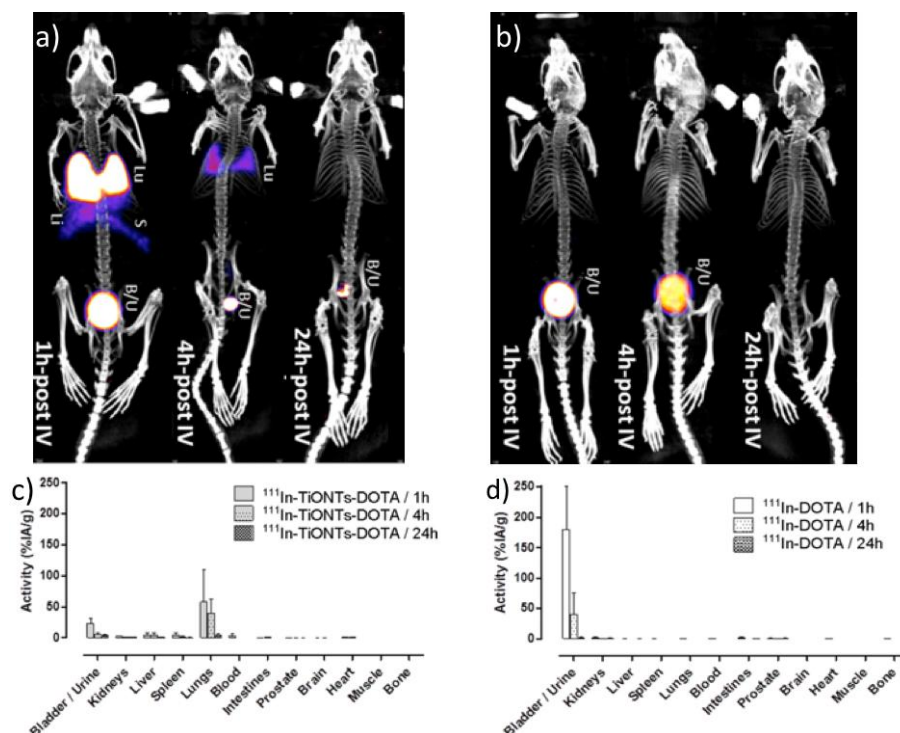


Figure 19 : Imagerie nucléaire in vivo par SPECT/CT des (a) TiONts-DOTA-¹¹¹In et du (b) DOTA-¹¹¹In à 1 h, 4 h et 24 h après injection intraveineuse sur des souris. Biodistribution ex vivo par comptage gamma sur différents organes de souris après injection intraveineuse des (c) TiONts-DOTA-¹¹¹In et du (d) DOTA-¹¹¹In à 1 h, 4 h et 24 h [156].

II.2. Les nanoparticules d'or (AuNPs)

II.2.1. Généralités sur les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs) ont suscité beaucoup d'intérêt et de curiosité depuis plusieurs décennies. Les propriétés des AuNPs offrent de nouvelles possibilités avec des propriétés optiques, électroniques et chimiques totalement différentes de l'or à l'état atomique ou macroscopique [53]. Ceci s'explique à la fois par des effets quantiques et par l'augmentation du nombre d'atomes de surface avec la diminution de la taille des particules. Par ailleurs, la facilité de fabrication des AuNPs avec des paramètres bien contrôlés en font des outils parfaitement adaptés selon les applications visées mais aussi par leurs grandes capacités de fonctionnalisation en surface, par greffage de molécules soufrées ou aminées par exemple, ainsi que par des molécules biologiques [53, 160-162].

Les AuNPs sont particulièrement intéressantes du fait de leurs propriétés optiques uniques lorsqu'elles interagissent avec la lumière. Elles présentent une bande d'absorption caractéristique dans le domaine UV-visible (250 – 350 nm), appelée bande plasmonique. Cette propriété intrinsèque des AuNPs (Résonance Plasmonique de Surface, RPS) permet d'envisager de nouvelles applications en optique, en électronique, en nanomédecine (diagnostic et thérapie) et comme catalyseurs [162]. La taille et la forme des AuNPs sont les principaux paramètres qui contribuent à une modification de cette bande d'absorption. Les phénomènes de RPS ne sont plus observés lorsque la taille des AuNPs est inférieure à 2 – 3 nm. Cependant, à ces tailles, elles deviennent intéressantes pour réaliser de l'imagerie médicale en possédant des propriétés fluorescentes [161].

L'utilisation d'agents stabilisants, présents à la surface du nanomatériau, permet de contrôler la taille, la forme, la composition de la surface et la sélectivité chimique de ces nanoparticules en envisageant des fonctionnalisations avec d'autres molécules d'intérêts [162, 163]. Il est possible de réaliser de l'imagerie photoacoustique et de la thérapie photothermique après absorption d'un faisceau du proche infrarouge de faible puissance conduisant à un échauffement local entre 41°C et 47°C [7, 10, 54, 161] (Figure 20).

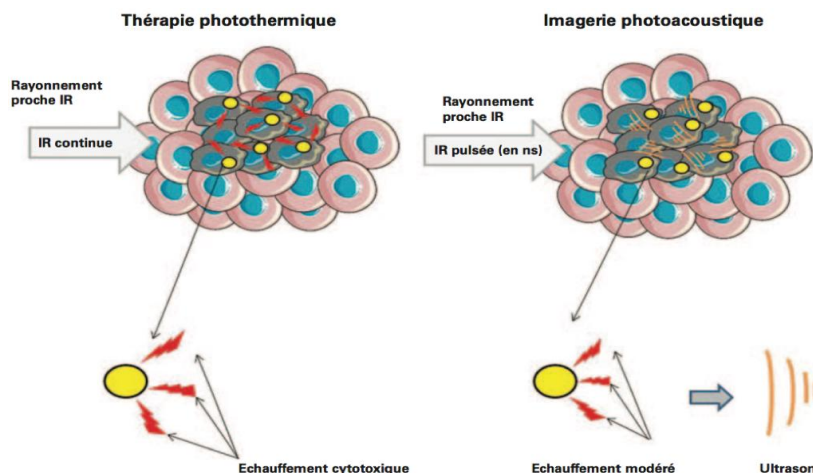


Figure 20 : Principe de la thérapie photothermique et de l'imagerie photoacoustique [60]. Copyright 2014, Techniques de l'Ingénieur.

En plus d'être reconnu comme un élément biocompatible pour l'organisme, les AuNPs présentent des caractéristiques pour des utilisations en imagerie médicale (contraste X) et en radiothérapie. Elles peuvent absorber fortement le rayonnement X grâce à leur densité ($d = 19,3$) et à leur numéro atomique élevé ($Z = 79$) [19, 22, 164]. Des études *in vivo* ont déjà été rapportées sur le potentiel pour la thérapie guidée par imagerie X des AuNPs [42]. Afin d'éviter le piégeage par le SRE avec des nanoparticules de taille trop importante et de favoriser l'élimination rénale, la taille des AuNPs de l'ordre 2 – 10 nm semble être privilégiée pour ce type d'application [86, 165, 166].

De plus en plus d'études mettent en avant des stratégies de fonctionnalisation des AuNPs pour apporter des propriétés complémentaires en plus des propriétés propres à son élément et à son échelle nanométrique [167]. La fonctionnalisation des nanoparticules d'or peut être réalisée au cours de la synthèse (méthode de Brust) ou post-synthèse afin d'améliorer la stabilité colloïdale, le ciblage et la vectorisation des molécules d'intérêts dans les cellules tumorales.

II.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or utilisée dans cette étude

La synthèse de nanoparticules d'or par réduction chimique est de loin la méthode la plus utilisée car elle permet de contrôler la taille et la morphologie selon le choix du réducteur, de l'agent stabilisant et de la nature du solvant [53, 162]. La stabilisation des AuNPs par des dérivés thiolés s'est largement développée en raison de la forte affinité de la liaison covalente Au-S avec des chaînes carbonées de différentes longueurs [48, 163, 168]. Par la suite, Brust a élaboré des AuNPs en présence d'alcanethiols conduisant à des tailles de AuNPs qui n'avaient jamais été obtenues auparavant (1,5 - 5,2 nm) [169]. Cette nouvelle voie de développement a notamment permis d'envisager de les fonctionnaliser avec un poly(éthylène) glycol à base de thiol présentant donc un intérêt pour des applications biomédicales [168].

Les travaux de Debouttière ont permis de développer un nouveau nanohybride à base de AuNPs comme agent de contraste pour l'IRM [160]. L'acide dithiolate diéthylènetriaminepentaacétique (DTDTPA) a été développé pour augmenter le taux de greffage à la surface des AuNPs tout en ayant la capacité de chélater le gadolinium [163]. Le DTDTPA possède une fonction thiol à chaque extrémité favorisant l'accroche sur les AuNPs et agit comme un agent stabilisateur thiolé pour contrôler la taille et améliorer la stabilité colloïdale des AuNPs. En effet, les fonctions thiols permettent d'assurer un greffage robuste mais qui peut devenir réversible sous certaines conditions [170]. De plus, les fonctions carboxyles de cette molécule favorisent la solubilisation et la redispersion en solution aqueuse et alcoolique. La synthèse des AuNPs a été réalisée au laboratoire UTINAM (équipe du Prof. Stéphane Roux) en présence du DTDTPA, en se basant sur la méthode de Brust. Le réducteur est NaBH_4 , en présence d'eau et de méthanol (Figure 21). Cette synthèse permet d'obtenir des tailles de l'ordre de 2,4 nm et environ 150 DTDTPA par nanoparticule d'or [163, 166, 171].

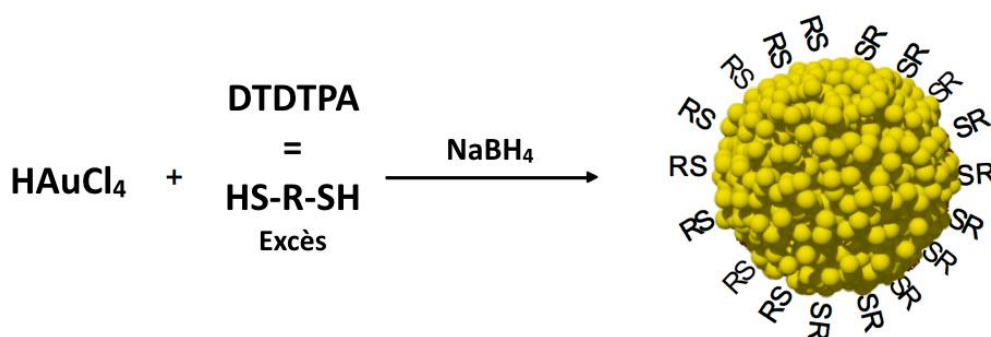


Figure 21 : Synthèse de nanoparticules d'or en présence de DTDTPA par réduction chimique avec le NaBH_4 en une seule étape. D'après [160].

Le taux de recouvrement du DTDTPA sur les AuNPs, élevé, n'est pas surprenant puisqu'il n'est pas impossible d'obtenir des multicouches de DTDTPA par formation de ponts disulfures S-S (Figure 22). Finalement, l'encombrement stérique et la présence de fonctions carboxyles améliorent fortement la stabilité colloïdale. De plus, il a été montré que la constante d'affinité pour le gadolinium conserve une affinité proche de celle du DTPA et est suffisante pour son application *in vivo* [48, 163].

II.2.3. L'utilisation de nanoparticules d'or pour délivrer des substances actives de médicaments

Les AuNPs sont largement étudiées pour s'accumuler directement dans les tissus tumoraux *via* l'effet EPR [165]. En couplant des ligands spécifiques à la surface des AuNPs, il est possible de diriger la nanoparticule vers des cellules tumorales plutôt que vers les cellules saines. Les AuNPs peuvent transporter différentes substances actives : cela peut être des biomolécules comme des protéines, des acides nucléiques (ADN, ARN) [172, 173], des molécules utilisées en chimiothérapie [174] (Paclitaxel, Doxorubicine) [175]. Le point important pour une chimiothérapie efficace repose sur le contrôle de la libération du principe actif. D'une part, cette libération peut être contrôlée et assurée par un stimulus chimique interne. Les molécules de glutathion possédant des fonctions thiols sont capables de libérer des ligands en surface des AuNPs [176]. Et d'autre part, un stimulus physique externe, tel que la lumière, permet de libérer le principe actif par des liens photoclicables [172].

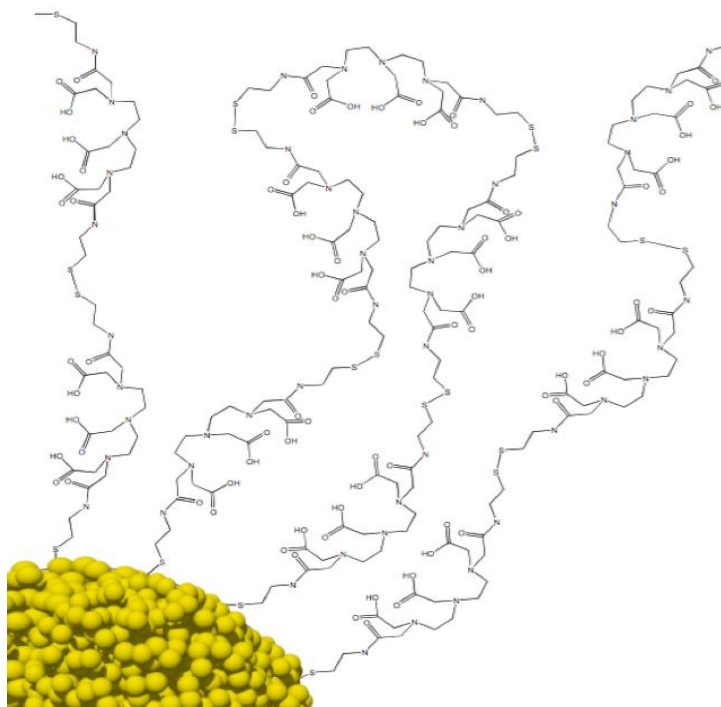


Figure 22 : Illustration du taux de recouvrement des DTDTPA sur les AuNPs [163].

Plusieurs travaux ont montré que les AuNPs-DTDTPA s'accumulent dans divers organes (notamment les reins, la vessie et les intestins) et particulièrement dans les tumeurs, ce qui était attendu [162, 166, 177]. Cependant, les AuNPs-DTDTPA sont rapidement éliminées de l'organisme par voie rénale d'où notre idée de les associer aux TiONts.

II.2.4. Les nanoparticules d'or comme agents radiosensibilisants

Les AuNPs ont démontré un réel potentiel comme agent radiosensibilisant, ici en raison de leur numéro atomique élevé ($Z = 79$), tout en s'accumulant dans les tumeurs et en épargnant les tissus sains, comme expliqué précédemment (paragraphe I.2.1.1.) [59, 164, 178, 179]. Hainfeld a démontré le potentiel des AuNPs pour la radiothérapie guidée par imagerie [22, 180]. Depuis, plusieurs études *in vitro* ont été menées pour évaluer l'utilisation des AuNPs comme nouveaux agents radiosensibilisants [59, 178]. Parmi ceux-ci, Schuemann a montré une forte corrélation entre la taille des AuNPs favorisant l'internalisation (50 nm) et l'efficacité radiothérapeutique, *via* des essais clonogéniques (Figure 23) [19].

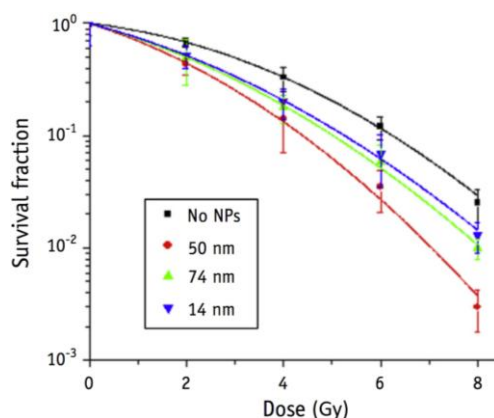


Figure 23 : Courbes de survie cellulaire établies via des essais clonogéniques montrant l'influence de l'efficacité radiothérapeutique en fonction des tailles en AuNPs [19].

Cependant, les expériences *in vivo* se font encore discrètes dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par la rapide élimination rénale de ces nanoparticules. Cependant, ces agents radiosensibilisants se sont montrés prometteurs pour traiter des tumeurs radiorésistantes et très agressives comme le carcinome squameux de la tête et de la nuque chez des souris [181]. De plus, récemment, une étude *in vivo* sur le rat a montré une survie améliorée après l'injection IT de AuNPs-DTDTPA, associé à la radiothérapie (Figure 24) [179].

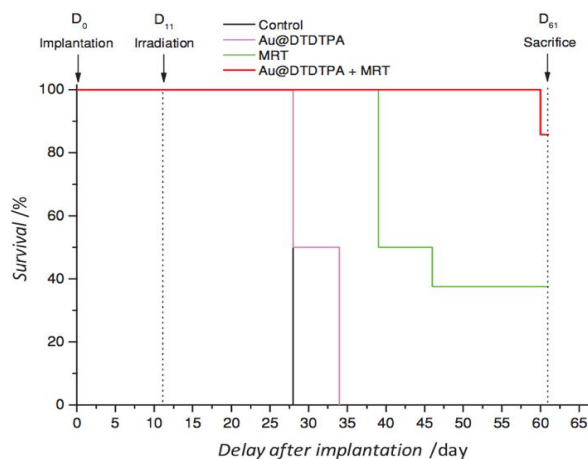


Figure 24 : Courbes de survie chez le rat dans le cas d'ostéosarcome montrant l'influence de l'association de la radiothérapie avec les AuNPs-DTDTPA après injection IT. Micro-beam radiation therapy ou MRT est l'abréviation de radiation par microfaisceau en français [179].

Des simulations ont montré que l'effet radiosensibilisant des AuNPs est plus efficace expérimentalement que lors de l'utilisation de modèles établis par les interactions rayonnement/matière [182]. L'absorption des rayonnements est d'autant plus élevée et localisée autour des nanoparticules d'or que le diamètre du cœur d'or est petit, d'où l'intérêt d'utiliser de petites AuNPs pour augmenter l'effet thérapeutique [60].

II.2.5. Imagerie médicale à partir de nanoparticules d'or

La combinaison de plusieurs techniques d'imagerie permet de contourner les limitations de chacune des modalités et d'améliorer l'interprétation des images qui repose sur le recoupement des données obtenues par des voies différentes. De nouveaux nanohybrides sont développés afin de réaliser de l'imagerie multimodale comme les AuNPs pour lesquelles il est possible de combiner la tomodensitométrie X avec l'IRM et/ou l'imagerie nucléaire (SPECT, PET) en jouant sur la fonctionnalisation de surface des AuNPs [166, 183].

II.2.5.1. Imagerie X

Les AuNPs favorisent les interactions avec les rayons X et les diffusent de façon efficace en fournissant un contraste pour la tomodensitométrie X. Cette propriété repose sur le même principe que son effet radiosensibilisant. De plus, les AuNPs permettent de prolonger le temps d'imagerie avec des contrastes X meilleurs [177, 180]. Elles sont donc devenues une méthode alternative présentant de nombreux avantages par rapport aux composés à base d'iode utilisés en clinique [171, 180, 183]. Cependant, l'imagerie X n'est pas la technique la plus adaptée dans le domaine de l'oncologie en raison

de son caractère ionisant. L'intérêt est alors d'avoir des propriétés complémentaires à l'aide de différentes fonctionnalisations pour réaliser d'autres techniques d'imagerie [171, 183].

II.2.5.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a l'avantage d'être non invasive, non radioactive, non ionisante, d'imager des tissus mous et de permettre une visualisation tridimensionnelle avec une bonne résolution spatiale. Pour améliorer le contraste de certaines images et le temps d'acquisition, il est utile d'avoir recours à des agents de contrastes paramagnétiques. Dans l'optique de combiner différentes techniques d'imagerie médicale, des chélates de gadolinium peuvent être greffés sur les AuNPs pour en faire des agents de contraste en IRM en apportant des propriétés intéressantes comme la relaxation en T_1 . Ainsi, plusieurs études ont démontré qu'il était possible de réaliser de l'imagerie X couplée à l'IRM en fonctionnalisant les AuNPs par le DTDTPA pour chélater le gadolinium [163, 166, 171, 179, 183]. Néanmoins, la modification chimique du DTPA en DTDTPA abaisse la valeur de la constante de stabilité du DTDTPA- Gd^{3+} . En effet, les valeurs rapportées dans la littérature pour des dérivés semblables s'étendent de 10^{16} à 10^{18} au lieu de $10^{22,5}$ pour le DTPA- Gd^{3+} [163, 184]. Ces valeurs restent, malgré tout, des constantes de stabilités intéressantes puisque des chélates de Gd^{3+} sont commercialement disponible comme agents de contraste en IRM avec une constante de stabilité de $10^{16,85}$ [185]. Le suivi des nanoparticules radiosensibilisantes par IRM constitue un avantage majeur pour déterminer le moment adéquat pour déclencher l'effet radiosensibilisant. La combinaison de ces deux paramètres a induit une amélioration de l'effet thérapeutique d'un facteur 5 quant à la durée de vie d'animaux atteints d'une tumeur de cerveau [179].

II.2.5.3. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est de plus en plus utilisée pour étudier la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme. Cette technique basée sur des radiations ionisantes est très attractive pour réaliser des images fonctionnelles en raison de sa très grande sensibilité, tout en permettant une évaluation quantitative rapide de la biodistribution des radiomarqueurs [166, 186] (Figure 25).

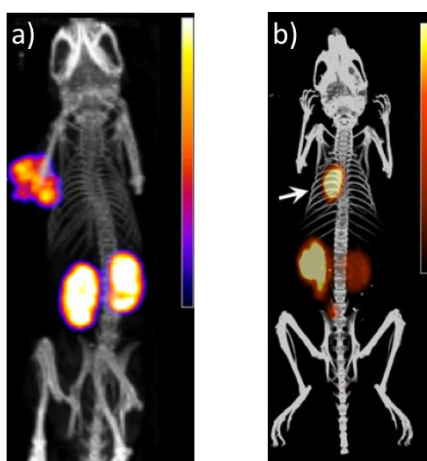


Figure 25 : Exemple d'imagerie nucléaire a) SPECT et b) PET [186].

Des polyamino-carboxylates tels que le DTPA ou le DTDTPA sont capables de former des complexes stables avec des radioisotopes (^{111}In , ^{99m}Tc , ^{64}Cu , ^{68}Ga) [166, 187]. Alric *et al.* ont démontré qu'il était possible de suivre les AuNPs par IRM et par imagerie nucléaire lorsqu'elles sont fonctionnalisées par le DTDTPA afin de bénéficier de la sensibilité et des possibilités de quantification de

l'imagerie nucléaire mais également de la résolution spatiale de l'IRM [166]. Cet agent chélatant permet notamment de complexer des éléments comme l'indium ou le technétium (^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$) pour suivre la biodistribution des AuNPs-DTDTPA par imagerie nucléaire [166]. En plus des images acquises par scintigraphie, la biodistribution des AuNPs-DTDTPA a aussi été évaluée par des quantifications *ex vivo* réalisées *via* un comptage gamma et une analyse ICP (spectroscopie à plasma induit) des organes.

II.2.5.4. Conclusions

Concevoir des nanoparticules se comportant à la fois comme agents thérapeutiques et/ou radiosensibilisant et agents de contraste multimodaux est par conséquent incontournable pour optimiser la thérapie et le diagnostic. Un objet permettant, comme les AuNPs, une imagerie trimodale IRM/imagerie nucléaire/CT est, en effet, bénéfique pour minimiser les inconvénients de chacune des techniques. L'alliance de la haute résolution de l'IRM, à la précision de localisation anatomique du scanner, ainsi que l'excellente sensibilité de l'imagerie fonctionnelle de la PET ou SPECT, donne accès à une plateforme d'imagerie extrêmement prometteuse pour la thérapie guidée par imagerie.

II.3. Conclusions

Les propriétés intrinsèques des TiONts et des AuNPs font de ces nanomatériaux des objets de choix pour des applications biomédicales. Dans le but de développer un nouvel outil thérapeutique, il est alors intéressant d'élaborer un nouveau nanohybride en combinant les TiONts et les AuNPs-DTDTPA. Ainsi, ces deux types de nanoparticules couplées, associent à la fois l'aspect de nanovectorisation (ou maintien sur site) *via* la forme en nanoaiguilles des TiONts et un effet thérapeutique accru grâce à l'effet radiosensibilisant des AuNPs, tout en permettant de l'imagerie (CT, nucléaire ou IRM, grâce au DTDTPA dans ces deux derniers cas).

III. Modification de surface des nanoparticules pour améliorer leur stabilité colloïdale en milieu physiologique

Les molécules liées à la surface des nanoparticules ne contrôlent pas seulement leur croissance durant la synthèse mais empêchent aussi l'agglomération des nanoparticules en suspension dans un milieu spécifique et permettent, en outre, d'ajouter de nouvelles fonctions organiques plus réactives pour de futurs greffages. Le type de particule (chimie), sa taille, sa charge de surface et les caractéristiques du solvant dans lequel les nanoparticules sont dispersées (type, température, pH), sont les principaux paramètres qui vont conditionner la stabilité colloïdale. En théorie, les nanoparticules sont stables si le potentiel total entre les particules a une barrière de potentiel qui est plus haute que l'énergie thermique ($K_B T$). Le potentiel total des nanoparticules vient approximativement de quatre

contributions : les forces attractives sont celles de van der Waals (VdW) et magnétiques et les forces répulsives que sont les potentiels électrostatique et stérique [188]. En considérant ces contributions, les nanoparticules peuvent être stabilisées soit électrostatiquement soit stériquement pour réduire l'agglomération induite à travers les forces attractives de VdW notamment. À travers l'Équation 1 qui définit approximativement le potentiel attractif de VdW [189], les nanoparticules les plus petites induisent des forces de VdW plus faibles et sont donc moins susceptibles de s'agglomérer et décanter.

$$U_{VdW} = -\frac{A}{6} \left(\frac{2r^2}{D(4r+D)} + \frac{2r^2}{(2r+D)^2} + \ln \frac{D(4r+D)}{(2r+D)^2} \right)$$

Équation 1 : Équation décrivant les forces de VdW pour des particules sphériques (r est le rayon de la sphère ; D est la distance interparticulaire ; A est la constante de Hamaker).

Par conséquent, l'amélioration de la stabilité colloïdale peut être envisagée par différentes stratégies à l'aide de greffage de molécules en créant des forces répulsives qui reposent sur les répulsions électrostatiques, stériques ou en combinant les deux méthodes (électro-stérique). Les ligands et les nanoparticules peuvent être liés soit par chimisorption, attraction électrostatique (physisorption) généralement avec leur groupement chargé se trouvant sur une des extrémités du ligand [190].

Pour des applications biomédicales, la stabilité colloïdale des nanoparticules est un prérequis obligatoire car leur déstabilisation dans le milieu physiologique peut conduire à une accumulation néfaste dans les organes ou encore à diminuer leur temps de circulation dans le sang en empêchant de délivrer l'agent thérapeutique sur les sites ciblés [27, 67, 73, 191, 192]. Les milieux physiologiques comme le système sanguin contiennent une grande quantité de sels, ont un pH d'environ 7,4 à 37°C et une force ionique élevée [193]. La stabilisation électrostatique pour les nanoparticules est seulement efficace pour des forces ioniques faibles et pour des pH éloignés du point isoélectrique (pH pour lequel les particules présentent autant de charges négatives que de charges positives, appelé PIE). C'est pourquoi la stabilisation colloïdale des nanoparticules par voie stérique est de plus en plus développée pour améliorer la stabilité dans un milieu à haute concentration saline [27, 194].

Il est donc nécessaire de modifier la surface des nanoparticules et de simuler leur comportement dans un milieu physiologique car la plupart des nanoparticules synthétisées ne sont pas stables dans les milieux biologiques [15, 36, 188, 190, 195]. Ceci permet aussi d'apporter de nouvelles fonctions réactives pour des couplages futurs avec des molécules d'intérêts (Figure 26).

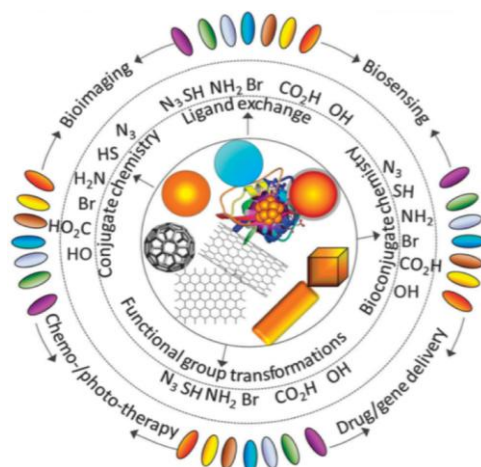


Figure 26 : Exemple de nanomatériaux et de leurs groupements fonctionnels pour des applications biologiques [196].

Comme énoncé précédemment, les modèles utilisés dans l'Équation 1 sont appliqués pour des particules de morphologie sphérique. Or, le nanomatériau au cœur de cette thèse ayant une forme tubulaire, aucune théorie reposant sur la mesure de diffusion dynamique de la lumière n'est à ce jour adéquate pour analyser la stabilité colloïdale des TiONts. Après plusieurs échanges avec la société Malvern Instruments⁷ et des essais infructueux, un modèle approprié pour les morphologies allongées n'a pas été trouvé mais est en développement.

III.1. Stabilisation par voie électrostatique

La stabilisation par voie électrostatique s'appuie sur les interactions entre les particules décrites par la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) [197]. La stabilisation colloïdale du système dépend du potentiel ζ des nanoparticules en fonction du pH [198], qui induit des forces électrostatiques répulsives plus efficaces avec une surface davantage chargée (Figure 27).

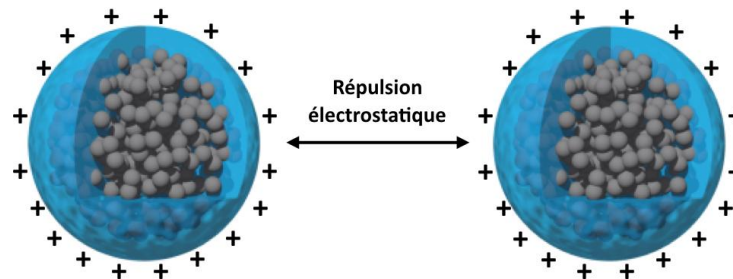


Figure 27 : Illustration de stabilisation colloïdale par voie électrostatique entre deux nanoparticules chargées positivement [18].

En effet, les charges de surface des nanoparticules, à l'issue de la synthèse ou par le greffage post-synthèse de molécules avec divers groupements chargés, ont pour but d'augmenter l'épaisseur de la double couche ionique et d'améliorer le potentiel électrique (Figure 28). Les nanoparticules peuvent être stabilisées de manière électrostatique pour des pH bien inférieurs ou supérieurs au PIE [199]. Cependant, les interactions électrostatiques entre nanoparticules peuvent être écrantées si des ions sont ajoutés [200]. Par conséquent, la stabilisation par cette voie est efficace pour une faible concentration en sel et avec des pH s'éloignant du PIE.

Les agents stabilisants les plus utilisés sont surtout des silanes, des catéchols et des phosphonates présentant une forte affinité avec la surface des nanoparticules d'oxydes [88, 190] et possédant une surface chargée *via* des amines [201, 202] et des carboxylates [195, 203, 204] principalement. Ces groupements s'avèrent efficaces pour stabiliser les nanoparticules dans le temps selon leur nature et aussi, pour des milieux salins plus concentrés [190].

⁷ Malvern Instruments est une société qui développe des appareils analytiques utilisés dans les laboratoires. Ces instruments permettent de mesurer la taille hydrodynamique, la forme des particules, le potentiel zêta, la charge des protéines, les interactions biomoléculaires,...

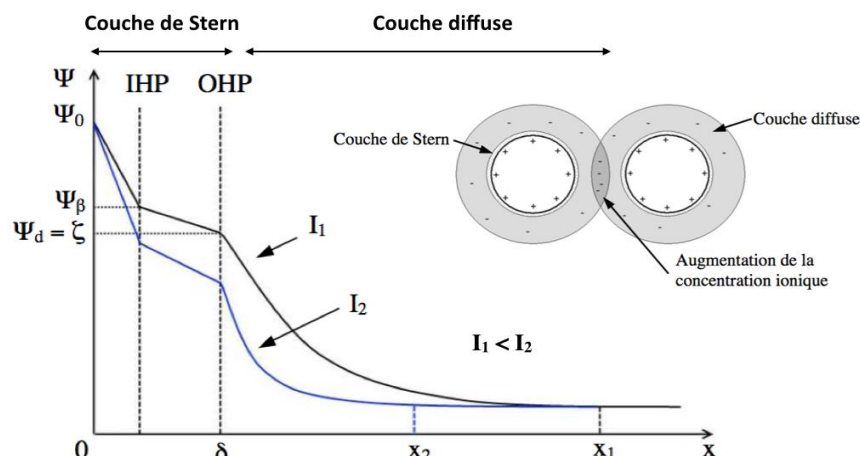


Figure 28 : Évolution du potentiel de répulsion électrostatique entre deux nanoparticules chargées à deux forces ioniques différentes I_1 et I_2 (ψ_0 représente le potentiel de surface des nanoparticules, ψ_d le potentiel électrostatique du plan externe d'Helmholtz (OHP) assimilable au potentiel ζ , ψ_β est le potentiel électrique au plan interne d'Helmholtz (IHP)). D'après [205].

III.2. Stabilisation par voie stérique : choix du polyéthylène glycol

Cette stratégie a pour but d'améliorer la stabilité en milieu physiologique par encombrement stérique [89] et pour augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans le sang tout en évitant l'adsorption des opsonines [27]. Les molécules permettant la stabilisation colloïdale des nanoparticules par voie stérique sont beaucoup plus efficaces à des concentrations salines élevées, par rapport aux molécules agissant par la voie électrostatique [206]. Les molécules classiquement utilisées sont des polymères comme le dextran [90], l'alcool polyvinylique [207], le chitosan [84] et le PEG [89, 192] (Figure 29).

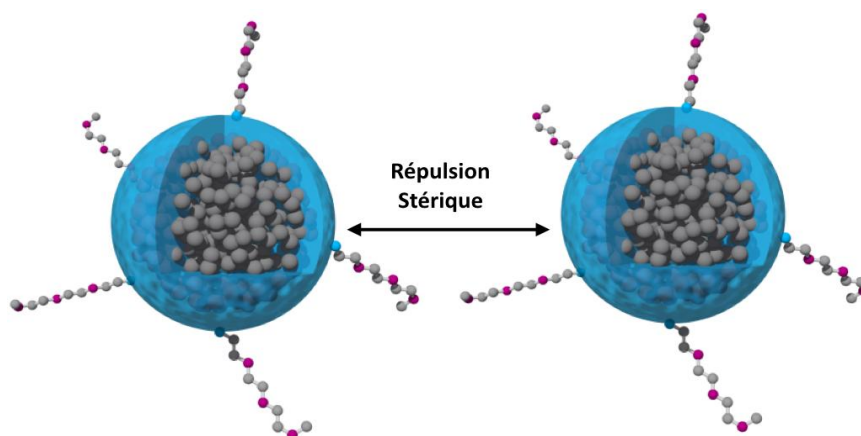


Figure 29 : Illustration de stabilisation colloïdale par voie stérique entre deux nanoparticules [18].

Le PEG est le plus couramment utilisé car il est reconnu comme étant biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique et approuvé par la FDA. D'ailleurs, il a déjà fait ses preuves pour favoriser l'accumulation passive des nanoparticules par effet EPR et améliorer l'efficacité thérapeutique [14, 208]. Il est rare de trouver des études avec des longueurs de chaînes supérieures à 20 kDa [14, 27]. Par sa

longueur de chaîne, le PEG permet d'écranter les charges afin de tendre vers un potentiel neutre⁸ [192], ce qui favorise une élimination des nanoparticules moins importante par le foie. À ce jour, peu d'études relatent l'effet de la densité et de la longueur de la chaîne carbonée du PEG sur l'adsorption des protéines sur les nanoparticules. Cependant, il a été établi qu'une densité de PEG élevée et une taille de chaîne PEGylée plus importante à la surface des nano-objets permettent de réduire l'adsorption des protéines, d'améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules ainsi que leur internalisation par les cellules [209, 210]. Il est alors nécessaire de trouver un compromis entre le taux de greffage et la longueur de PEG utilisée.

En raison de son essor récent comme nanomatériau d'intérêt, le nombre d'études sur le greffage d'un polymère, et notamment le PEG, à la surface des TiONts est très faible dans la littérature surtout pour des applications biomédicales [89, 124].

III.3. Stabilisation par voie électro-stérique

La dernière stratégie consiste à combiner les deux précédentes méthodes c'est-à-dire à stabiliser les nanoparticules à la fois par voie électrostatique et par voie stérique. Ce chemin est possible dans le cas de certains polymères [211] ou dendrimères [53, 212] par exemple. Dans le cas des TiONts pour applications médicales, la polyéthylène imine (PEI) a été greffée pour jouer le rôle de dispersant cationique et comme agent de transfection [26, 89]. En effet, ces nombreuses fonctions amines se protonent facilement afin d'acquérir une surface chargée positivement au pH physiologique tout en ayant une stabilisation stérique du fait de la longueur de la chaîne carbonée (PEI 1800 Da). La molécule de DTDTPA peut jouer le rôle de stabilisateur électro-stérique comme c'est le cas durant la formation des AuNPs. Ses nombreuses fonctions carboxylates induisent une charge négative à pH 7,4 et ses fonctions thiols, de part et d'autre de la molécule, permettent de former des ponts disulfures entre elles créant un encombrement stérique (Figure 22) [163].

IV. Fonctionnalisation des nanomatériaux par une molécule d'intérêt

Les modifications de surface des nanomatériaux vues précédemment sont indispensables et permettent d'une part de rendre plus stables les suspensions dans les conditions physiologiques et, d'autre part, de préparer la surface afin qu'elle puisse accueillir un agent thérapeutique (administration

⁸ Notons que le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en suspension ou en solution. C'est donc la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et le potentiel au plan de cisaillement qui définit le potentiel zêta. Ainsi, les chaînes carbonées du polymère à la surface des nanoparticules ont tendance à accroître la distance entre le plan de cisaillement et la nanoparticule lors de la mesure du potentiel zêta, ce qui a pour conséquence de masquer les charges se trouvant plus en profondeur. Dans ce manuscrit, nous parlerons alors dans ce cas de phénomène d'écranage des charges.

ciblée du médicament) et un agent chélatant pour le suivi des nanovecteurs *in vivo* par différentes techniques d'imagerie médicale.

IV.1. Greffage d'un agent thérapeutique à la surface de nanoparticules

IV.1.1. Généralités sur l'utilisation combinée de plusieurs médicaments et/ou de plusieurs types de thérapie. L'intérêt des nanoparticules.

Pour l'heure, les combinaisons de différents agents chimiothérapeutiques dans les traitements thérapeutiques sont une stratégie attractive pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux [213]. Les principaux facteurs conduisant à un pronostic défavorable lors de l'utilisation d'un agent chimiothérapeutique seul sont le phénomène de résistance multiple aux médicaments (Multidrug Resistance en anglais, MDR) [3], des toxicités significatives et des effets secondaires indésirables [4]. L'utilisation combinée de principes actifs pour la thérapie contre le cancer est illustrée Figure 30.

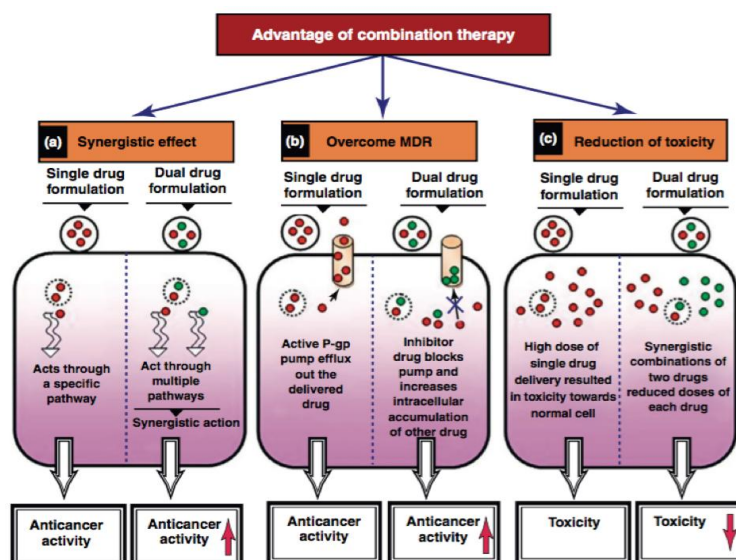


Figure 30 : Représentation schématique des principaux avantages de l'utilisation combinée de plusieurs agents thérapeutiques pour la thérapie anticancéreuse [213].

L'association de plusieurs agents thérapeutiques peut créer un effet synergétique *i.e.* un effet thérapeutique plus efficace que la somme des effets des principes actifs pris individuellement [214]. Enfin, un des plus gros obstacles rencontrés en thérapie concerne le problème de toxicité systémique en fonction des doses administrées. De fortes doses sont généralement requises lors des traitements chimiothérapeutiques en raison de la difficulté des principes actifs à atteindre les sites tumoraux. C'est pourquoi la combinaison synergique de plusieurs agents conduit à diminuer la toxicité et les effets secondaires tout en permettant de réduire le dosage de chacun des composés. Une étude a montré que l'association de la curcumine avec le paclitaxel a permis de réduire les doses pour limiter la toxicité du paclitaxel lors des injections systémiques mais a aussi permis d'améliorer l'activité cytotoxique, sur des cellules HeLa, par rapport aux médicaments seuls [215]. Dans le même but, cette même molécule a été combinée avec le carboplatine ou avec la vinorelbine pour le cancer du poumon [216].

Par ailleurs, le traitement du cancer implique généralement plusieurs thérapies combinatoires comme l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques associés à de l'hormonothérapie, de la radiothérapie ou encore à de l'immunothérapie (Figure 31). Il a été montré que les principes actifs associés avec de la radiothérapie sont plus efficaces. En effet, les chances de survie du patient sont meilleures pour de nombreux cancers à des stades avancés comme c'est le cas pour la combinaison du 5-fluorouracile et de la mitomycine C avec la radiothérapie [217], par rapport à l'action radiothérapeutique seule [218].

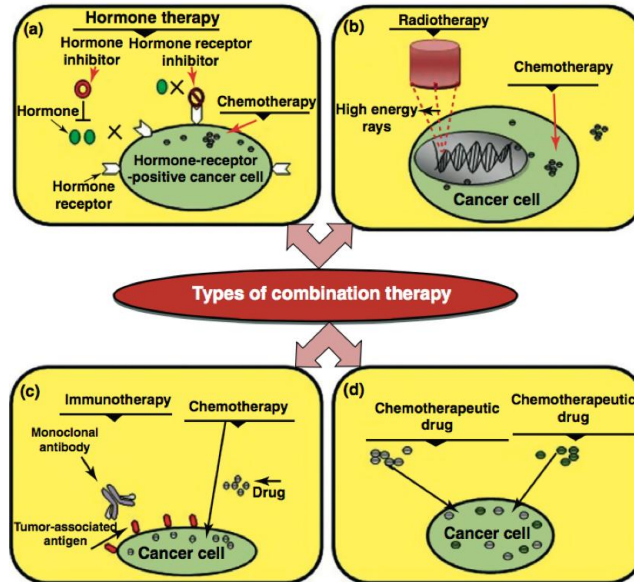


Figure 31 : Schéma des différentes stratégies combinatoires pour le traitement du cancer [213].

Les stratégies présentées dans ce paragraphe peuvent être obtenues grâce à la nanomédecine. En effet, plusieurs types de nanovecteurs chargés avec de multiples agents thérapeutiques ont été caractérisés et ont démontré une amélioration de l'activité anticancéreuse (Figure 32 et Tableau 3) [219]. Les nanoparticules peuvent apporter une grande quantité de médicaments et les protéger contre la dégradation lors de leur transport. Ainsi, il est possible d'attacher plusieurs types de molécules thérapeutiques afin que plusieurs actions thérapeutiques soient simultanément menées, le tout de manière contrôlée. Enfin, la cinétique de libération des molécules anticancéreuses peut-être contrôlée selon la chimie de surface des nanoparticules et leur comportement dans les milieux biologiques [220]. Les nanoparticules permettent aussi d'avoir simultanément plusieurs thérapies telles que le ciblage d'agents chimiothérapeutiques combiné à de l'hyperthermie ou à de la radiosensibilisation (voir paragraphe I.2.1.1. et I.2.2.). De plus en plus de résultats cliniques émergent, ce qui suggère que cette voie est prometteuse et commence à se concrétiser.

Cependant, à l'heure actuelle, le nombre de nanomédicaments sur le marché est limité [221]. Abraxane, une version nanoparticulaire contenant le paclitaxel lié à l'albumine s'est avérée plus efficace que la formulation de paclitaxel seul. Cette nouvelle formulation a été l'une des premières à être approuvée par la FDA. Des molécules thérapeutiques anticancéreuses comme la doxorubicine, le paclitaxel, le cisplatine, la camptothécine, le méthotrexate et la fluorouracile (les plus utilisées d'après la littérature) ont déjà été greffées, caractérisées puis testées biologiquement sur des nanomatériaux. Parmi ces derniers, des nanotubes de carbones, des nanoparticules d'oxyde de fer, de silice et d'or ont été utilisés comme nanovecteurs pour délivrer ce genre d'agent thérapeutique [25, 196, 208].

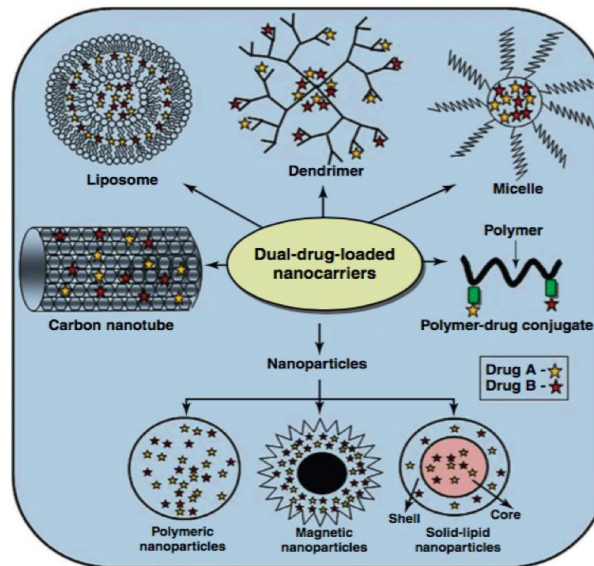


Figure 32 : Quelques exemples des différents types de nanovecteurs développés pour la délivrance de médicaments [213].

System	Structure	Characteristics	Examples of compounds
Polymeric nanoparticles (polymer-drug conjugates)	Drugs are conjugated to the side chain of a linear polymer with a linker (cleavable bond)	(a) Water-soluble, nontoxic, biodegradable (b) Surface modification (pegylation) (c) Selective accumulation and retention in tumor tissue (EPR effect) (d) Specific targeting of cancer cells while sparing normal cells—receptor-mediated targeting with a ligand	Albumin-Taxol (Abraxane) PGA-Taxol (Xyotax) PGA-Camptothecin (CT-2106) HPMA-DOX (PK1) HPMA-DOX-galactosamine (PK2)
Polymeric micelles	Amphiphilic block copolymers assemble and form a micelle with a hydrophobic core and hydrophilic shell	(a) Suitable carrier for water-insoluble drug (b) Biocompatible, self-assembling, biodegradable (c) Ease of functional modification (d) Targeting potential	PEG-pluronic-DOX PEG-PAA-DOX (NK911) PEG-PLA-Taxol (Genexol-PM)
Dendrimers	Radially emerging hyperbranched synthetic polymer with regular pattern and repeated units	(a) Biodistribution and PK can be tuned (b) High structural and chemical homogeneity (c) Ease of functionalization, high ligand density (d) Controlled degradation (e) Multifunctionality	PAMAM-MTX PAMAM-platinite
Liposomes	Self-assembling closed colloidal structures composed of lipid bilayers	(a) Amphiphilic, biocompatible (b) Ease of modification (c) Targeting potential	Pegylated liposomal DOX (Doxil) Non-pegylated liposomal DOX (Myocet) Liposomal daunorubicin (DaunoXome)
Viral nanoparticles	Protein cages, which are multivalent, self-assembled structures	(a) Surface modification by mutagenesis or bioconjugation—multivalency (b) Specific tumor targeting, multifunctionality (c) Defined geometry and remarkable uniformity (d) Biological compatibility and inert nature	HSP-DOX CPMV-DOX
Carbon nanotubes	Carbon cylinders composed of benzene ring	(a) Water-soluble and biocompatible through chemical modification (organic functionalization) (b) Multifunctionality	CNT-MTX CNT-amphotericin B

Tableau 3 : Types de nanovecteurs utilisés pour la délivrance de médicaments [219].

IV.1.2. La famille des taxanes comme agents chimiothérapeutiques

La famille des taxanes fait partie de la classe des diterpènes, qui sont surtout connus pour être des antimicrobiens et des anti-inflammatoires [222]. La Figure 33 représente la structure moléculaire de base des taxanes. Ils sont également très utilisés comme agents chimiothérapeutiques [223].

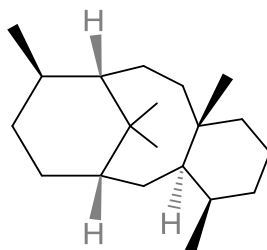


Figure 33 : Structure moléculaire de base des taxanes.

IV.1.2.1. Propriétés anticancéreuses et effets secondaires des taxanes

Les taxanes sont parmi les agents antinéoplasiques les plus utilisés par les oncologues. Ces molécules sont couramment exploitées pour traiter des cancers avancés incluant un grand nombre de tumeurs solides comme celles du cancer du sein, des ovaires, de la prostate, de l'œsophage et des poumons [223, 224]. Les taxanes ont aussi démontrés leur efficacité pour des stades moins avancés, ce qui a permis d'avoir un grand impact pour la thérapie préventive. Cette famille comprend plus de 300 composés dont les plus connus sont le paclitaxel (PTX, nom commercial Taxol®), le docétaxel (DTX, nom commercial Taxotère®) et le cabazitaxel (nom commercial Jevtana®) (Figure 34). Il est nécessaire de les dissoudre dans un solvant afin de les utiliser biologiquement car de manière générale, ils sont faiblement solubles dans l'eau [223]. En revanche, plusieurs rapports indiquent que ces solvants altèrent les profils pharmacocinétiques des taxanes [224].

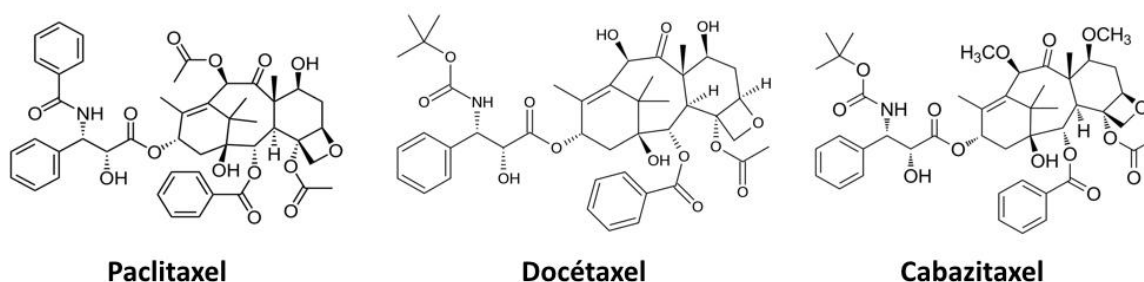


Figure 34 : Structures moléculaires des taxanes les plus utilisés comme agents chimiothérapeutiques : le paclitaxel, le docétaxel et le cabazitaxel.

Ces molécules inhibent la fonction des microtubules responsables de la division cellulaire [225]. De plus, les taxanes sont également connus pour présenter un effet radiosensibilisant [226]. Une étude a recensé plusieurs travaux sur l'action du paclitaxel et du DTX sur les différents cancers cités précédemment [223]. Globalement, dans ces types de cancers, les taxanes ont démontré une meilleure efficacité par rapport à d'autres agents pour lutter contre la progression de la tumeur. De plus, il s'est avéré que le taux de rechute et le risque de décès après un suivi post-traitement diminuait. C'est aussi le cas de la toxicité qui est moins importante avec les taxanes notamment en raison de leurs caractéristiques pharmacologiques [223].

Cependant, l'utilisation d'un taxane ou en combinaison avec d'autres agents antinéoplasiques peut causer de la toxicité [223]. Ces effets toxiques incluent une myélosuppression⁹, des réactions d'hypersensibilités et cutanées, de la rétention d'eau, des troubles gastro-intestinaux et de la neurotoxicité (Tableau 4). La neuropathie sensorielle est l'effet neurotoxique le plus généralement observé par les taxanes. Elle est devenue une question centrale dans le domaine de la chimiothérapie antinéoplasique bien qu'elle ne soit pas mortelle. Néanmoins, en France, l'utilisation du docétaxel pour traiter le cancer du sein a été temporairement suspendue, par précaution (début 2017), après le décès de plusieurs femmes, âgées de 46 à 73 ans, suite à des complications digestives. Le docetaxel est en revanche toujours utilisé pour d'autres cancers tels que ceux des poumons, prostate, ORL. Depuis juillet 2017, ce médicament peut à nouveau être utilisé dans le traitement des cancers du sein opérables, décision prise par l'Agence du médicament (ANSM) et l'Institut national du cancer (INCa). Les investigations menées au niveau européen « ne montrent pas d'augmentation de la fréquence des effets indésirables graves et des décès liés à cette molécule » et « le Comité pour l'évaluation des risques en matière de pharmacovigilance (PRAC) de l'Agence européenne du médicament (EMA) a clos la procédure d'alerte lancée par la France ». En effet, sur les vingt dernières années, les décès recensés sont de l'ordre de 1 pour 10 000 patients sur 600 000 patients traités d'après l'enquête nationale de pharmacovigilance. De plus, selon l'ANSM, le Comité estime que « l'augmentation du nombre de cas déclarés en France pour le cancer du sein pourrait être liée à une hausse de la vigilance des professionnels de santé »¹⁰.

Grade 3/4 event	Paclitaxel (%)	Docetaxel (%)	Nab-paclitaxel (%)
Neutropenia	42.6	86.9	30.0
Febrile neutropenia	1.8	10.0	1.8
Anemia	5.1	5.5	1.0
Thrombocytopenia	1.8	2.1	<1.0
Emesis	1.9	6.6	<1.0
Stomatitis	1.0	6.7	<1.0
Diarrhea	1.1	7.2	0.0
Neurotoxicity	7.3	7.0	10.0
Edema	0.0	5.2	0.0
Rash	0.0	1.5	0.0
Hypersensitivity reaction	2.0	2.5	0.0
Treatment-related death	0.7	1.4	0.0

Tableau 4 : Pourcentage de toxicité sur l'organisme lors du traitement du cancer du sein par deux des principaux taxanes (PTX et DTX) et pour une formulation nanoparticulaire de l'un d'entre eux (Nab-PTX) [227].

IV.1.2.2. Choix du docétaxel

Parmi les taxanes, le DTX reçoit un intérêt grandissant depuis sa découverte et son élaboration par Pierre Potier en 1988.

⁹ La myélosuppression est une réduction de l'activité de la moelle osseuse provoquant une réduction du nombre de globules rouges, les plaquettes et les globules blancs. Elle est souvent observée comme un effet secondaire d'un médicament.

¹⁰ D'après l'article du monde (http://www.lemonde.fr/sante/article/2017/07/05/cancers-du-sein-le-docetaxel-a-nouveau-autorise-5156156_1651302.html) et/ou le communiqué de presse de l'ANSM (<http://ansm.sante.fr/S-informer/Presse-Communiques-Points-presse/Docetaxel-levee-de-la-recommandation-d-eviter-son-utilisation-dans-le-cancer-du-sein-et-renforcement-de-l-encadrement-des-pratiques-Communiqué>).

Les formulations contenant le paclitaxel causent de fortes toxicités et nécessitent de fortes doses. En améliorant les étapes de synthèses du paclitaxel, Potier a synthétisé le DTX qui a montré alors une meilleure biodisponibilité et une activité supérieure par rapport au paclitaxel lors de tests *in vitro* et *in vivo* [225]. Par rapport aux molécules thérapeutiques couramment utilisées, le DTX a un large spectre d'activité contre de nombreuses tumeurs [223]. De plus, le DTX est considéré comme plus efficace que la doxorubicine, le paclitaxel et le fluorouracile comme agent cytotoxique antimicrotubule. Par conséquent, les doses injectées en DTX aux patients sont plus faibles que pour le paclitaxel induisant une neuropathie plus faible. Le DTX est à la fois un agent antiangiogénique et un agent antitumoral efficace.

Approuvé par la FDA, le DTX est surtout utilisé pour le traitement du cancer de la prostate réfractaire aux hormones [228]. Pour résoudre les problèmes concernant la faible solubilité dans l'eau et la toxicité systémique, des formulations commerciales de nanovecteurs en DTX ont été développés tels que le CPX-8 (formulation de nanoparticules hydrophobes en DTX) et le BIND-014 (formulations de nanoparticules polymériques chargées en DTX) [229]. Cependant, les injections intraveineuses de ces formulations en DTX, mènent à des concentrations de DTX dans le plasma qui sont mille fois plus faibles après seulement quelques heures [230]. L'utilisation de nanomatériaux inorganiques comme nanovecteurs devient alors une solution pour améliorer le ciblage (injection IV) et/ou pour piéger le DTX directement dans les tumeurs (injection IT). À l'heure actuelle, peu d'études recensent le greffage ou l'incorporation du DTX à la surface de nanopoudres inorganiques. Cela concerne surtout des nanoparticules d'oxyde de fer et à base d'or ou des nanotubes de carbone qui ont été évalués par des essais *in vitro* (cytotoxicité, libération de DTX, production de ROS, internalisation cellulaire et cycle cellulaire). [225, 231, 232].

IV.1.3. Conclusions

L'efficacité des taxanes a été prouvée contre de multiples cellules tumorales. Cette thèse s'est focalisée sur le docétaxel, du fait de son fort potentiel comme agent anticancéreux même s'il n'est pas totalement exempt d'effets secondaires. En raison de son activité intéressante, les doses employées sont alors plus faibles que pour d'autres agents thérapeutiques connus, ce qui induit des toxicités moins sévères. Des efforts significatifs sont en train d'être mis en œuvre pour améliorer le système de délivrance de cette molécule sur les sites tumoraux. L'utilisation d'un nouveau nanovecteur est alors une bonne alternative pour améliorer le maintien de la drogue dans la tumeur et ainsi limiter la diffusion du taxane dans l'organisme et sa toxicité pour les organes sains.

IV.2. Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'imagerie médicale

IV.2.1. Généralités

Afin de suivre les nanotubes fonctionnalisés à l'aide de radioéléments pour connaître leur biodistribution *in vivo*, il est indispensable d'utiliser des molécules organiques capables de piéger ces radioéléments. Les agents chélatants sont capables de complexer spécifiquement et efficacement des

radioisotopes libres tout en évitant la transmétallation possible de ces derniers [157, 187, 191]. Ces radioéléments peuvent avoir des temps de demi-vie courts comme le ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y ou ^{89}Zr (de 1 h jusqu'à 78 h) pour l'imagerie PET ou des temps de demi-vie plus longs comme le $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I ou ^{111}In pour la SPECT (3 h à 67 h). Cette chélation est nécessaire car ces éléments sont potentiellement toxiques pour l'organisme [187].

Chaque ligand est plus ou moins adapté pour complexer de façon stable et durable les éléments car ils ont chacun des propriétés spécifiques [233]. Lors du radiomarquage, les paramètres à prendre en compte pour l'affinité avec un ligand sont notamment le rendement de radiomarquage (même si une faible quantité est nécessaire pour pouvoir réaliser de l'imagerie), la température, les temps et le pH de réaction. Même si ces facteurs définissent la stabilité thermodynamique [233], il n'est pas impossible que dans le milieu biologique, le comportement soit différent. Les conditions optimales de radiomarquage sont complexes car les temps et les températures doivent être suffisamment faibles pour pouvoir respectivement consommer une faible proportion du temps de demi-vie des radioéléments et pour éviter de dénaturer les molécules présentes. Cependant, des temps de radiomarquage trop rapides favorisent la libération des cations [18].

La partie suivante traite des deux types d'agents chélatants utilisés dans cette thèse. Ils sont classés selon leur structure : les agents chélatants de types acycliques et les agents chélatants de types macrocycliques.

IV.2.2. Les agents chélatants de type acyclique

IV.2.2.1. Généralités

Les agents chélatants de types acycliques sont des ligands polyaminopolycarboxylates possédant une cinétique de coordination relativement rapide avec les radiométaux (15 min à température ambiante) contrairement aux agents macrocycliques (30 - 90 minutes à 60 - 95°C) [234]. Cela se traduit par un taux de relargage dans l'organisme qui peut être conséquent [187]. Ils sont donc surtout utilisés pour radiomarquer des nanoparticules en présence d'anticorps ou de protéines à leur surface [48]. L'EDTA et le DTPA sont les ligands acycliques les plus utilisés pour former des complexes stables notamment avec l'indium 111 [235] (Figure 35). Le DTPA permet aussi de complexer le gadolinium pour réaliser de l'IRM [236]. De nombreux travaux ont été réalisés sur le DTPA pour le suivi de nanoparticules d'or et de nanotubes de carbone par exemple [48, 237]. Des dérivés du DTPA peuvent être aussi utilisés afin d'augmenter la stabilité *in vivo* des produits radiopharmaceutiques obtenus [238]. Depuis les travaux de Debouttière, le DTDTPA connaît lui aussi un intérêt grandissant comme agent chélatant pour les AuNPs [163].

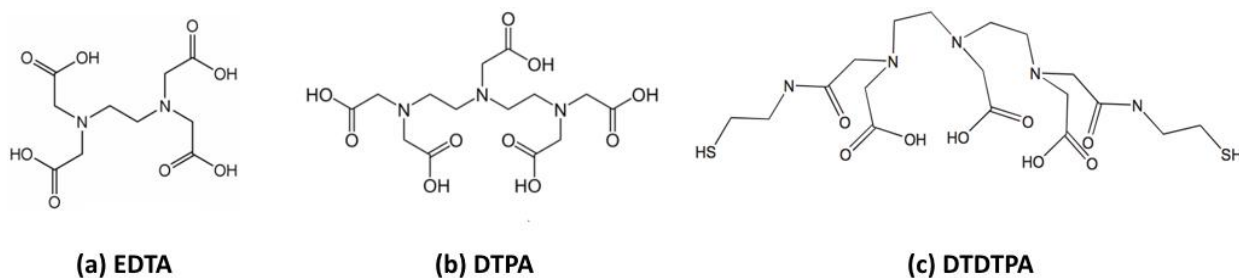


Figure 35 : Les agents chélatants de type acyclique : exemples (a) de l'EDTA, (b) du DTPA et (c) du DTDTPA.

IV.2.2.2. Choix du DTDTPA pour complexer le gadolinium ou l'indium 111

De plus en plus de dérivés du DTPA sont élaborés pour améliorer la stabilité *in vivo* des complexes [238]. Ainsi, le DTDTPA joue un rôle crucial car les constantes de stabilité thermodynamique des complexes formés avec l'indium et le gadolinium sont suffisamment élevées pour une bonne chélation ($K_{\text{DTDTPA-}^{111}\text{In}} = 10^{21}$ à 10^{23} ; $K_{\text{DTDTPA-Gd}^{3+}} = 10^{16}$ à 10^{18}) bien que moindres au regard du DTPA ($K_{\text{DTPA-}^{111}\text{In}} = 10^{29,5}$; $K_{\text{DTPA-Gd}^{3+}} = 10^{22,5}$) [163, 166, 187]. Ce nouveau ligand permet d'améliorer son comportement biologique [163] et d'être facilement accroché aux AuNPs lors de leur formation (une seule étape) à l'aide des fonctions thiols de part et d'autre de la molécule. Ces groupements thiols créent des multicouches de DTDTPA robustes tout en améliorant la stabilité colloïdale du système par les fonctions carboxylates (paragraphe II.2.). La plupart des études sur le DTDTPA sont faites sur des AuNPs, il a été démontré que la molécule est biocompatible avec et sans gadolinium sur des cellules HeLa [171]. Le DTDTPA a donc un rôle multifonctionnel et devient intéressant pour complexer l'indium (imagerie nucléaire, SPECT) ou le gadolinium (IRM) pour des études *in vivo* [166, 179].

IV.2.3. Les agents chélatants de type macrocyclique

IV.2.3.1. Généralités

Les agents chélatants macrocycliques (Figure 36) sont plus utilisés pour complexer les radioéléments car leur comportement biologique reste bien meilleur que celui des agents acycliques, même s'ils ont tous deux un comportement thermodynamique similaire [239]. En effet, les conditions de radiomarquage des chélateurs macrocycliques permettent une complexation plus stable, évitent le relargage d'ions et le phénomène de transmétallation [187]. Par ailleurs, la forme géométrique de ces chélateurs favorise davantage le piégeage de radioéléments que les types acycliques, qui demandent de fortes réorganisations spatiales de la molécule pour permettre la coordination des radiométaux [240].

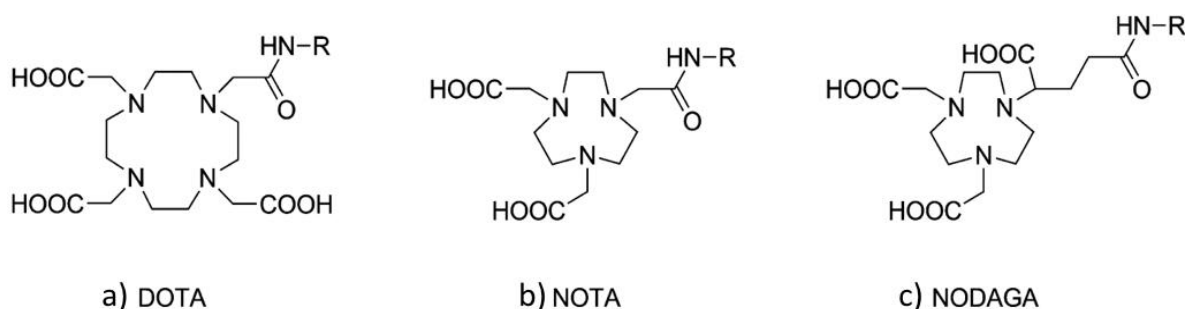


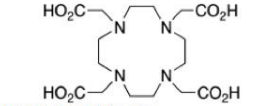
Figure 36 : Les agents chélatants de types macrocycliques : exemple a) du DOTA, b) du NOTA et du c) NODAGA.

IV.2.3.2. Choix du DOTA pour complexer l'indium 111

Le DOTA est le ligand macrocyclique le plus utilisé pour le radiomarquage par un métal radioactif en vue de réaliser de l'imagerie nucléaire. De plus, il est possible de complexer un grand nombre d'isotopes dont ^{111}In , ^{177}Lu , $^{86/90}\text{Y}$, ^{225}Ac et $^{44/47}\text{Sc}$ (Tableau 5) [187]. En effet, sa forme géométrique permet de former un complexe stable et octacoordiné avec les radioéléments en utilisant les quatre azotes et les quatre acides carboxyliques [241]. Le DOTA a bien été étudié pour complexer le ^{64}Cu ou le ^{68}Ga , mais le complexe formé avec ces deux éléments est moins stable thermodynamiquement qu'avec de plus petits macrocycles comme le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique) ou le

NODAGA (1-1,3-carboxypropyle)-4,7-carboxyméthyle-1,4,7-triazacyclononane). Malgré ceci, le DOTA reste largement utilisé pour complexer le cuivre et le gallium car il fournit des propriétés *in vivo* meilleures que ses homologues [187].

L'indium est alors intéressant car il possède un temps de demi-vie élevé ($t_{1/2} = 67,2$ h) [186] et possède une bonne affinité avec le DOTA, lui conférant une stabilité thermodynamique du même ordre de grandeur que d'autres agents chélatants également sur le marché ($K_{\text{DOTA-}^{111}\text{In}} = 10^{23,9}$). Le temps de demi-vie permet notamment d'augmenter le temps de travail lors de l'utilisation de ce ligand et de pouvoir réaliser de l'imagerie nucléaire SPECT sur des temps plus long, ce qui est d'intérêt pour évaluer la cinétique de biodistribution/élimination des nanoparticules. Cet agent chélatant a déjà été greffé sur des nanoparticules d'oxyde de fer [242], AuNPs [243], des nanotubes de carbones [158] et plus récemment sur des TiONts [124, 156] afin de suivre la biodistribution de ces nanovecteurs par imagerie nucléaire. L'utilisation de cet agent avec certains nanovecteurs (nanoparticules d'oxyde de fer, AuNPs) permet de créer une sonde bimodale pour l'IRM avec la SPECT ou la PET ou encore pour la TDM avec la SPECT ou la PET.

Chelator and common bifunctional derivatives	Radiometal ion	^a	Radiolabeling conditions	log K_{ML}	Proposed geometry
 DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, maximum CN = 8, donor set N_4O_4	$^{64}\text{Cu}^{2+}$	~	25–90 °C, 30–60 min, pH 5.5–6.5	22.2, 22.7	Distorted octahedron
	$^{67/68}\text{Ga}^{3+}$	~	37–90 °C, 10–30 min, pH 4.0–5.5	21.3 (pM 15.2, 18.5)	Distorted octahedron
	$^{44/47}\text{Sc}^{3+}$	✓	95 °C, 20–30 min, pH 4.0	27.0 (pM 26.5)	Square antiprism
	$^{111}\text{In}^{3+}$	✓	37–100 °C, 15–60 min, pH 4.0–6.0	23.9 (pM 17.8–18.8)	Square antiprism?
	$^{177}\text{Lu}^{3+}$	✓	25–100 °C, 15–90 min, pH 4.0–6.0	23.5, 21.6 (pM 17.1)	Square antiprism
	$^{86/90}\text{Y}^{3+}$	✓	25–100 °C, 15–90 min, pH 4.0–6.0	24.3–24.9	Square antiprism
	$^{213}\text{Bi}^{3+}$	~	95–100 °C, ¹³³ 5 min, pH 6.0–8.7	—	Square antiprism
	$^{212}\text{Pb}^{2+}$	~	25–75 °C, 30–60 min, pH 4.0–5.5	—	Square antiprism
$^{225}\text{Ac}^{3+}$	✓	37–60 °C, 30–120 min, pH 6.0	—	Square antiprism?	

^a Green "✓" = good/best match, orange "~" = suitable match, or requires more evaluation but shows potential, red "✗" = poor/unstable match.

Tableau 5 : Récapitulatif des possibles chélation des radiométaux avec le DOTA pour l'imagerie nucléaire, des conditions de radiomarquage, des constantes de stabilités thermodynamiques et de la géométrie de coordination [187].

IV.2.4. Conclusions

L'apport d'un agent chélatant sur le nanovecteur permet d'apporter des propriétés complémentaires aux nanohybrides pour le diagnostic. En effet, selon la nature et l'affinité des radioéléments avec le chélateur, différentes techniques d'imagerie peuvent être réalisées (seules ou combinées) en vue de connaître la biodistribution des nanoparticules *in vivo* et d'avoir des images de haute résolution en contournant les limitations des modalités. Dans la suite du manuscrit, ce sont le DOTA et le DTDTPA qui ont retenu toute notre attention pour jouer le rôle de ligand pour l'indium 111.

D'un côté, le DOTA, qui est un agent macrocyclique, présente un faible taux de relargage *in vivo* de radioéléments et il est bien connu pour complexer l'indium 111 (SPECT). Il est alors nécessaire de modifier la surface des TiONts pour greffer ce ligand. C'est cette approche qui a été retenue pour l'évaluation des TiONts-DTX. De l'autre côté, le DTDTPA a été choisi pour contrôler la taille et la morphologie des AuNPs et pour avoir la possibilité de complexer l'indium 111 (SPECT) dans le cas de l'évaluation des TiONts-AuNPs.

V. Le modèle de cancer choisi pour cette étude : le cancer de la prostate

Cette étude traite particulièrement du cancer de la prostate qui est le deuxième cancer le plus diagnostiqué et la cinquième cause de décès chez l'homme dans le monde entier. Fort de ce constat, le cancer de la prostate requiert à ce jour des solutions thérapeutiques nouvelles, notamment en cas de récurrence pour des cancers radiorésistants.

V.1. Données épidémiologiques

Le cancer de la prostate représente aujourd'hui 25% des cancers masculins et bien que seuls les hommes puissent être touchés par ce type de cancer, il figure comme le deuxième cancer le plus diagnostiqué tous sexes confondus. En effet, 1,1 millions de nouveaux cas ont été estimés en 2012 dans le monde entier avec plus de 300 000 décès au cours de cette même année [244]. Les zones et les pays les plus touchés sont l'Australie/Nouvelle-Zélande, l'Amérique (nord et sud), l'Europe et l'Afrique (centre et sud) (Figure 37). L'utilisation du diagnostic de l'antigène prostatique spécifique (prostate-specific antigen, PSA en anglais) n'est pas systématique et peut varier selon les régions du monde pouvant refléter des disparités d'un point de vue épidémiologique.

Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans l'étiologie¹¹ du cancer de la prostate. Ils incluent l'alimentation, directement impliquée sur les études écologiques des zones régionales ou nationales et les variations ethniques ; la fonction endocrinienne¹², impliquée dans la croissance prostatique normale et dans les traitements du cancer de la prostate ; le facteur génétique de l'individu ; différents aspects sur le comportement sexuel et enfin, l'exposition à différents risques professionnelles (notamment l'exposition au cadmium) [245]. D'ailleurs, l'un des taux de mortalité le plus élevé est retrouvé pour l'Afrique centrale et du sud ainsi que dans les caraïbes en raison de paramètres génétiques (Figure 38).

¹¹ L'étiologie est l'étude des causes et des facteurs d'une maladie. Ici, elle concerne sur le cancer de la prostate.

¹² La fonction endocrinienne est l'ensemble des activités des glandes endocriniennes, i.e. des organes dont le rôle est de fabriquer des hormones qui se déversent dans le sang.

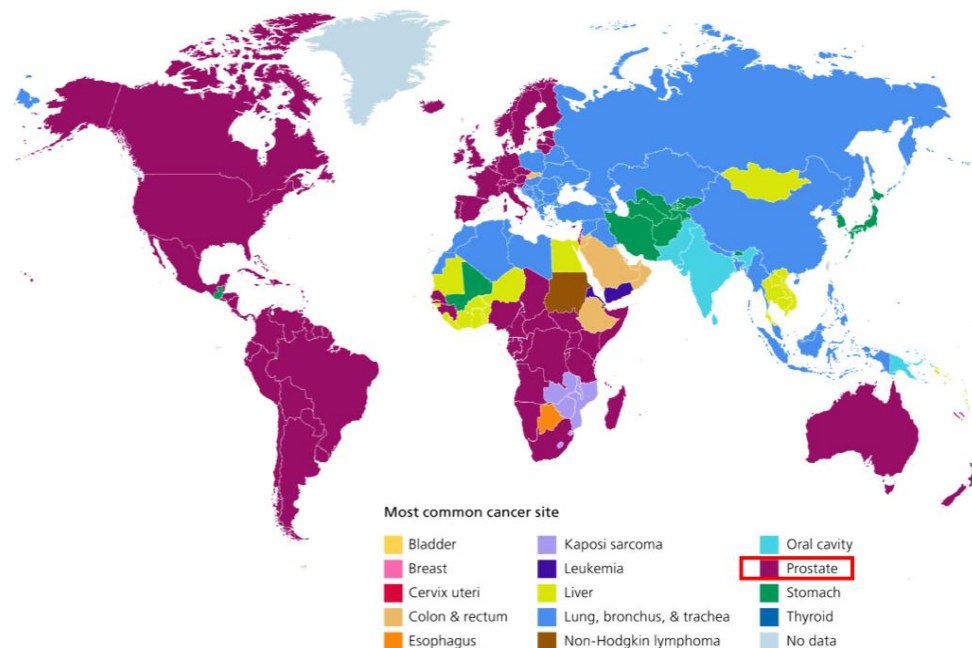


Figure 37 : Les cancers les plus courants par pays (source : *global cancer facts & Figures 3rd edition*. Copyright 2012, American Cancer Society).

En France, environ 71 000 nouveaux cas de cancer de prostate sont estimés chaque année et en 2012, le taux de mortalité a été de 8 700 décès d'après la ligue contre le cancer¹³. En raison d'une population vieillissante, ce cancer est de loin le plus répandu en France car il touche particulièrement les individus ayant un âge supérieur à 50 ans. Il représente 34,3% des nouveaux cas tous cancers confondus et la mortalité due à ce cancer est de 10,3% sur le nombre total de décès liés aux cancers.

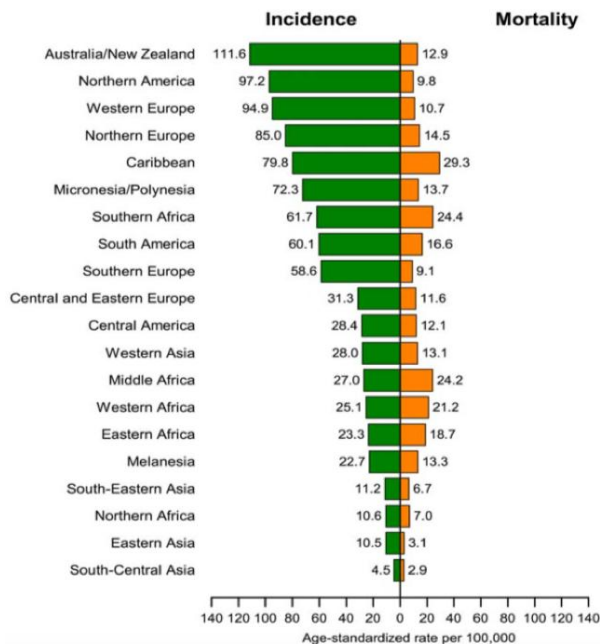


Figure 38 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate [244].

¹³ <https://www.ligue-cancer.net/article/6397-les-chiffres-cles-des-cancers> consulté le 1^{er} juillet 2017.

V.2. Les traitements actuels

Le cancer de la prostate a une évolution relativement lente par rapport à d'autres types de cancers. Il peut être silencieux ou responsable de signes urinaires anormaux (Figure 39). Le pronostic et les options de traitement dépendent fortement du stade d'avancement du cancer, de l'âge du patient et si c'est une récurrence. Ainsi, la prise en charge d'un patient est notamment déterminée selon l'étendue du cancer (localisé dans la prostate ou étendu aux ganglions ou à d'autres organes), l'agressivité des cellules cancéreuses et le taux d'antigène prostatique spécifique dans le sang. De plus, d'autres facteurs doivent être pris en compte pour choisir au mieux le moyen de traitement, comme les effets secondaires lors des traitements, les traitements antérieurs, si le patient a d'autres problèmes de santé et selon le souhait du patient [246, 247].

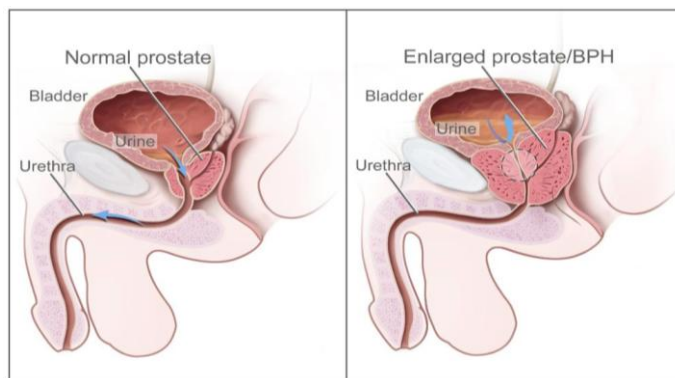


Figure 39 : Illustration d'une prostate saine (gauche) et d'une hyperplasie bénigne de la prostate (BPH, droite) pouvant être l'un des symptômes du cancer de la prostate. Copyright, NIH/National cancer Institute.

À l'heure actuelle, en cas de cancer localisé, il existe différents moyens pour traiter le cancer de la prostate. Les méthodes suivantes sont décrites dans l'ordre croissant selon leur potentiel d'utilisation pour lutter contre des stades avancés de cancer de prostate [247]. La première méthode est la chirurgie qui est préconisée pour des stades précoces et pour des patients en bonne santé. Cette technique consiste à retirer la prostate et les vésicules séminales, elle appelée prostatectomie. Un autre traitement pour des stades précoces est la radiothérapie externe. Cette technique est relativement utilisée pour les personnes âgées ou pour ceux qui ont des problèmes de santé. Un des moyens de traitement les plus utilisés est la curiethérapie (radiothérapie interne) qui consiste à injecter en IT, de manière permanente, des grains d'iodes radioactifs dans la prostate à l'aide d'aiguilles sous anesthésie générale (Figure 40). Les doses de radiations peuvent être plus ou moins fortes selon le type de curiethérapie [248]. Et enfin, le dernier moyen de traitement consiste à traiter les cellules de cancer de la prostate par des médicaments. Cette méthode repose sur l'hormonothérapie et sur la chimiothérapie (administrée le plus souvent par voie IV). Cependant, 30% à 50% des patients ont une rechute biochimique (ré-augmentation du taux d'antigène de prostate spécifique). Différents traitements sont alors combinés comme expliqué au cours de ce chapitre (paragraphe I.1.2. et IV.1.1.). Quand la tumeur métastatique résiste à tous les traitements proposés, une chimiothérapie à base de DTX est alors envisagée pour améliorer l'effet radiosensibilisant [228].

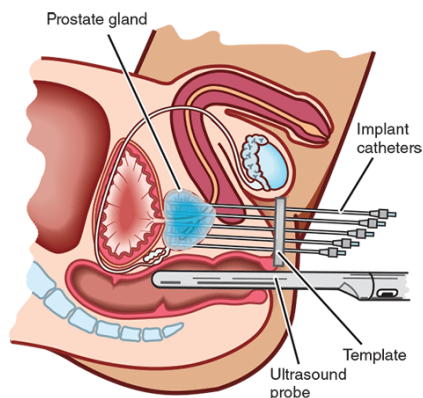


Figure 40 : Principe de la curiethérapie (prostate.org.au).

La recherche sur le cancer de la prostate s'oriente de plus en plus vers la prévision du devenir de la tumeur lorsqu'elle est soumise à la chimiothérapie mais l'objectif est aussi de contourner les mécanismes de résistance pour éviter les métastases et améliorer les traitements. Il s'agit d'identifier les caractéristiques de la tumeur, qui sont propres à chaque patient, dans le but d'avoir un traitement personnalisé et de développer des thérapies moins toxiques pour l'organisme mais tout aussi efficaces pour améliorer la qualité de vie du patient.

V.3. Le traitement novateur proposé dans cette étude

L'objectif est de développer des thérapies plus efficaces et moins toxiques pour l'organisme en développant de nouveaux traitements à base de nanoparticules. Cette étude propose alors d'immobiliser et de vectoriser un agent chimiothérapeutique, le DTX, grâce à un nanovecteur afin de limiter ou d'éviter la toxicité des taxanes en localisant son administration directement dans la tumeur et non par des injections systémiques, comme c'est le cas actuellement pour les formulations du DTX seul. De plus, l'objectif sur le long-terme, est d'injecter ce nanovecteur *via* les aiguilles *ad hoc* (Figure 40), avec les grains radioactifs, comme c'est le cas par curiethérapie. Cette technique pourra notamment optimiser le ciblage du traitement et l'efficacité thérapeutique en maintenant le nanomédicament dans la tumeur, sans que le principe actif diffuse dans l'organisme. Très récemment, une étude a rapporté l'injection de nanoparticules d'or en présence de palladium en IT, *via* la curiethérapie, afin d'envoyer de faibles doses de radiations sur la tumeur de prostate [249]. Cela montre l'engouement et le possible intérêt que peut porter cette nouvelle méthode alternative pour pallier aux inconvénients des traitements du cancer de la prostate.

VI. Conclusions

Les nanoparticules d'or sont actuellement largement utilisées dans de nombreux domaines médicaux (radiothérapie, délivrance de médicaments, imagerie X (TDM) et imagerie bimodale TDM/IRM, TDM/SPECT ou TDM/PET) grâce à leurs propriétés physico-chimiques ou à leur

fonctionnalisation de surface. Plus récemment, des recherches se sont elles aussi tournées vers les applications biomédicales des TiONts. Ce nouveau nanovecteur est de plus en plus étudié pour sa morphologie qui favorise son internalisation dans les cellules cancéreuses sans induire de cytotoxicité mais aussi car il possède lui-même un léger effet radiosensibilisant. Cependant, de telles applications nécessitent de contrôler la taille, la morphologie, la chimie de surface, la biocompatibilité et la stabilité colloïdale des nano-objets dans les conditions biologiques.

Dans le but de développer un nouveau moyen thérapeutique pour lutter contre le cancer et plus particulièrement le cancer de la prostate, ces travaux de thèse traitent deux stratégies pour l'élaboration d'un nouveau nanohybride, ceci en prenant en compte toutes les considérations décrites dans ce chapitre. Le nanohybride à base de nanotubes de titanate est injecté en IT pour vectoriser et immobiliser un agent thérapeutique bien connu pour traiter le cancer de la prostate, le docétaxel, et un agent chélatant pour suivre le traitement et la biodistribution des nanovecteurs (Chapitre 2. , première génération du nanomédicament TiONts-DTX). L'amélioration de la stabilité colloïdale et de la biocompatibilité sont des obligations pour ce genre d'application (Chapitre 3.). Par la suite, ce traitement novateur est amélioré en couplant les TiONts avec les AuNPs pour accroître l'effet radiosensibilisant (Chapitre 4.), seconde génération du nanomédicament qui devient TiONts-AuNPs-DTX).

Chapitre 2. Développement d'un nouvel outil théranostique à base de nanotubes de titanate pour le traitement du cancer de la prostate

La combinaison d'un médicament anticancéreux avec des nanoparticules d'oxyde métallique est d'un grand intérêt en nanomédecine pour traiter le cancer. Ce chapitre est dédié à l'élaboration d'un nouvel outil théranostique très prometteur à base de TiONts pour lutter contre le cancer de la prostate. De ce fait, ce chapitre est découpé en cinq parties afin de montrer la stratégie retenue et notons qu'une partie a été réalisée durant mon stage de M2. La première partie traite de la synthèse des TiONts. La seconde partie est consacrée à leur modification de surface *via* des liaisons covalentes afin d'améliorer leur biocompatibilité et leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. La troisième partie est dédiée au greffage de l'agent thérapeutique, le docétaxel, à la surface des TiONts. La fonctionnalisation des TiONts par un agent macrocyclique (chélation de radioéléments), le DOTA, est présentée dans la quatrième partie. Enfin, la cinquième et dernière partie est consacrée à l'évaluation du nanohybride par des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* pour observer l'impact et l'influence du traitement et pour étudier la biodistribution des nanotubes. Ce chapitre fait l'objet de deux publications acceptées en 2017. L'une est intitulée « Taxane-Grafted Metal-Oxide Nanoparticles as a New Theranostic Tool against Cancer: The Promising Example of Docetaxel-Functionalized Titanate Nanotubes on Prostate Tumors » dans le journal *Advanced Healthcare Materials* pour la partie chimie. Quant à la partie biologique de ce chapitre, un second article a été publié dans le journal *International Journal of Nanomedicine* et s'intitule « Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model » concernant les tests biologiques du nanohybride final. Deux autres publications sur l'évaluation de la toxicité ou de l'innocuité des TiONts-APTES sont en cours de rédaction.

I. Synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate dans notre laboratoire

Depuis plusieurs années, la synthèse des TiONts est maîtrisée et bien contrôlée [76, 124]. C'est la voie hydrothermale qui a été choisie pour élaborer les TiONts car il a été montré que cette méthode permettait d'obtenir de faibles dimensions en vue des applications biomédicales visées (Chapitre 1. II.1.1.).

I.1. Protocole expérimental de synthèse et de purification des nanotubes de titanate

Dans ces travaux de thèse, les TiONts sont synthétisés par voie hydrothermale classique en milieu basique à l'aide d'un réacteur commercial (Figure 41). Tout d'abord, une poudre de précurseur de TiO₂ rutile (Tioxide®) est ajoutée à une solution de soude concentrée (10 M ; 250 mL). La masse du précurseur utilisée est de 1 g. Ensuite, la suspension subit un traitement à la canne à ultrasons pendant 30 min (2 s de pulse et 2 s d'arrêt) avec une puissance de 375 W. Après ultrasons, la suspension, possédant une température de 55°C avec un pH de 13,2, est introduite dans un récipient en Téflon

(PolyTétraFluoroEthylène, PTFE), lui-même placé dans le réacteur hydrothermal. L'agitation mécanique du milieu réactionnel s'est faite à l'aide de pales à 120 tr/min. Le milieu est alors chauffé à une température de 155°C induisant une pression de 3,5 bar pendant 36 h. Enfin, il est considéré que le début de synthèse a lieu lorsque la température du mélange atteint 110°C.

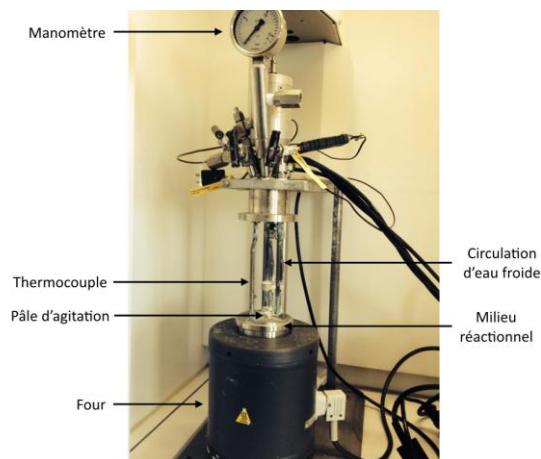


Figure 41 : Photographie du réacteur hydrothermal (Marque : Anton Parr ; modèle : 4567 ; $T_{ma} = 350^{\circ}\text{C}$; $P_{max} = 200 \text{ bar}$) utilisé pour la synthèse des TiONts en milieu basique.

Suite à la fin de la réaction et après deux heures de refroidissement de la suspension, des étapes de purifications sont nécessaires afin d'éliminer les ions résiduels venant du précurseur non réagi et de la soude en excès et ne garder que les TiONts (Figure 42). Tout d'abord, la première étape de purification post-synthèse de la suspension est effectuée à l'aide d'une centrifugeuse ($24\ 000 \times g$ pendant 10 min) (Figure 42a). Cette étape a permis notamment de diminuer significativement la concentration en ions Na^+ et OH^- contenus dans la suspension afin de procéder à la deuxième étape de purification, la dialyse (Figure 42b). En effet, la membrane de dialyse utilisée est en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 12 – 14 kDa et n'est pas assez résistante pour pouvoir contenir une suspension à ce pH très élevé. Cette étape de dialyse a pour but de diminuer le pH de la suspension ($\text{pH}_{\text{initial}} = 13,2$) jusqu'à un pH égal à 7. La membrane contenant la suspension est plongée dans un récipient de 10 L d'eau déionisée afin de favoriser et d'accélérer les échanges d'ions résultant de la diffusion d'espèces par effet d'osmose. Le gradient de concentration est d'autant plus élevé que la différence de volume de part et d'autre de la membrane de dialyse est élevée. Le pH des eaux de lavages est contrôlé puis l'eau de dialyse est changée régulièrement pour garder un gradient de concentration élevé et pour accentuer ces échanges d'ions. L'eau de dialyse est renouvelée au bout de 5 h (pH = 13), puis après 24 h, le pH atteint est de 8,5. Enfin, un dernier changement d'eau est réalisé afin d'avoir un pH égal à 7 au bout de 5 jours après le commencement de la dialyse.

Ensuite, la suspension est ultrafiltrée afin de purifier au maximum les TiONts avec des temps de purification plus courts (Figure 42c). L'ultrafiltration est une filtration sur membrane en cellulose régénérée de taille de pore fixée (ici, le seuil de coupure est de 100 kDa avec une taille de pores estimée à 13 nm) semi-perméable que le liquide de la suspension traverse à l'aide d'une différence de pression ($P_{\text{azote}} = 1,5 \text{ bar}$). Les TiONts, possédant des poids moléculaires supérieurs au seuil de coupure, sont retenus tandis que l'eau et les ions traversent la membrane. Ainsi, la suspension est, dans un premier temps, redispersée à l'eau déionisée puis à l'eau ultrapure avant d'être ultrafiltrée jusqu'à ce que la conductivité du filtrat soit aux alentours de $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\sigma_{\text{eau ultrapure}} \approx 6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Pour finir, seule une petite quantité de suspension est lyophilisée pour récupérer les TiONts sous forme de poudre de couleur blanche (Figure 42d) pour pouvoir réaliser des caractérisations nécessitant la forme pulvérulente des nanohybrides telles que l'analyse thermogravimétrie (ATG), la mesure de la surface spécifique par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET), la spectroscopie photoélectronique X (XPS), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) et la spectroscopie Raman. La majeure partie des TiONts est gardée en suspension pour effectuer des caractérisations en voie liquide comme la microscopie électronique en transmission (MET) qui nécessite une préparation à partir d'une suspension, la spectroscopie UV-visible (UV) et la zétamétrie. De plus, la suite des greffages est réalisée à partir d'une suspension afin de limiter l'agglomération des nanotubes observée lors du séchage et donc d'améliorer leur stabilité colloïdale en vue des applications biomédicales visées. Les caractérisations effectuées sur les nanotubes de titanate et tous les greffages des chapitres 3 et 4 sont réalisées à partir de deux lots regroupant chacun trois synthèses hydrothermales de TiONts après les avoir mélangés pendant 24 h au turbula, ceci afin d'avoir des résultats reproductibles. La quantité de départ de chaque lot de TiONts nus était alors de 2 400 mg.

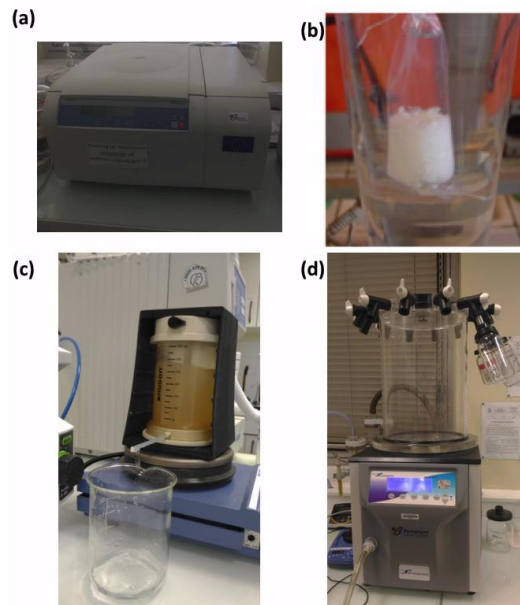


Figure 42 : Photographies des différentes techniques de purifications et de séchage utilisées : (a) la centrifugation, (b) la dialyse, (c) l'ultrafiltration et (d) la lyophilisation.

I.2. Caractérisations des nanotubes de titanate

I.2.1. Étude morphologique et structurale des nanotubes de titanate

Après la purification des TiONts, le MET est la seule technique permettant de mettre en évidence la morphologie des TiONts après synthèse. Les échantillons MET de ce manuscrit sont tous préparés sur des grilles en carbone à partir d'une même concentration de suspension (1 mg.mL^{-1}) dans un mélange eau/éthanol (1 : 1 en volume). Ainsi, il est observé qu'il y a bien eu formation de TiONts avec une structure enroulée en forme de spirale possédant une cavité interne (Figure 43a-c). De plus, les clichés MET permettent de déterminer les dimensions des TiONts au moyen d'un comptage de 400 nanotubes pour la longueur et de 80 nanotubes pour le diamètre (extérieur et intérieur). Ceci a

donné une longueur moyenne de (170 ± 50) nm, un diamètre extérieur moyen de (10 ± 1) nm et un diamètre intérieur de (4 ± 1) nm. Il est ainsi montré qu'il est plus difficile de contrôler la longueur des TiONts que les autres dimensions, même si ces valeurs sont en accord avec la littérature [101, 103, 110]. Par cette technique, la distance entre les couches des nanotubes lors de leur enroulement a pu être calculée ($d = 8 \text{ \AA}$ est la distance entre deux couches perpendiculaire à la longueur) et sont conformes à celle trouvée dans la littérature [116]. Cependant, il est possible de visualiser quelques sous-produits de synthèse lors de la formation des TiONts : des nanorubans et des nanofeuillets (Figure 43d) [122, 123]. Ils peuvent être un problème en vue des applications biomédicales visées en raison de leurs dimensions plus élevées que les TiONts. Néanmoins, leur taux étant de l'ordre de 5% après un comptage MET ($n = 3000$), ces sous-produits seront considérés comme négligeables. Le pourcentage respectif de nanorubans et de nanofeuillets est de 4% et 1%. Ces taux sont faibles au regard des autres travaux publiés [101, 124]. Ainsi, la synthèse des TiONts est de fait considérée comme bien maîtrisée.

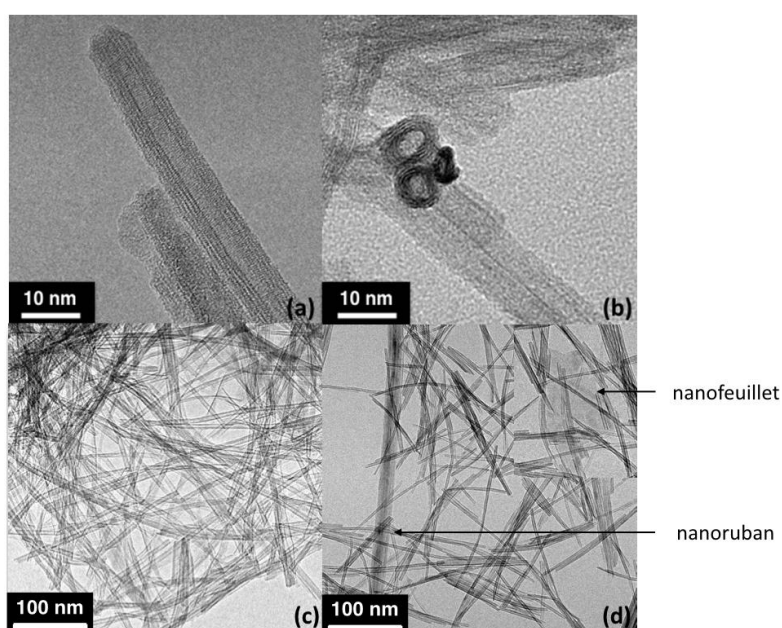


Figure 43 : Clichés MET de la synthèse des TiONts par voie hydrothermale montrant la morphologie (a-c) des TiONts, (d) des nanorubans et des nanofeuillets (désignés par les flèches).

La surface spécifique élevée des TiONts, elle est de $(174 \pm 1) \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, a révélé leur fort potentiel pour encapsuler et vectoriser des molécules sur leur surface notamment grâce à leur cavité interne.

Les TiONts sont caractérisés par spectroscopie Raman afin d'avoir des informations structurales (Figure 44). Cette technique a permis de différencier les nanotubes avec les résidus possibles de TiO_2 , les nanorubans et les nanofeuillets. Le spectre Raman des TiONts est en accord avec la littérature montrant leur signature à 286 cm^{-1} , 458 cm^{-1} , 681 cm^{-1} , 722 cm^{-1} , 807 cm^{-1} et 921 cm^{-1} [76, 124, 129]. Quelques bandes caractéristiques des nanorubans sont observées à 175 cm^{-1} et à 198 cm^{-1} [101, 122]. Ces bandes de vibrations, en adéquation avec le MET, montrent donc que les nanorubans sont produits lors de la synthèse hydrothermale. Cependant, aucun pic correspondant au TiO_2 rutile n'a été signalé : soit ils ne sont plus présents car le TiO_2 perd sa structure pour former les TiONts, soit ils ne sont pas en quantité suffisante pour pouvoir les visualiser sur le spectre [124]. Quant aux nanofeuillets, ils ne sont pas observés en Raman car ils n'ont pas de signature spécifique [124].

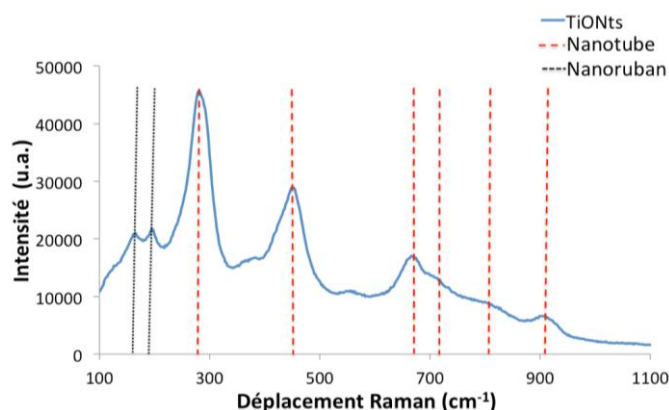


Figure 44 : Spectre Raman des TiONts nus obtenus après traitement hydrothermal avec les bandes de vibrations caractéristiques des TiONts (tirets rouge) et des nanorubans (pointillés noir).

1.2.2. Composition chimique des nanotubes de titanate

L'analyse de surface par XPS permet, quant à elle, de déterminer l'environnement chimique des TiONts et leur composition atomique. En effet, avec une profondeur d'analyse de l'ordre de 5 nm, c'est au final le tube nu dans sa globalité qui est analysé. Afin de traiter les résultats dans les mêmes conditions après l'acquisition, le calibrage lors du traitement des fenêtres XPS sur le logiciel Casa XPS est effectué à partir du seuil $Ti_{2p(3/2)}$ à 458,7 eV. Les valeurs des concentrations atomiques sont données par le logiciel MultiPak. Il est à savoir que les largeurs à mi-hauteur (FWHM : Full Width at Half maximum en anglais) de toutes les composantes étudiées par XPS dans ce manuscrit sont proches et peuvent varier de 1,5 eV à 2,0 eV.

L'analyse faite par XPS a bien révélé du titane, de l'oxygène et la présence de sodium est confirmée (Tableau 6). Le sodium est notamment dû à l'apport de NaOH durant le traitement hydrothermal et a provoqué une composition intermédiaire entre l'hydrogénotitanate ($H_2Ti_3O_7$) et le titanate de sodium ($Na_2Ti_3O_7$) [101]. Par ailleurs, les concentrations déterminées sont proches de celles calculées théoriquement pour la composition $Na_2Ti_3O_7$. Il est à noter que la concentration en sodium est mesurée à l'aide des électrons Auger du Na_{KLL} car le niveau 1s du sodium se situe au même niveau que certains niveaux d'électrons Auger du titane lorsqu'une source en aluminium est utilisée. Ceci a pour conséquence d'interférer avec la concentration *via* l'analyse du niveau Na_{1s} . De plus, le taux de carbone retrouvé correspond au carbone de pollution et aux résidus qui proviennent du précurseur rutile. Ici, le taux de carbone de pollution trouvé sur le précurseur rutile est très faible (<1%) comparé aux taux habituellement trouvés en XPS [124].

Concentration atomique (%)	C_{1s}	O_{1s}	Na_{KLL}	Ti_{2p}
TiONts (expérimental)	7,3	58,7	13,5	20,5
% atomique / Ti (expérimental)	0,3	2,9	0,7	1,0
$Na_2Ti_3O_7$ (théorique)	-	58,3	16,7	25,0
% atomique / Ti (théorique)	-	2,3	0,7	1,0

Tableau 6 : Analyse XPS des concentrations atomiques des éléments chimiques des TiONts nus.

En ce qui concerne l'environnement chimique des éléments, le niveau Ti_{2p} est observé et les seuils O_{1s} et C_{1s} sont décomposés (Figure 45). Le pic O_{1s} met en évidence deux composantes. La composante se trouvant à 530,1 eV correspond à l'oxygène de réseau des nanotubes (O^{2-}) avec un taux de 88,8% sur la totalité de l'oxygène. Une deuxième composante est visible à 532 eV correspondant aux hydroxyles de surface (OH) avec un taux de 11,2%. Ainsi, parmi les 58,7% en concentration atomique O_{1s} , il y a 52,1% qui sont attribuées à l'oxygène de réseau des TiONts. En prenant l'exemple de la composition chimique théorique du $Na_2Ti_3O_7$, la concentration atomique expérimentale par rapport au titane devient alors très proche avec un rapport de 0,7 pour le sodium et de 2,5 pour l'oxygène. D'autre part, au niveau C_{1s} , une partie de la contribution correspond au carbone de la pollution avec la composante attribuée aux liaisons $C-C/C-H$ à 284,7 eV (58,6%).

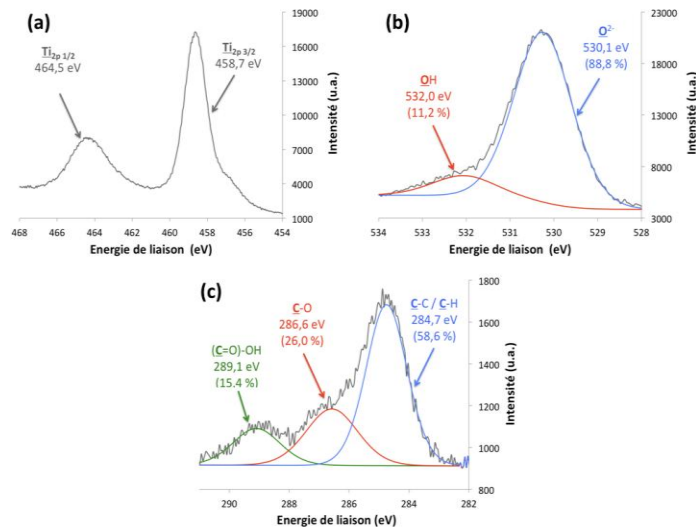


Figure 45 : Analyses XPS : décomposition du niveau (a) Ti_{2p} , (b) O_{1s} et (c) C_{1s} des TiONts en XPS.

Dans un second temps, les TiONts sont caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) en utilisant des pastilles de KBr (Figure 46). Cette technique de caractérisation a montré des bandes de vibrations caractéristiques des nanotubes de titanate, notamment les bandes de vibrations se trouvant à 450 cm^{-1} , 700 cm^{-1} et 890 cm^{-1} . L'IR-TF permet, alors, de mettre en évidence d'autres pics de vibrations correspondant à leur composition chimique de surface et notamment aux groupements hydroxyles comme vus précédemment. Parmi ceux-ci, l'eau adsorbée à la surface des TiONts peut être clairement identifiée à 1620 cm^{-1} tandis que les hydroxyles sont retrouvés à 3150 cm^{-1} et à 3370 cm^{-1} .

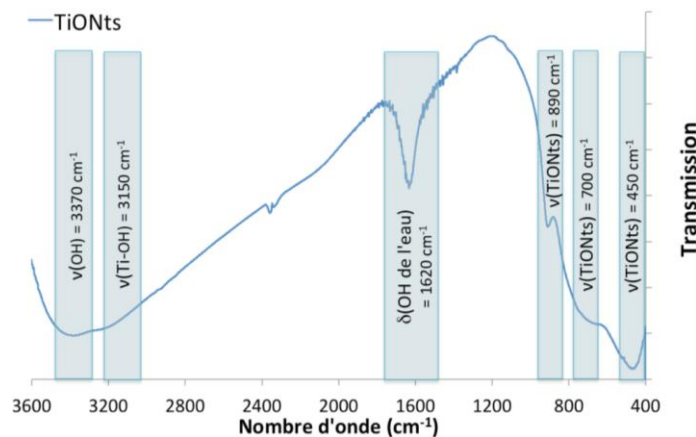


Figure 46 : Spectre infrarouge des nanotubes nus.

Une analyse thermogravimétrique (ATG) est réalisée de 50°C à 800°C (Figure 47) sous air. Le taux moyen d'hydroxyles à la surface des TiONts nus est déterminé à l'aide de l'Équation 2 :

$$N_{OH} = \frac{2 \times \frac{\Delta m}{m} \times N_A}{M(H_2O) \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

Avec : N_{OH} : Nombre d'hydroxyles par nm^2
 Δm : Perte de masse de l'eau chimisorbée (g)
 m : Masse initiale de l'échantillon (g)
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol^{-1})
 $M(H_2O)$: Masse molaire de l'eau ($g \cdot mol^{-1}$)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts ($m^2 \cdot g^{-1}$)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un taux par nm^2

Équation 2 : Relation pour calculer le taux moyen de recouvrement des hydroxyles à la surface des TiONts.

La perte de masse considérée pour calculer le taux de recouvrement des hydroxyles prend en compte seulement l'eau chimisorbée déterminée à l'aide de la courbe dérivée en masse (DTG) de 175°C à 800°C. En effet, avant la deuxième inflexion, la perte de masse est majoritairement due à l'eau physisorbée en raison d'un séchage insuffisant ou bien à la reprise d'humidité atmosphérique sur l'échantillon entre le séchage et l'analyse ATG. Avec une perte de masse de 2,8% et une surface spécifique de $(174 \pm 1) m^2 \cdot g^{-1}$, le taux d'hydroxyles est de $(10,6 \pm 1,5) OH \cdot nm^{-2}$ sachant que la condensation d'une molécule d'eau implique deux hydroxyles [192]. Le taux d'hydroxyle à la surface des TiONts varie faiblement entre les différentes synthèses hydrothermales réalisées au cours de ces travaux de thèse (Chapitre 3.).

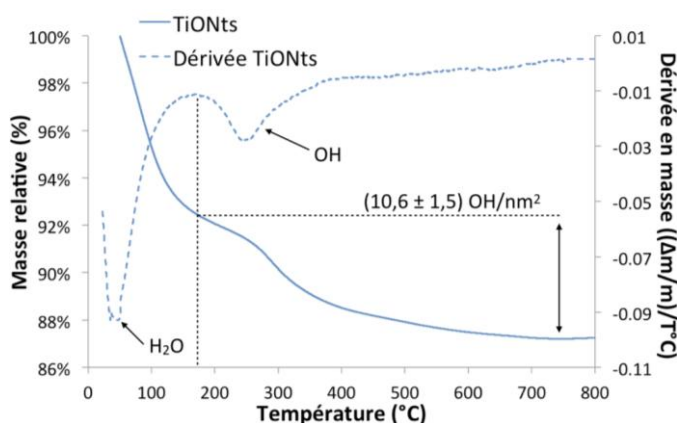


Figure 47 : Courbes ATG et de sa dérivée en masse (DTG) des TiONts nus sous air ($25 mL \cdot min^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ C \cdot min^{-1}$.

1.2.3. Stabilité colloïdale en suspension des nanotubes de titanate

La notion de stabilité colloïdale pour le nanovecteur dans les conditions biologiques est un paramètre très important en vue des tests *in vitro* et des injections *in vivo*. En effet, la suspension de nanohybride ne doit pas s'agglomérer dans ce milieu afin d'être éliminée *in fine* et de ne pas bloquer le flux sanguin lors de l'acheminement du vecteur jusqu'aux sites ciblés.

Dans un premier temps, une analyse du potentiel zêta est réalisée afin de mesurer les charges de surface des TiONts en fonction du pH (Figure 48). Les charges de surface induisent un effet électrostatique permettant de stabiliser les TiONts pour un pH et un milieu fixé. Toutes les zétamétries effectuées dans ce manuscrit ont été réalisées dans une solution de NaCl ($10^{-2} M$) pour avoir la même force ionique durant l'analyse. Un titrateur a permis de faire varier le pH de 2 à 11 par ajout de soude

(NaOH à 0,1 M et 0,01 M) et d'acide chlorhydrique (HCl à 0,1 M). Les résultats montrent que les TiONts ont un point isoélectrique (PIE) se situant entre un pH de 3 et 3,5 selon le taux d'hydroxyles sur leur surface lors des différentes synthèses. Ici, le PIE mesuré est de 3,3 à partir duquel le potentiel zêta devient positif pour des pH faibles ($\text{pH} < \text{PIE}$) et négatif pour des pH plus élevés. De plus, au pH physiologique (pH 7,4), le potentiel zêta des TiONts est largement négatif avec une valeur de -28 mV, ce qui leur confère une répulsion électrostatique et devrait leur permettre d'avoir une dispersion relativement bonne. Cependant, malgré un potentiel relativement élevé, le régime électrostatique n'est pas suffisant pour stabiliser correctement les nanotubes. Par ailleurs, les TiONts sont très agglomérés sur les images MET (Figure 43c).

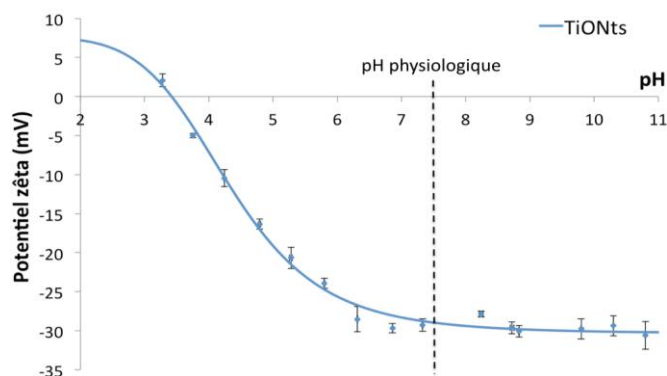


Figure 48 : Zétamétrie des TiONts nus dans du NaCl à 10^{-2} M. La ligne pointillée représente le pH physiologique.

La stabilité colloïdale des TiONts n'a pu être évaluée par DLS. En effet, le diamètre hydrodynamique qui est la grandeur donnée par cette technique correspond au diamètre d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la nanoparticule considérée (selon la relation de Stokes-Einstein). De fait, pour les particules anisotropes comme les nanotubes de titanate, ce modèle n'est pas adapté puisqu'on ne pourrait estimer qu'une seule de deux dimensions. La DLS (diffusion dynamique de la lumière) n'a par conséquent pas été utilisée pour caractériser les TiONts. Par conséquent, une technique originale est utilisée pour évaluer la stabilité colloïdale des nanotubes dans le temps, la turbidimétrie par spectroscopie UV-visible. Cette méthode est surtout une analyse qualitative permettant de comparer la stabilité des suspensions après chaque greffage en normalisant l'absorbance pour une longueur d'onde choisie arbitrairement (Il n'y a pas d'absorption caractéristique pour les TiONts sur la gamme 200 – 800 nm), et en s'affranchissant de la concentration de la suspension analysée en plus de l'influence du milieu de mesure. L'absorbance est mesurée pour une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm dans le tampon phosphate salin (PBS ; 0,1 M ; pH 7,4) toutes les 5 min pendant 150 min (Figure 49) (ce temps est suffisant pour évaluer la stabilité colloïdale de nos suspensions de TiONts en vue des injections *in vivo*). En effet, si les TiONts se déstabilisent dans ce milieu et s'agglomèrent alors l'absorbance décroît dans le temps. Ils ont alors tendance à décanter au fond de la cuve UV et le signal mesuré (absorbance) diminue. L'analyse UV montre que les TiONts nus ne sont pas stables dans les conditions physiologiques puisque leur absorbance diminue rapidement d'où la nécessité de modifier leur surface pour améliorer leur stabilité colloïdale *in vivo*. De plus, les TiONts ont tendance à être plus stables dans l'eau que dans le PBS au bout d'une heure comme le montre la Figure 50 qui représente des photographies des suspensions de TiONts nus. Le potentiel de surface dû aux hydroxyles favorise leur stabilité dans l'eau alors que les sels contenus dans le PBS (NaCl, KCl, Na_2HPO_4 et KH_2PO_4) augmentent la force ionique et déstabilisent les TiONts (voir Chapitre 1. III.).

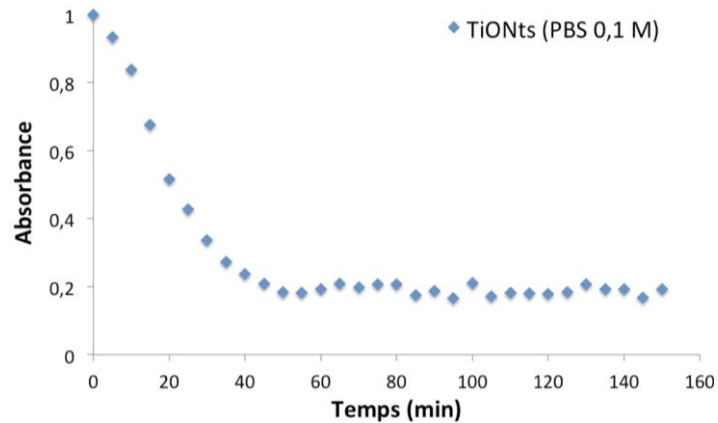


Figure 49 : Courbe d'absorbance des TiONts nus en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

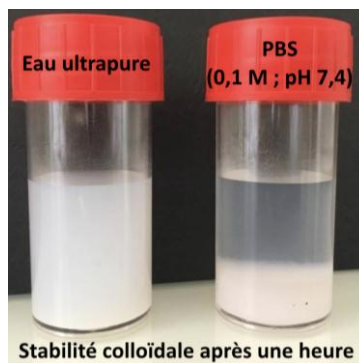


Figure 50 : Photographie des suspensions de TiONts nus dans de l'eau ultrapure (gauche) et dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (droite) après une heure.

I.3. Conclusions

Les caractérisations des TiONts ont permis de mettre en évidence leur élaboration réussie par voie hydrothermale avec des dimensions contrôlées et intéressantes pour des applications biomédicales. Cependant, il a été montré que les TiONts n'étaient pas stables dans les conditions physiologiques malgré un potentiel zêta relativement élevé sans doute en raison de leurs dimensions (et donc masse) assez conséquents ($L = 170 \pm 50$ nm ; $\varnothing = 10 \pm 1$ nm). Il est alors nécessaire de modifier leur surface par différents agents stabilisants pour améliorer leur stabilité colloïdale et leur biocompatibilité. Enfin, les TiONts possèdent des groupements hydroxyles à leur surface les rendant réactifs afin d'avoir d'autres fonctionnalités à l'aide de molécules greffées [250].

II. Pré-fonctionnalisation de la surface des nanotubes de titanate par des agents de couplage en vue de les stabiliser en milieu physiologique

En vue des applications biologiques visées, la stabilisation des nanoparticules ne peut être améliorée qu'en modifiant la surface des TiONts avec des ligands qui se greffent de façon covalente ou restent en interaction avec la surface des nanotubes.

II.1. Modifications de surface par un agent de couplage électrostatique (alcoxysilane) aminé et par un agent stérique polymérique

Lors de cette étude, les ligands utilisés sont, dans un premier temps, des silanes car les fonctions hydroxyles présentent une forte réactivité avec eux [88, 132]. Les silanes les plus utilisés sont des alcoxysilanes (ou des agents siloxaniques) avec une fonction hydrolysable et une fonction d'intérêt pour la suite des travaux. Ce type d'agent stabilisant est surtout utilisé pour avoir une répulsion de type électrostatique autour des nanoparticules (Chapitre 1. III.1.). La stabilisation des nanoparticules peut aussi se faire de façon stérique à l'aide de polymères (ici, le poly(éthylène) glycol HS-PEG₃₀₀₀-COOH, M = 3073 g.mol⁻¹, nommé PEG₃₀₀₀) qui créent un encombrement important autour des nanoparticules. Ces agents servent aussi à améliorer la biocompatibilité des novecteurs (Chapitre 1. III.2.). De plus, la stratégie de base de cette étude repose sur l'utilisation d'un espaceur suffisamment long entre les TiONts et l'agent thérapeutique, ici le DTX, pour favoriser les interactions du TiONts-DTX avec les tubulines présentes dans les microtubules¹⁴. Par conséquent, le PEG₃₀₀₀ a été choisi pour cette hypothèse.

II.1.1. Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) : un agent stabilisant électrostatique

L'alcoxysilane utilisé est le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) pour lequel la fonction silane réagit avec les hydroxyles de surface des TiONts et la fonction amine permet notamment d'avoir une répulsion de type électrostatique à la surface des TiONts.

II.1.1.1. Généralités et réactions mises en jeu lors du couplage de l'alcoxysilane avec la surface des TiONts : hydrolyse et condensation

L'APTES de formule (CH₃CH₂O)₃-Si-(CH₂)₃-NH₂ (M = 221 g.mol⁻¹) (Figure 51) est couramment utilisé pour obtenir des surfaces biocompatibles. Cette molécule a déjà été utilisée pour promouvoir l'adhésion des protéines et la croissance cellulaire sur des implants biologiques [251] ainsi pour que des applications de biocapteurs ou d'extraction d'ADN [252].

¹⁴ Les microtubules sont essentiels pour la division cellulaire. Par conséquent, le DTX va bloquer la division normale des cellules en inhibant la fonction des microtubules lorsque le DTX vient se greffer sur les tubulines présentes dans les microtubules.

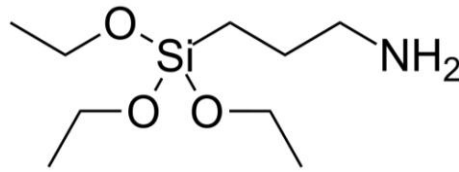


Figure 51 : Schéma de la molécule APTES.

Plusieurs étapes sont nécessaires lors du greffage de l'APTES sur les TiONts. Tout d'abord, une réaction d'hydrolyse de l'APTES en solution aqueuse va permettre de former un silanol avec le départ de trois molécules d'éthanol (Figure 52a). Ensuite, une oligomérisation des silanols (condensation intermoléculaire) conduit à la formation d'oligosiloxanols avec des tailles de chaînes différentes (Figure 52b). Puis, des liaisons hydrogènes apparaissent entre les oligosiloxanols et les hydroxyles se trouvant à la surface des TiONts (Figure 52c). Enfin, la dernière étape est la condensation des oligosiloxanols sur les TiONts avec la formation de liaisons covalentes (Figure 52d).

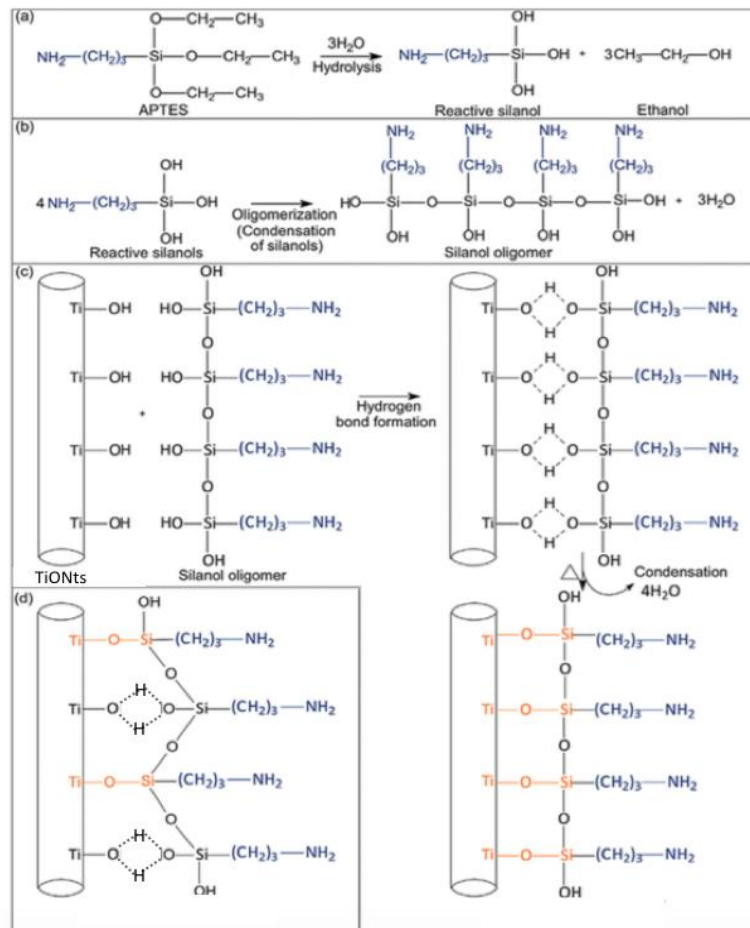


Figure 52 : Mécanisme de fonctionnalisation des TiONts par l'APTES : (a) hydrolyse de l'APTES ; (b) oligomérisation des silanols ; (c) apparition de ponts hydrogène puis formation de liaisons covalentes par condensation entre les oligosiloxanols et la surface des TiONts ; (d) possible condensation incomplète des silanols sur la surface des TiONts. D'après [132].

Il est important de contrôler les différentes étapes de la silanisation afin d'obtenir une monocouche d'APTES et de pouvoir optimiser le nombre de fonctions amines en surface des TiONts pour la suite des greffages. En effet, il est possible de créer des multicouches d'APTES lors de la condensation (Figure 53) et d'affecter la structure finale de la couche d'aminosilane à la surface du

substrat inorganique. Ceci est notamment dû à plusieurs paramètres comme la teneur en eau, la température de réaction, la concentration et la nature du silane [253]. Parmi ceux-ci, la température et la proportion du solvant (eau : éthanol) sont les principaux paramètres qui vont jouer sur la structure et sur le taux de greffage de l'APTES. En effet, une augmentation de la température favorise la condensation du polysiloxane sur la surface des TiONts ainsi que la vitesse de réaction alors que la proportion du solvant peut jouer sur les réactions compétitives entre l'hydrolyse et l'oligomérisation [254].

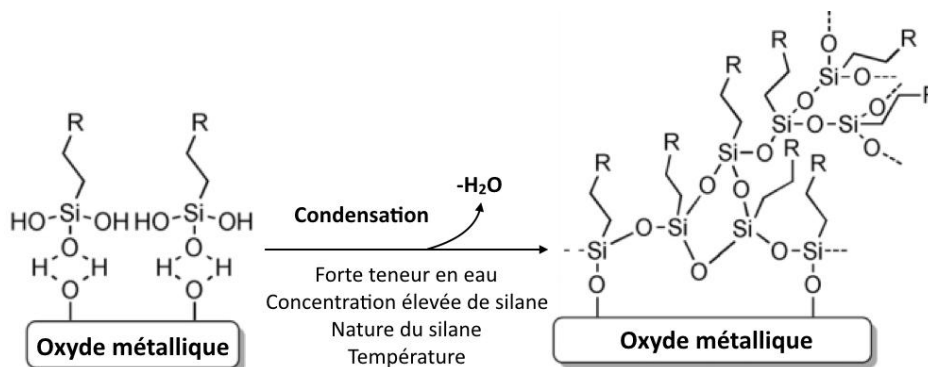


Figure 53 : Schéma de la création de multicouches d'APTES sur le substrat inorganique lors de la condensation. D'après [88].

II.1.1.2. Protocole expérimental du greffage de l'APTES sur les TiONts

Le premier protocole présenté décrit la modification de surface des TiONts par l'APTES (TiONts-APTES) en vue des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des cellules cancéreuses de prostate. Cette modification est décrite dans les travaux publiés en 2017 dans le journal *Advanced Healthcare Materials* intitulés « Taxane-Grafted Metal-Oxide Nanoparticles as a New Theranostic Tool against Cancer: The Promising Example of Docetaxel-Functionalized Titanate Nanotubes on Prostate Tumors » (Annexe 1) Par la suite, le protocole de l'APTES sera amélioré afin d'avoir principalement une monocouche d'aminosilane et une meilleure stabilité colloïdale (Chapitre 3. I.2.1.).

Le couplage de l'APTES (en très large excès par rapport au nombre d'hydroxyles à la surface des nanotubes ; 10 APTES : 1 OH) avec les TiONts s'effectue dans un mélange eau/éthanol (50 : 50 en volume) car l'oligomérisation est mieux contrôlée en présence d'éthanol par rapport à l'eau comme unique solvant (Figure 54) [132]. Ensuite, la suspension subit un traitement au bain à ultrasons pour avoir une bonne homogénéisation car il se peut qu'il y ait formation d'agglomérats (le pH de la suspension est alors de 9 - 10). Après cela, l'APTES est ajouté goutte à goutte à la suspension sous agitation magnétique (400 tr/min) à 25°C. Après 24 h de réaction, l'eau et l'éthanol sont éliminés de la suspension à l'aide d'un évaporateur rotatif (250 mbar ; 80°C). Cette étape permet de favoriser la condensation de la couche de polysiloxane à la surface des TiONts. Après avoir éliminé le solvant, les TiONts-APTES sont redispersés dans de l'eau ultrapure pour pouvoir les purifier par ultrafiltration avec un seuil de coupure de 100 kDa afin d'éliminer l'APTES en excès. Enfin, une partie de la suspension est lyophilisée pour réaliser les caractérisations sous forme solide.

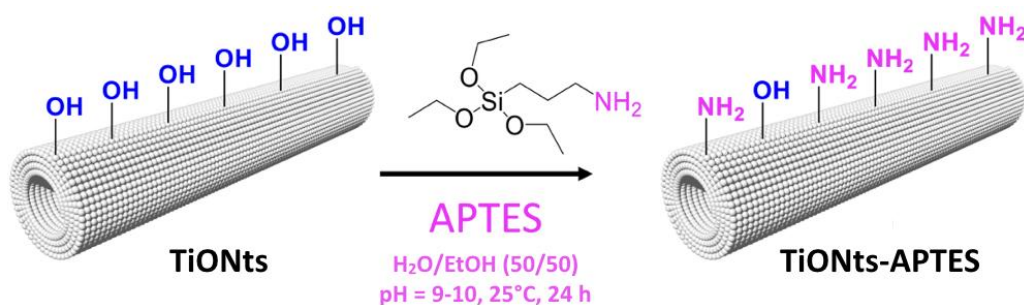


Figure 54 : Illustration du greffage de l'APTES sur les TiONts dans les conditions de la publication intitulée « Taxane-Grafted Metal-Oxide Nanoparticles as a New Theranostic Tool against Cancer: The Promising Example of Docetaxel-Functionalized Titanate Nanotubes on Prostate Tumors » (Annexe 1).

II.1.2. Protocole expérimental du greffage du poly(éthylène) glycol : un agent stabilisant stérique

Dans cette étude, le polymère utilisé est un dérivé du poly(éthylène) glycol (HS-PEG₃₀₀₀-COOH ; M = 3073 g.mol⁻¹, noté PEG₃₀₀₀). En effet, celui-ci a déjà montré son efficacité dans la stabilisation des nanoparticules (Chapitre 1. I.3.4. et III.2.) [89] avec deux parties réactives de part et d'autre du polymère. Le polymère hétérobifonctionnel choisi est greffé *via* sa fonction carboxyle qui réagit avec la fonction amine de l'APTES par un couplage peptidique en milieu aqueux (en présence d'EDC/NHS). Tandis que la fonction thiol va permettre d'envisager un futur greffage, ici celui d'un agent thérapeutique.

Outre la stabilisation, l'utilisation de ce polymère permet d'améliorer la biocompatibilité des nanotubes *in vivo*, c'est-à-dire que le polymère a aussi pour objectif de rendre furtifs les nanotubes et éviter leur captation par des organes tels que le foie afin que les nanotubes de titanate fonctionnalisés agissent préférentiellement au niveau des cellules cancéreuses.

II.1.2.1. Généralités sur l'activation de la fonction carboxyle en vue d'un couplage peptidique en milieu aqueux : utilisation du couple EDC/NHS

Le couplage peptidique est une réaction bien connue pour former des liaisons amides entre une fonction carboxyle et une fonction amine. Cependant, afin d'améliorer le rendement de réaction, il est nécessaire d'utiliser des agents de couplage pour activer les fonctions carboxyles qui deviennent alors plus réactives avec les amines. L'association du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) et du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est largement utilisée pour activer la fonction carboxyle afin de réagir avec des amines primaires. D'un côté, l'EDC est l'un des carbodiimides les plus couramment utilisés et qui agit comme un catalyseur pour ce type de réaction. Sa popularité provient notamment de sa grande solubilité dans l'eau. De l'autre côté, le NHS est utilisé pour augmenter la stabilité des produits intermédiaires dans l'eau lors de la réaction de couplage [255]. Cette stratégie de couplage permet d'avoir : un meilleur rendement avec un milieu de réaction dit « vert » (milieu aqueux), une excellente biocompatibilité avec une petite influence sur la bioactivité des molécules cibles, des réactifs beaucoup moins toxiques que d'autres agents de couplage peptidique et une facilité d'élimination des sous-produits [255]. En raison de ces avantages, l'EDC/NHS est surtout utilisé pour le marquage biomoléculaire et pour l'immobilisation de protéines, de peptides et d'ADN sur divers substrats de polymères, de métaux nobles, de silicium, de nanoparticules et de nanotubes [255, 256]. Ils

sont donc très intéressants pour des systèmes comportant des nanoparticules afin de réaliser le couplage peptidique dans un milieu aqueux et garder une bonne stabilité colloïdale (comme le cas des TiONts).

Dans un premier temps, l'EDC va réagir avec la fonction carboxyle pour former un produit intermédiaire avec un ester activé qui sera instable dans l'eau (l'ester réactif *O*-acylisourée) (Figure 55). Ensuite, cette dernière réagit rapidement avec la fonction amine pour former une liaison amide. Quant à l'utilisation du NHS, il sert à stabiliser le produit intermédiaire pour améliorer le rendement. Cependant, il peut s'hydrolyser rapidement (au bout de quelques minutes à quelques heures) selon la teneur en eau et le pH de la réaction (plus le pH est élevé, plus l'hydrolyse est rapide). En effet, le temps de demi-vie du NHS dans l'eau est de 4 à 5 heures à pH 7 et seulement de 1 heure à pH 8 [257]. Pour cela, la réaction d'activation de la fonction carboxyle avec l'EDC/NHS est plus efficace à pH 5 dans du tampon MES (0,1 M). Puis la réaction entre la molécule activée par le NHS avec l'amine primaire est favorisée à pH 7 - 8 généralement réalisée dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4).

II.1.2.2. Fonctionnalisation des TiONts-APTES avec le PEG₃₀₀₀ par couplage peptidique EDC/NHS

La fonction carboxyle du PEG₃₀₀₀ est activée pendant 30 min sous agitation magnétique (400 tr/min) dans 50 mL de tampon MES (0,1 M ; pH 5) en présence d'EDC et de NHS largement en excès (1 COOH : 100 EDC : 200 NHS) pour s'affranchir de la possible hydrolyse des agents de couplage peptidique et pour favoriser l'activation. La solution d'activation est ensuite ajoutée lentement dans la suspension de TiONts-APTES redispersée dans du PBS à (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 56). Puis un traitement au bain à ultrasons est réalisé pendant 5 min pour optimiser la dispersion des nanotubes fonctionnalisés. Le rapport molaire engagé est de 3 moles de NH₂ à la surface des TiONts pour 1 mole de PEG₃₀₀₀. La réaction est maintenue à température ambiante sous agitation magnétique (400 tr/min) pendant 24 h. Enfin, le produit (TiONts-PEG₃₀₀₀) est lavé et purifié par ultrafiltration (100 kDa). Comme pour l'APTES, seule une partie de la suspension est séchée par lyophilisation afin de la caractériser.

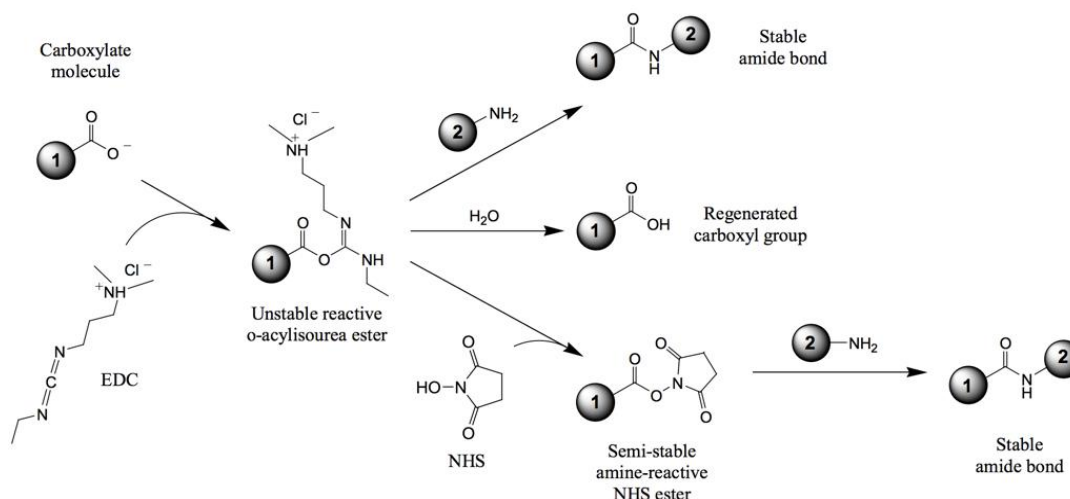


Figure 55 : Mécanisme de formation d'une liaison amide entre un carboxylate et une amine primaire par EDC/NHS. Copyright, Thermo Fisher Scientific.

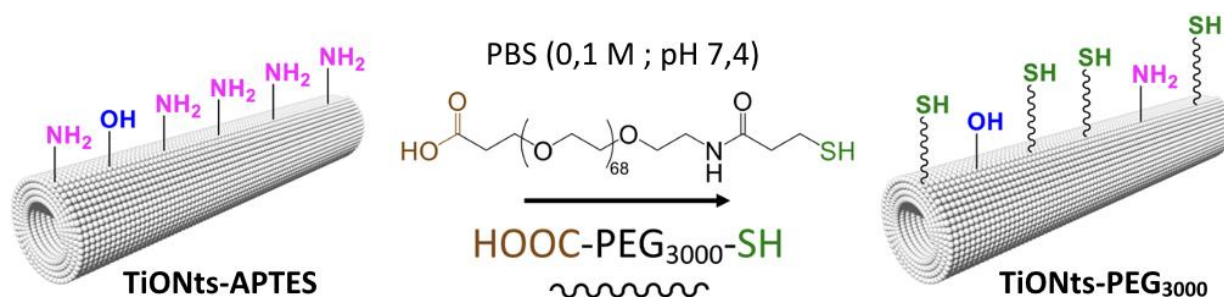


Figure 56 : Illustration du greffage des PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts-APTES.

II.2. Caractérisations des TiONts pré-fonctionnalisés par les agents stabilisants

II.2.1. Confirmation du greffage de l'APTES et du PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts

Des analyses XPS sont réalisées pour évaluer la composition chimique de la surface des TiONts-APTES et des TiONts-PEG₃₀₀₀ et mettre en évidence les greffages (Tableau 7). On retrouve pour ces derniers les mêmes éléments chimiques de base que ceux des TiONts nus. Par ailleurs, des éléments spécifiques tels que l'azote et le silicium sont aussi trouvés à la surface des TiONts-APTES, ainsi qu'une faible augmentation de la teneur en carbone prouvant la présence de l'aminosilane. Puis, concernant les TiONts-PEG₃₀₀₀, l'analyse quantitative révèle la présence du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-APTES avec une forte augmentation du taux de carbone et l'apparition de soufre malgré sa très faible concentration atomique. Une diminution notable est aussi observée pour certains éléments chimiques comme Ti_{2p}, O_{1s} et Na_{KLL}. Ce phénomène provient de la profondeur d'analyse XPS (environ 5 nm). En effet, le greffage du PEG₃₀₀₀ cache partiellement les atomes formant le réseau des nanotubes. De plus, la diminution de la teneur en sodium provient des lavages répétés entre les différents greffages. En effet, il est connu que des lavages notamment en milieu acide favorisent les échanges entre les cations Na⁺ et H⁺ tendant à éliminer le sodium de la structure des TiONts [101, 119].

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}	S _{2p}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-	-
TiONts-APTES	13,1	53,4	8,3	19,2	3,0	3,0	-
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,7	2,8	0,4	1,0	0,2	0,2	-
TiONts-PEG ₃₀₀₀	19,2	47,6	7,2	19,2	5,0	1,5	0,3
% atomique (TiONts-PEG ₃₀₀₀) / Ti	1,0	2,5	0,4	1,0	0,3	0,1	0,02

Tableau 7 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG₃₀₀₀.

Par ailleurs, l'XPS met en évidence la formation de liaisons caractéristiques du greffage de l'APTES et du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts (Figure 57). La décomposition du pic O_{1s} montre les mêmes contributions pour les TiONts-APTES que pour les nanotubes nus (Figure 57a(O_{1s})). Le maintien de la

contribution correspondant aux hydroxyles indique qu'ils n'ont pas tous réagi avec l'APTES ou bien encore que la condensation des oligosiloxanols sur la surface des tubes lors de la synthèse est incomplète. Ce qui peut également expliquer que la composante attribuée aux hydroxyles à 532 eV est légèrement plus élevée (12,5% vs 11,6%) pour les TiONts-APTES en comparaison avec les TiONts nus.

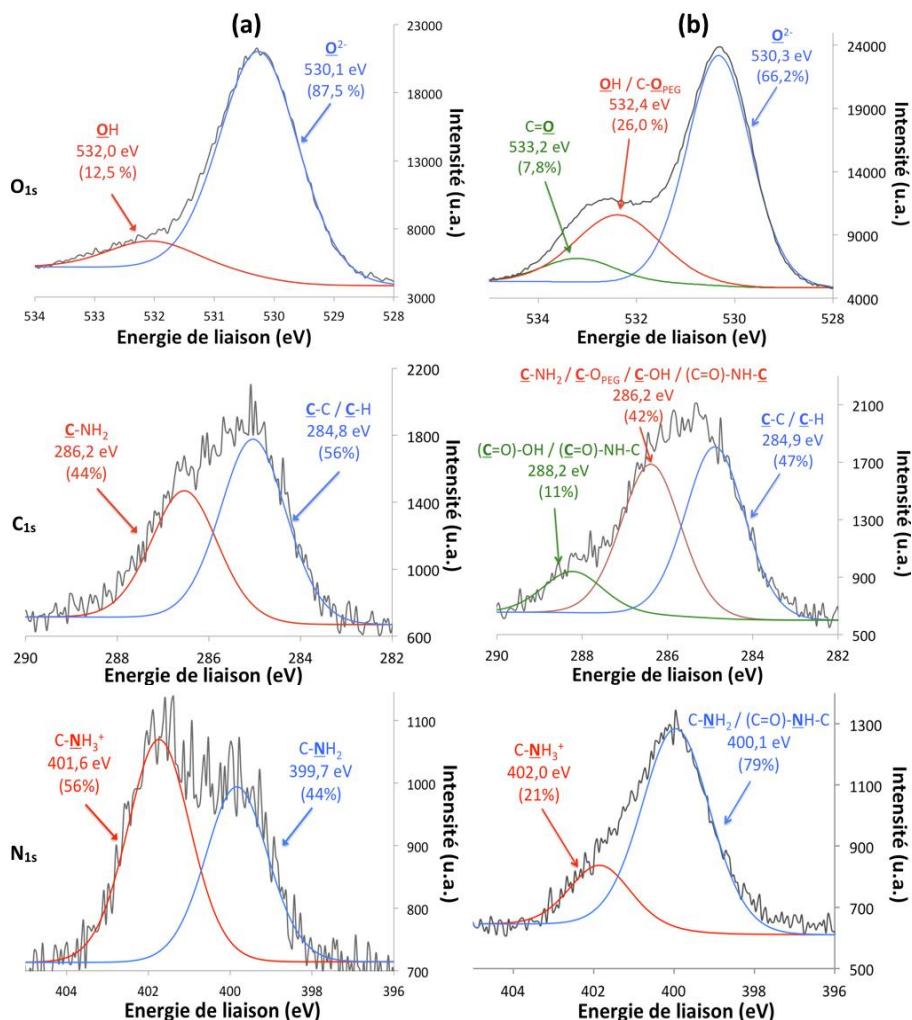


Figure 57 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} sur les (a) TiONts-APTES et (b) TiONts-PEG₃₀₀₀.

Le niveau C_{1s} révèle une nouvelle composante attribuée aux liaisons C-NH₂ de l'APTES à 286,2 eV (44%) et une autre composante correspond aux liaisons C-C/C-H à 284,8 eV (56%) provenant de la pollution et des ligands carbonés à la surface des nanotubes modifiés (Figure 57a(C_{1s})). Cette dernière contribution augmente avec les TiONts-APTES et les TiONts PEG₃₀₀₀ par rapport aux TiONts nus (Figure 57a-b(C_{1s})). De plus, la composante à 289,1 eV, présente sur le seuil C_{1s} des TiONts, a disparu avec le greffage de l'APTES. Enfin, concernant les TiONts-APTES, les précédents résultats sont en accord avec la décomposition du pic N_{1s} puisqu'elle met en évidence les liaisons C-NH₂ et C-NH₃⁺ de l'APTES à 399,7 eV (44%) et 401,6 eV (56%) respectivement (Figure 57a(N_{1s})) [148, 258].

Quant à la décomposition des niveaux O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} des TiONts-PEG₃₀₀₀, elles permettent de mettre en avant le greffage du polymère en surface. Le seuil O_{1s} des TiONts-PEG₃₀₀₀ a permis de montrer l'apparition d'une composante à 533,2 eV (C=O) liée aux liaisons carboxyles et aux liaisons amides (Figure 57b(O_{1s})). Par ailleurs, l'augmentation et le léger décalage de la composante à 532,4 eV par rapport aux TiONts-APTES (passage de 12,5% à 26%) prouve la présence de nouvelles liaisons

caractéristiques du greffage : C-O_{PEG} et C-OH de la fonction carboxyle. Concernant le seuil C_{1s} des TiONts-PEG_{3000} , la composante localisée à 286,2 eV ($\text{C-O}_{\text{PEG}}/(\text{C=O})\text{-NH-C}$) et l'apparition d'une composante à 288,2 eV ($\text{C=O})\text{-NH-C}$) peuvent être attribuées à la formation de liaisons amides secondaires caractérisant le greffage du PEG_{3000} sur les TiONts-APTES et aux liaisons du polymère. Les NH_2 en surface n'ont probablement pas tous réagi avec la fonction carboxyle du polymère lors de la synthèse. En effet, il est possible de retrouver cette contribution à 286,2 eV (Figure 57b(C_{1s})). Ainsi, cette analyse est en accord avec ce qui est observée pour le seuil N_{1s} lors de l'observation des liaisons C-NH_3^+ (402 eV) et C-NH_2 (400,1 eV). Cependant, la position de cette dernière est légèrement décalée en raison de la contribution de la liaison amide $(\text{C=O})\text{-NH-C}$ et la proportion de cette composante a nettement augmenté par rapport au niveau N_{1s} des TiONts-APTES (passage de 44% à 79%) (Figure 57b(N_{1s})) [258].

Les TiONts-APTES et les TiONts-PEG_{3000} sont aussi caractérisés par IR-TF (Figure 58). En plus des bandes spécifiques aux TiONts , des nouvelles bandes de vibrations confirment la présence de liaisons caractéristiques des ligands APTES ($\nu(\text{Si-O-Si}) = 1000 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu(\text{C-C-NH}_2) = 1200 \text{ cm}^{-1}$) [253]. Le greffage des PEG_{3000} sur les TiONts-APTES est, lui aussi, confirmé par IR-TF. Les modes de vibrations vers 1100 cm^{-1} (C-O_{PEG}) et vers 3100 cm^{-1} ($(\text{C=O})\text{-OH}$) sont attribués aux liaisons caractéristiques du polymère attestant leur présence à la surface des TiONts-APTES [18]. Des pics de vibration attestant la formation de liaison amide entre les TiONts-APTES et les TiONts-PEG_{3000} sont observés à 1550 cm^{-1} (NH) ainsi qu'une contribution plus marquée pour la bande située à 3250 cm^{-1} ($(\text{C=O})\text{-NH}$) [124]. De plus, la présence des chaînes carbonées de chaque ligand est prouvée par l'apparition des bandes entre 1450 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} ainsi qu'entre 3000 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} qui sont attribuées aux modes de vibrations des liaisons C-H . Ces vibrations sont légèrement plus marquées lors du greffage avec le PEG_{3000} .

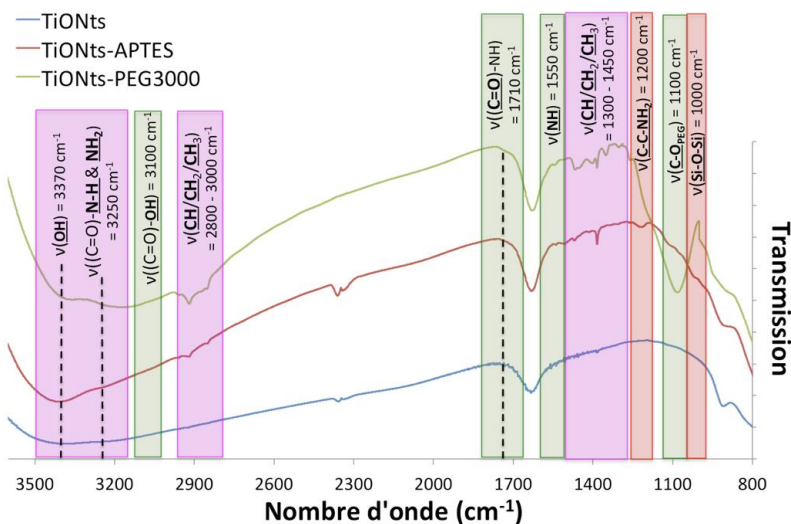


Figure 58 : Spectres infrarouge des TiONts , TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000} .

II.2.2. Estimation du taux de greffage de l'APTES et du PEG_{3000} à la surface des TiONts

Les TiONts-APTES et les TiONts-PEG_{3000} sont ensuite analysés par ATG sous air de 50°C à 800°C afin de déterminer le taux d'APTES et de PEG_{3000} greffés (Figure 59a). La perte de masse est plus conséquente qu'avec les nanotubes nus au fur et à mesure des greffages en raison de la matière

organique ayant été greffée et notamment lors du greffage du PEG₃₀₀₀ en raison des longues chaînes carbonées du polymère. Les résultats ATG confirment donc les résultats XPS et d'IR-TF en prouvant l'efficacité des synthèses des TiONts-APTES et des TiONts-PEG₃₀₀₀. Les taux de greffage, déterminés *via* l'Équation 3, sont de 5,3 NH₂.nm⁻² pour l'APTES et de 0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻² pour le polymère hétérobifonctionnel (Tableau 8). La formule est similaire à ce que la littérature peut proposer [132, 148].

$$N_m = \frac{\left(\frac{\Delta m_2}{m_2} - \frac{\Delta m_1}{m_1}\right) \times N_A}{M(m_2) \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

Avec : N_m : Nombre de molécules m greffées par nm²
 $(\Delta m_2/m_2 - \Delta m_1/m_1)$: Différence des pertes de masse relatives entre deux échantillons dues à la matière organique greffée (Δm et m en g)
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol⁻¹)
 $M(m_2)$: Poids moléculaire de la molécule/partie de la molécule m_2 dégradée (g.mol⁻¹)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts (m².g⁻¹)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un taux par nm²

Équation 3 : Relation pour calculer le taux de recouvrement des molécules greffées à la surface des TiONts.

Il n'est pas impossible que le taux de NH₂ observé pour les TiONts-APTES corresponde à une multicouche d'APTES sur la surface des nanotubes. Ainsi, le faible taux de polymère peut être affecté par la gêne stérique de la multicouche d'APTES ou la faible interaction des couches externes de ces dernières où sont *a priori* greffés les PEG, par l'encombrement des chaînes carbonées du polymère lors de leur greffage et par un faible rendement d'activation des agents de couplage. Les températures de début de dégradation des molécules greffées sont déterminées à partir des courbes dérivées (DTG) qui indiquent la décomposition d'une nouvelle molécule après que l'eau physisorbée a été éliminée (Figure 59b). Par ailleurs, la mesure de la S_{BET} des TiONts-APTES a donné une valeur de (147 ± 2) m².g⁻¹. Pour la suite de ce chapitre, il est considéré que la valeur de la surface spécifique déterminée pour les TiONts-APTES ne varie pas après les différents greffages. C'est donc cette valeur de S_{BET} qui sera utilisée pour les calculs des taux de greffage.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	175	2,8	18	10,6 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	160	10,3	58	5,3 (±0,5) NH ₂	7	29 000
TiONts-PEG ₃₀₀₀	165	15,0	3073	0,060 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	6	330

Tableau 8 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et des TiONts-PEG₃₀₀₀ par ATG.

(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes (Annexe 3).

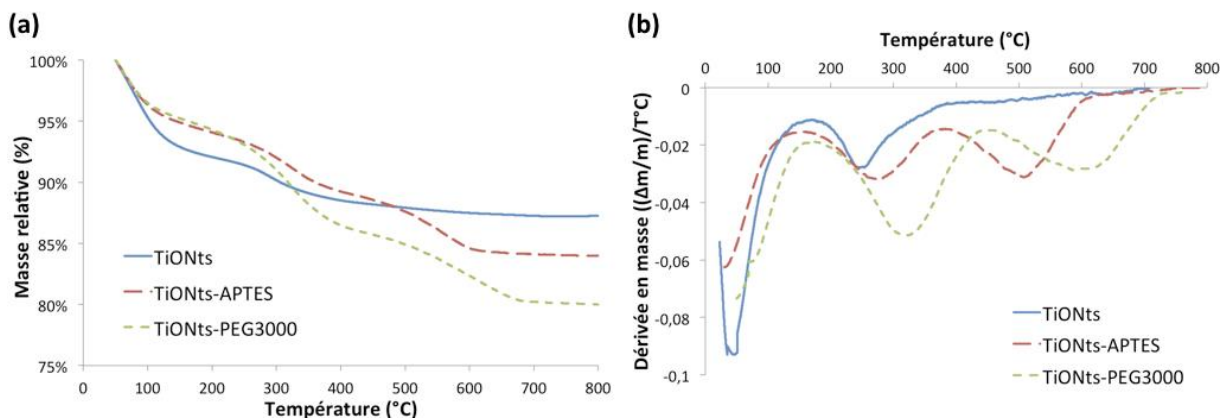


Figure 59 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG₃₀₀₀ sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

Remarque : Pour le calcul du taux de greffage de l'APTES sur les TiONts, l'Équation 3 prend en compte le fait que les hydroxyles n'ont pas tous réagi avec l'APTES ou bien encore que la condensation des oligosiloxanols sur la surface des tubes est incomplète. Dans le cas où tous les hydroxyles auraient réagi avec l'APTES, une couche de silice uniforme se formerait. Ainsi, seulement la partie aminopropyle de l'APTES se dégraderait et donnerait un taux de greffage de 7,3 APTES.nm⁻² au lieu de 5,3 (Équation 4 et Annexe 4). Ainsi, il est préférable de calculer le taux d'APTES sur les TiONts-APTES *via* l'Équation 3 car l'IR et l'XPS ont mis en évidence la contribution des hydroxyles liés aux TiONts nus ou à la condensation incomplète des silanols (Figure 60).

$$N_{APTES} = \frac{\frac{\Delta m_{APTES}}{m} \times N_A}{M_{(APTES)} \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

Avec : N_{APTES} : Nombre de molécules APTES greffées par nm²
 Δm_{APTES} : Perte de masse relative à la dégradation de l'APTES dans le cas d'une condensation complète (g)
 m : Masse initiale de l'échantillon (g)
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol⁻¹)
 $M_{(APTES)}$: Poids moléculaire d'une partie de l'APTES dégradée (58 g.mol⁻¹)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts (m².g⁻¹)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un taux par nm²

Équation 4 : Relation pour calculer le taux de recouvrement de l'APTES greffé à la surface des TiONts dans le cas où tous les hydroxyles ont réagi avec l'APTES pour former une couche de silice uniforme.

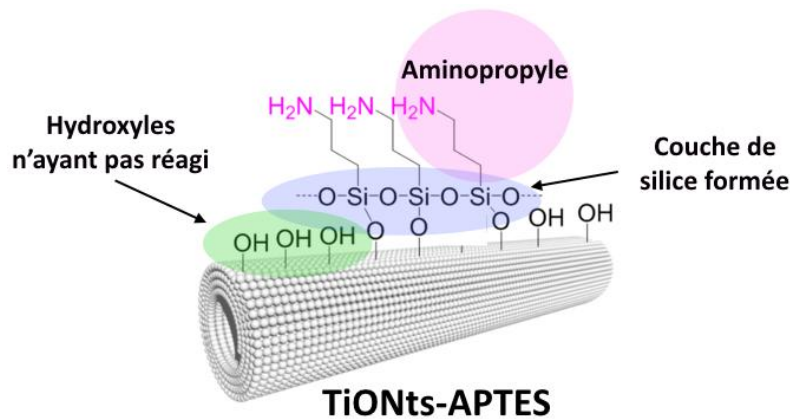


Figure 60 : Schéma illustrant les TiONts-APTES dans le cas où l'APTES forme une couche de silice avec une partie des hydroxyles de surface des nanotubes alors que l'autre partie des hydroxyles n'a pas réagi avec l'APTES.

II.2.3. Influence du greffage sur la stabilité colloïdale

La fonctionnalisation de l'APTES sur la surface des TiONts a permis de décaler le PIE vers une valeur de pH plus élevée ($PIE_{TiONts-APTES} = 8,5$) par rapport à celui des TiONts nus ($PIE_{TiONts} = 3,3$) (Figure 61). Le potentiel zêta est positif au pH physiologique (pH 7,4) avec une valeur de +10 mV en raison de la présence de fonctions amines alors que le potentiel était négatif pour les nanotubes nus en raison des hydroxyles en surface des TiONts. Ces résultats sont en accord avec l'XPS montrant une prédominance de la liaison C-NH₃⁺. Cette valeur montre aussi que la modification de surface par l'APTES ne permet pas d'améliorer suffisamment la stabilité par régime électrostatique dans les conditions physiologiques mais elle sert à préparer la surface avec une fonction réactive afin de greffer le PEG₃₀₀₀. De plus, au pH 7,4, le potentiel positif favorise la production de radicaux libres endommageant les cellules et cet effet n'est donc pas recherché.

La présence de PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts modifiés par l'APTES est prouvée par zétamétrie avec l'observation d'un léger écrantage de charges⁸. Le PIE est décalé vers des pH plus faible ($PIE_{TiONts-PEG3000} = 5,7$) car le couplage des TiONts-APTES avec le polymère hétérobifonctionnel a consommé une partie des amines. Par conséquent, le potentiel zêta est de nouveau négatif avec un potentiel de -10 mV au pH physiologique.

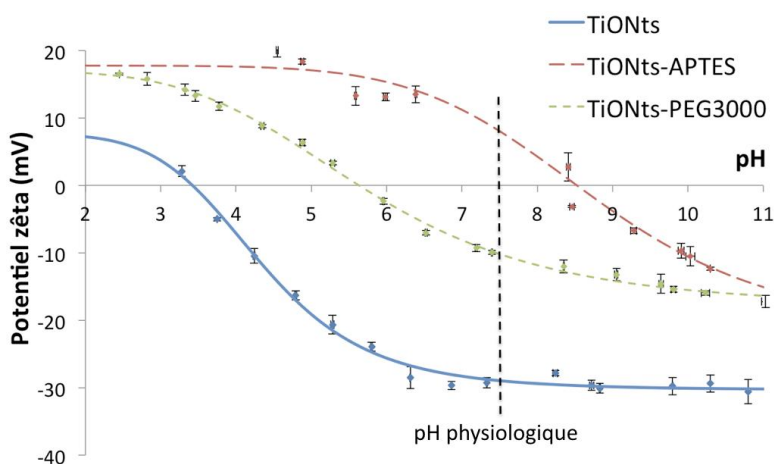


Figure 61 : Évolution des potentiels zêta des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG₃₀₀₀ en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M). La ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique.

La stabilité colloïdale des TiONts-APTES et des TiONts-PEG₃₀₀₀ est observée en suivant leur absorbance en fonction du temps pendant 150 min à $\lambda = 600$ nm dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 62). Les TiONts-APTES montrent une mauvaise stabilité dans ces conditions puisque les agents électrostatiques sont peu efficaces dans des milieux très ionisés tandis que les TiONts-PEG₃₀₀₀ montrent une bien meilleure stabilité.

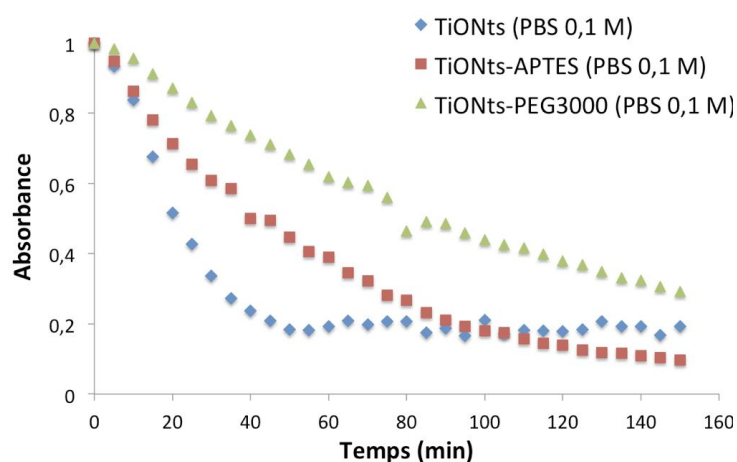


Figure 62 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG₃₀₀₀ afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

En accord avec les résultats du potentiel zêta et de l'absorbance en fonction du temps, la Figure 63 atteste que les TiONts-APTES ne sont pas stables dans les conditions physiologiques (PBS 0,1 M ; pH 7,4) après 1 heure contrairement aux TiONts-PEG₃₀₀₀ qui sont encore stables après 24 heures.

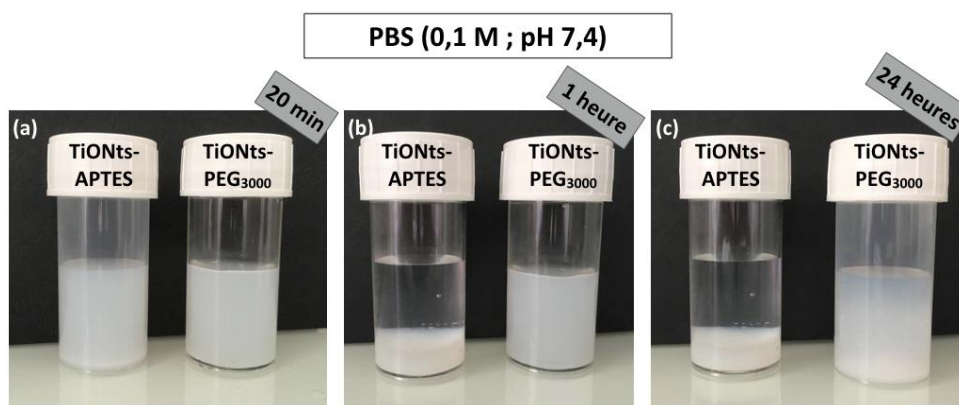


Figure 63 : Photographies des TiONts-APTES et des TiONts-PEG₃₀₀₀ dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à (a) 20 minutes, (b) une heure et (c) 24 heures.

Cependant, la fonctionnalisation avec l'APTES semble améliorer l'individualisation des tubes en comparaison des TiONts nus d'après les images MET (Figure 64). Cet effet est conservé pour les TiONts-PEG₃₀₀₀.

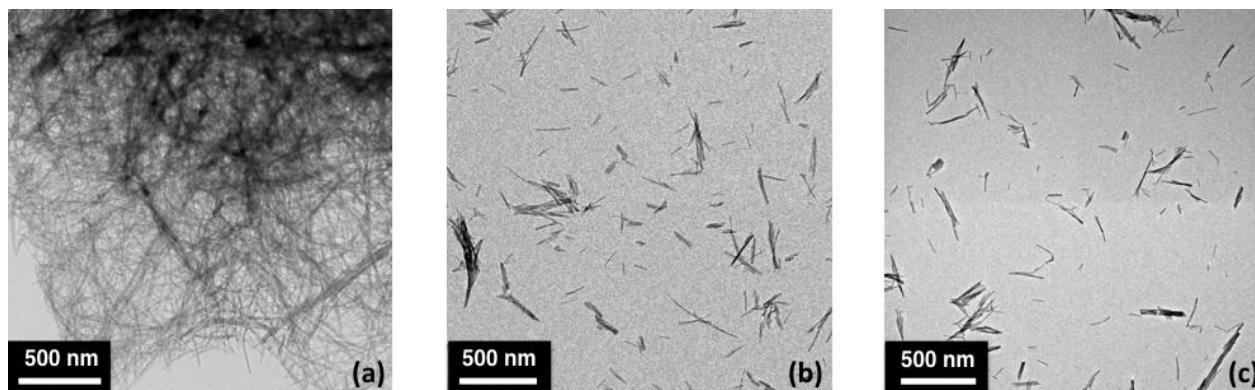


Figure 64 : Clichés MET des (a) TiONts, (b) TiONts-APTES et (c) TiONts-PEG₃₀₀₀.

II.2.4. Conclusions

Les greffages de l'agent électrostatique (APTES) et de l'agent stérique (PEG₃₀₀₀) ont bien été confirmés et prouvés par différentes techniques de caractérisations comme l'XPS, l'IR-TF, l'ATG ou encore la zétamétrie. L'objectif premier de cette étape de pré-fonctionnalisation, qui était d'améliorer la stabilité colloïdale des suspensions dans les conditions physiologiques, est une réussite même s'il est encore possible de faire mieux. Cette stratégie a aussi permis de préparer la surface afin qu'elle puisse accueillir un agent thérapeutique (pour l'administration ciblée du médicament) et un agent chélatant (pour le suivi des nanotubes *in vivo* par imagerie nucléaire).

Ces nanohybrides doivent maintenant être validés biologiquement pour prouver que les TiONts, avec ces types de fonctionnalisations, ne sont pas toxiques pour l'organisme *via* des tests de cytotoxicité et de génotoxicité. Faute de temps et de matière, seuls les TiONts-APTES sont étudiés biologiquement et sont présentés dans la partie qui suit.

II.3. Tests biologiques *in vitro* des TiONts-APTES sur deux lignées cellulaires (BV2 et HepG2) et *via* différents tests

Il est difficile d'évaluer les risques liés aux expositions à des nanomatériaux en raison du manque de données toxicologiques. Il est donc urgent de développer des stratégies de tests plus efficaces, rapides et précises pour évaluer les effets sur la santé de ces matériaux émergents. Dans cette perspective, des tests biologiques sensibles sont réalisés pour déterminer l'activité biologique des TiONts-APTES.

II.3.1. Tests biologiques *in vitro* des TiONts-APTES sur des cellules gliales de souris (BV2)

Le cerveau est un organe fortement protégé en raison de ses fonctions d'importance cruciale. Pour les mêmes raisons, les interventions biomédicales dans le cerveau sont des opérations très délicates et difficiles à réaliser. Les nanoparticules peuvent alors être utilisées pour avoir accès à ces sites protégés [259]. Cependant, les nanoparticules induisent l'activation des cellules microgliales et constituent l'un des problèmes majeurs dans les applications neurobiologiques des nanoparticules. Les cellules microgliales sont une population de cellules gliales immunes (ici, les cellules BV2 proviennent du rat) constituées de macrophages. Elles sont localisées dans le cerveau (elles représentent environ 10% à 15% des cellules totales du cerveau) et dans la moelle épinière, formant la principale défense immunitaire active du système nerveux central. L'activation des cellules microgliales peut produire du stress oxydatif dans le cerveau [260] et peut causer certaines complications. Les cellules BV2 sont choisies parce qu'elles ont des caractéristiques phénotypiques similaires aux cellules microgliales normales de l'homme. Les TiONts-APTES développés dans le laboratoire lors de ces travaux de thèse sont évalués par différents essais *in vitro* sur des cellules microgliales et les tests ont été réalisés par S. Sruthi lors de son séjour doctoral en 2016 (bourse Raman Charpak), sur la plateforme NanoCare (laboratoire partenaire BioPeroxil). Ces travaux seront publiés prochainement [261] mais n'ont pas été inclus à la thèse de S. Sruthi, thèse qui sera soutenue en décembre 2017.

Dans un premier temps, l'internalisation des TiONts-APTES dans les cellules microgliales est analysée par cytométrie en flux selon la méthode de Suzuki [262]. L'internalisation des nanoparticules par les cellules conduit à une augmentation de la granularité correspondant à une diffusion aux grands angles du faisceau (side scatter, SSC en anglais). Cette granularité traduit la densité des organelles elles-mêmes liées à l'internalisation des nanoparticules. Alors que la taille relative des cellules, déterminée par la diffusion aux petits angles du faisceau (forward scatter, FSC en anglais), est restée la même. Ensuite, l'intégrité des membranes cellulaires BV2 est étudiée grâce à un agent intercalant fluorescent, l'iodure de propidium (IP). Le principe repose sur le fait que les cellules vivantes qui gardent leur membrane intacte sont imperméables à l'IP, tandis que les cellules mortes perdent leur intégrité membranaire et se colorent positivement. Enfin, à l'aide de ce même agent fluorescent (l'IP), les possibles modifications du cycle cellulaire ont pu être évaluées. Il est à noter que le 7-ketocholestérol est utilisé comme témoin positif pour traiter les cellules, et les cellules seules dans leur milieu de culture comme témoin négatif (contrôle).

Les résultats ont montré que l'internalisation des TiONts-APTES est favorisée dans les cellules BV2 d'après les signaux fluorescents en fonction du SSC lorsque la concentration en TiONts-APTES est

augmentée (Figure 65). Seules 12,5% des cellules absorbent le témoin positif (par rapport à la référence du groupe contrôle) alors que 35% des cellules ont internalisé les TiONts-APTES pour une concentration de $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ceci peut s'expliquer par le fait que le témoin positif est toxique pour les cellules (il induit l'apoptose des cellules) contrairement aux TiONts-APTES qui peuvent être internalisés par les cellules en raison de leur forme (voir Chapitre 1. II.1.4.2.1.). De plus, aucun changement significatif n'est observé sur la diffusion aux petits angles (FSC), ce qui montre que la taille relative des cellules n'a pas changé après leur incubation avec des TiONts-APTES à différentes concentrations ou avec le témoin positif.

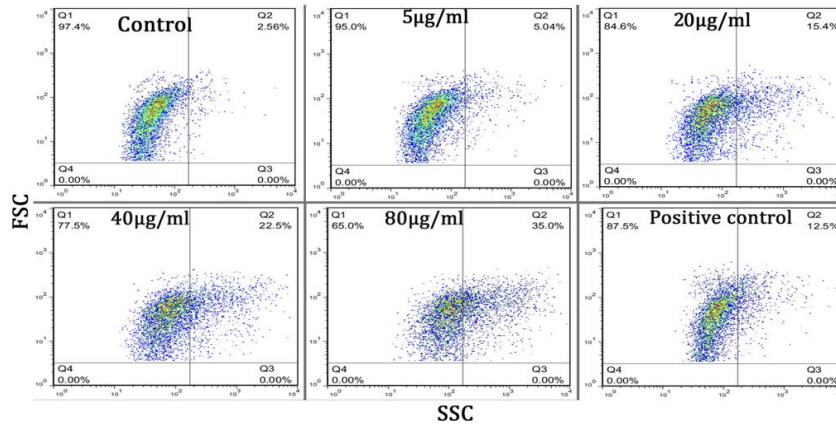


Figure 65 : Étude de l'internalisation des TiONts-APTES à différentes concentrations ($5, 20, 40$ et $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et du témoin positif (7-ketocholestérol) par les cellules BV2. L'augmentation de la diffusion latérale (SSC) en fonction de la diffusion aux petits angles (FSC) et par rapport au témoin contrôle (sérum physiologique) est mesurée par cytométrie en flux.

En complément des résultats précédents, les membranes cellulaires sont étudiées après l'incubation des cellules avec les TiONts-APTES ou avec le témoin positif. La cytométrie en flux n'a pas permis d'observer une augmentation du signal fluorescent de l'IP pour les cellules qui ont internalisées les TiONts-APTES contrairement au témoin positif (qui présente 65,5% de signal fluorescent en raison de son effet toxique endommageant la membrane cellulaire). Cet essai atteste que l'internalisation des TiONts-APTES n'a pas induit de dommages aux membranes qui sont restées intactes (Figure 66).

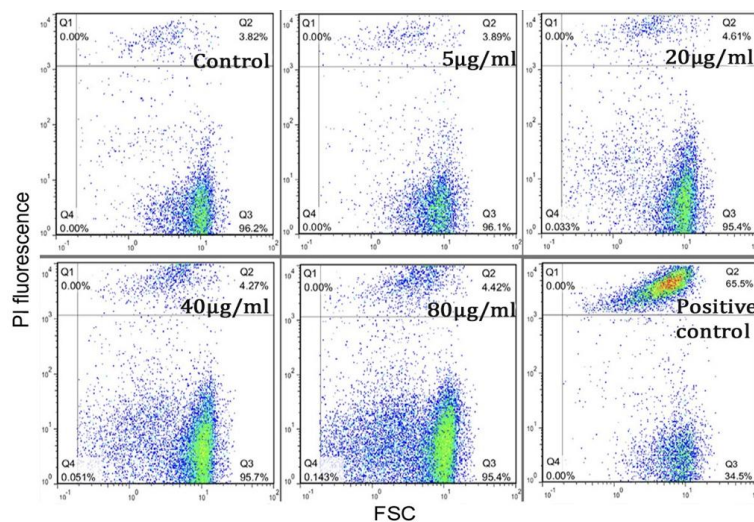


Figure 66 : Étude de l'intégrité des membranes cellulaires par cytométrie en flux pour les cellules BV2 incubées avec différentes concentrations de TiONts-APTES ($1, 5, 10, 20, 40$ et $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et avec le témoin positif (7-ketocholestérol). Le signal fluorescent des contrôles négatif et positif permet de fixer le pourcentage de

dommage sur la membrane cellulaire en présence de TiONts-APTES. La population de cellules inclut à la fois les cellules vivantes et mortes.

Pour finir, les TiONts-APTES ont montré qu'ils n'interagissaient pas avec le cycle cellulaire de la lignée BV2 (Figure 67). En effet, le cycle cellulaire est très similaire à celui qui est observé pour le témoin négatif. Par contre, les cellules du témoin positif ont présenté une réduction du nombre de cellules dans la phase de synthèse (S) et mitotique (M). De plus, la population SubG1 (qui est un indicateur des cellules subissant l'apoptose) est négligeable et plus faible pour les cellules traitées aux TiONts-APTES que dans le cas des cellules traitées avec le témoin positif.

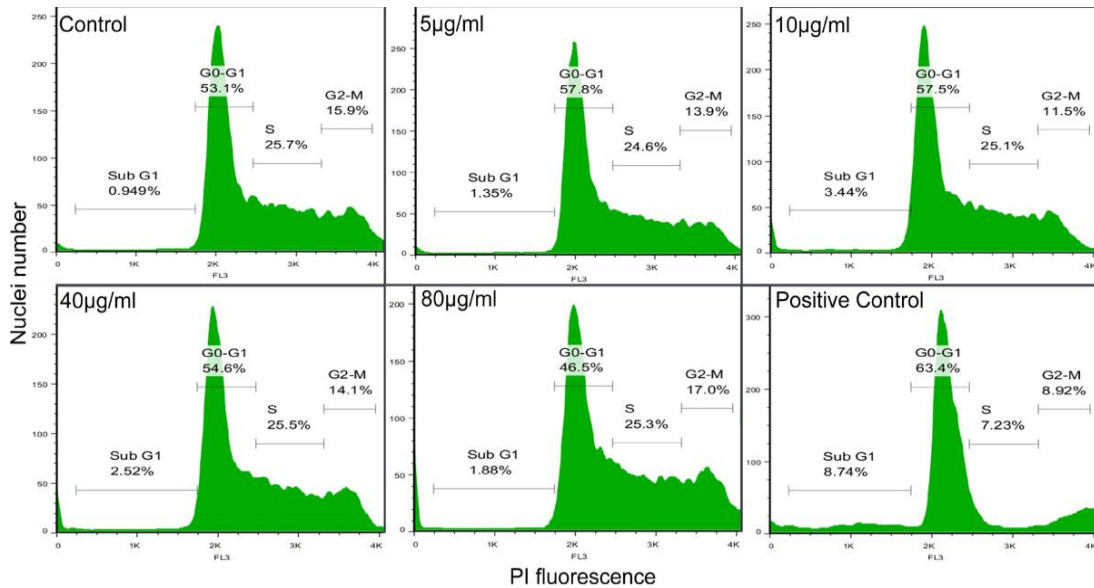


Figure 67 : Étude du cycle cellulaire analysé par cytométrie en flux pour les cellules BV2 incubées avec différentes concentrations de TiONts-APTES (1, 5, 10, 20, 40 et 80 µg.mL⁻¹) et avec le témoin positif.

Par conséquent, les TiONts-APTES n'engendrent pas de dommages sur cette lignée cellulaire étudiée et peuvent remplir leur rôle de nanovecteur en s'internalisant correctement.

II.3.2. Évaluation de la cytotoxicité des TiONts-APTES sur la lignée cellulaire humaine du cancer du foie (HepG2)

La viabilité cellulaire est déterminée à travers deux essais biologiques pour étudier la perturbation de l'homéostasie cellulaire¹⁵ : le test alamarBlue® et la cinétique de synthèse des ARN totaux. Le test alamarBlue® utilise un indicateur sensible de l'état oxydo-réducteur du milieu intracellulaire appelé résazurine (initialement de couleur bleu et non fluorescent). Lorsque ce colorant diffuse jusqu'aux cellules, la résazurine se réduit en un composé rose (résorufine) qui peut être dosé par fluorescence. La réduction de la résazurine est le reflet du métabolisme cellulaire, notamment dans les mitochondries. Ainsi, ce test permet de détecter les cellules vivantes en mesurant l'activité fluorescente. Quant au test de la cinétique de synthèse des ARN totaux, il mesure la cinétique de production des ARN totaux, préalablement marqués par l'uridine tritiée, par rapport à un témoin négatif. Ce test permet de confirmer les résultats du test l'alamarBlue® et cet essai biologique est beaucoup plus sensible et fiable [263].

¹⁵ Perturbation de l'activité cellulaire qui impose un changement afin d'ajuster l'activité cellulaire aux besoins de l'organisme entier.

La cytotoxicité du nanomatériau, TiONts-APTES, est étudiée sur des cellules du cancer du foie (lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome hépatocellulaire, HepG2). Cette lignée cellulaire est un modèle approprié pour étudier la toxicité, surtout pour les composés requérant une activation métabolique. Elle présente l'avantage de mimer les processus d'activation et de détoxification qui ont lieu *in vivo* chez l'Homme et d'exprimer la plupart des protéines plasmatiques caractéristiques des cellules hépatiques saines [263], lieu où les nanoparticules ont souvent tendance à s'accumuler (Chapitre 1. I.3.). L'activité cytotoxique est comparée à un indicateur de cytotoxicité qui a largement diminué le taux de viabilité cellulaire. Le témoin positif pour les deux tests de cytotoxicité est le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Ces essais ont été réalisés par Y. Saïbi, lors de son contrat d'ingénieur sur la plateforme NanoCare en 2015 (laboratoire partenaire Dertech Packtox, INSERM U866) et feront l'objet d'une publication prochainement [264].

La viabilité cellulaire est examinée après 24 h d'incubation des TiONts-APTES avec les cellules HepG2 *via* le réactif d'AlamarBlue®. Cet essai ne révèle aucune activité cytotoxique significative pour chacune des concentrations en TiONts-APTES, tout comme dans le cas du témoin négatif (Figure 68a). Tandis que le $K_2Cr_2O_7$ induit une forte toxicité sur ces cellules.

Une autre évaluation de la cytotoxicité est réalisée par le suivi de la cinétique de synthèse des ARN totaux, comme le montre la Figure 68b. La viabilité est proche de 100% pour les doses de 25, 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, qui est la concentration maximale qui peut être dispersée dans un milieu de culture. Cette gamme de concentrations est tout à fait classique dans les études de toxicité des nanoparticules [26, 149].

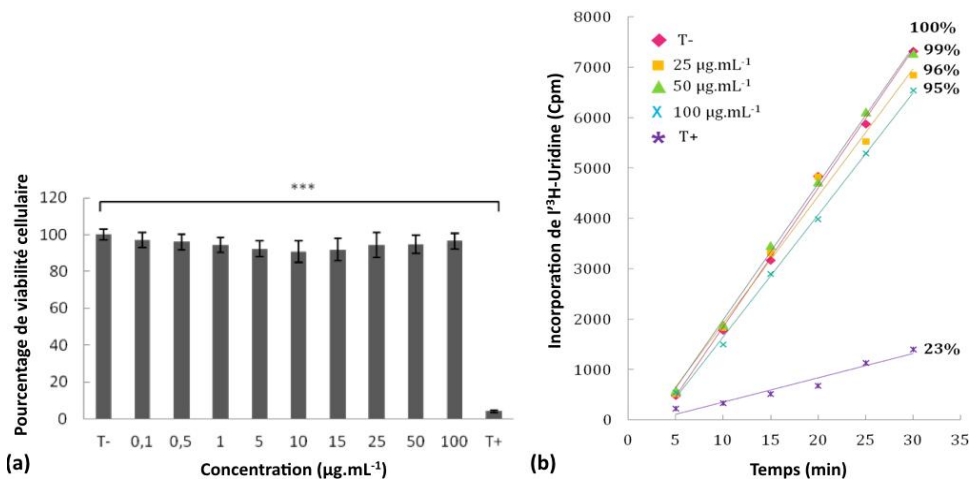


Figure 68 : (a) Évaluation de la viabilité cellulaire et (b) de la cinétique d'internalisation de ^3H -uridine sur des cellules HepG2 après 24 h d'incubation à différentes concentrations de TiONts-APTES ou avec le témoin positif ($K_2Cr_2O_7$).

II.3.3. Évaluation du stress oxydant et d'une éventuelle génotoxicité créés par les TiONts-APTES

L'éventuel stress oxydant créé par les TiONts-APTES est déterminée *via* des mesures de production de ROS par le dihydroéthidium (le DHE qui est un marqueur fluorescent utilisé dans la quantification des dérivés réactifs de l'oxygène, principalement en cytométrie en flux) et l'éventuelle génotoxicité créée est analysée *via* le test des comètes. Tous ces tests sont réalisés, une nouvelle fois,

sur la lignée cellulaire HepG2. Le test des comètes, peu utilisé en laboratoire, est un test très sensible et permet de détecter les cassures simple et double brin de l'ADN et les sites labiles alcalins par électrophorèse en condition alcaline puis par coloration de l'ADN avec l'IP. Par cette méthode, les résultats apparaissent sous forme de comètes où la tête de la comète correspond à l'ADN non altéré et la queue de la comète à l'ADN fragmenté.

La Figure 69a montre un effet dose avec les cellules HepG2 exposées à différentes concentrations de TiONts-APTES durant 24 h. En effet, le stress oxydatif induit par les nanotubes modifiés par l'APTES est le plus important pour une concentration de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et il est supérieur au témoin positif. Cependant, les TiONts-APTES n'affectent pas l'ADN des cellules HepG2 après une exposition de 24 h même à une concentration de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 69b).

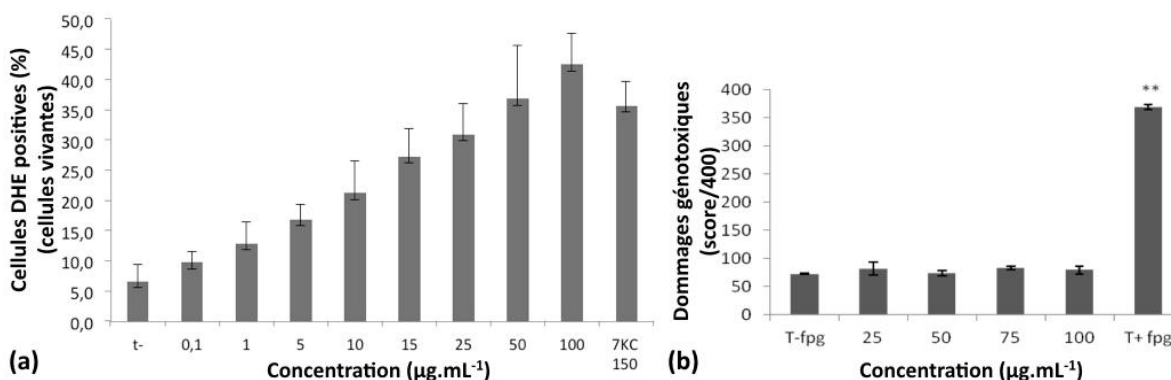


Figure 69 : Évaluation (a) du stress oxydatif et (b) de la génotoxicité des cellules HepG2 après 24 h d'incubation à différentes concentrations de TiONts-APTES. **: différences significatives à $p < 0,05$.

Ces résultats montrent que le stress oxydatif produit par les TiONts-APTES n'entraîne pas de conséquences directes sur l'ADN dans les cellules HepG2. Par conséquent, différents mécanismes de survie cellulaire s'activent pour réparer les possibles dommages cellulaires.

II.4. Conclusions

Des étapes de pré-fonctionnalisations sont déterminantes pour améliorer la stabilité colloïdale de la suspension dans les conditions physiologique. Dans cette partie, le greffage de l'APTES et du PEG₃₀₀₀ ont été présentés. Le succès de ces greffages a été prouvé par différentes techniques comme l'XPS, l'IR-TF, l'ATG et la zêtamétrie pour en fin de compte améliorer la stabilité colloïdale des tubes en suspension aqueuse. Cependant, ces travaux n'ont pas conduit à une stabilité colloïdale optimale de la suspension en milieu biologique et cette dernière sera améliorée dans la suite du manuscrit (voir Chapitre 3. et Chapitre 4.). De plus, les études précédentes, réalisées au sein de mon laboratoire (voir Chapitre 1. II.1.4.) et des tests biologiques préliminaires *in vitro* effectués sur les TiONts-APTES au cours de ces travaux de thèse, ont montré que cette étape de conception du nano-objet ne présentait pas de toxicité et de génotoxicité sur les lignées cellulaires BV2 et HepG2. Ces résultats sont en accord avec la littérature en vue de ce type d'application [23, 26, 89, 133, 147, 156] montrant le fort potentiel des TiONts-APTES. En effet, c'est un prérequis obligatoire pour que toutes les caractéristiques d'un nanovecteur soient validées. Enfin, cette stratégie permet d'avoir des fonctions thiols venant du HS-PEG₃₀₀₀-COOH en surface des TiONts fonctionnalisés, ceci afin d'envisager le greffage d'un agent thérapeutique et des fonctions amines résiduelles pour greffer l'agent chélatant.

III. Greffage d'un agent thérapeutique à la surface des nanotubes de titanate : le docétaxel

III.1. Stratégie utilisée pour le greffage du DTX sur les TiONts-PEG₃₀₀₀

III.1.1. Utilisation d'un agent de couplage : le PMPI

Le *p*-maléimidophényl isocyanate (PMPI) est une petite molécule possédant à chacune de ses extrémités d'une part, une fonction maléimide qui est très réactive avec les thiols pour former des liaisons thioéthers stables et, d'autre part, une fonction isocyanate qui forme une liaison carbamate en présence d'une fonction hydroxyle (Figure 70). Cette molécule est très utilisée pour conjuguer des composés contenant des hydroxyles tels que des stéroïdes ou des vitamines. Cependant, les fonctions très réactives du PMPI sont sensibles à l'humidité et sont facilement hydrolysables perdant alors leur spécificité. C'est pourquoi, des solvants organiques sont préférés pour réaliser ces greffages. Or pour rester dans la continuité des expériences antérieures, les couplages de cette étude sont réalisés en phase aqueuse. Dans ce milieu, la réaction est réalisée à pH 8,5, pH pour lequel la réaction d'hydrolyse est plus lente, afin de favoriser la formation de la liaison carbamate entre l'isocyanate et l'hydroxyle lors de l'activation du DTX par le PMPI.

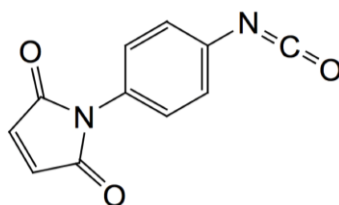


Figure 70 : Schéma de la molécule PMPI.

Par ailleurs, la réaction spécifique entre un maléimide et un thiol s'effectue sur une gamme de pH allant de 6,5 à 7,5, ceci pour éviter de perdre la spécificité du maléimide sur ce type de réaction. Au-delà de pH 7,5, la réaction est possible avec des thiols mais aussi avec des amines [265] (Figure 71).

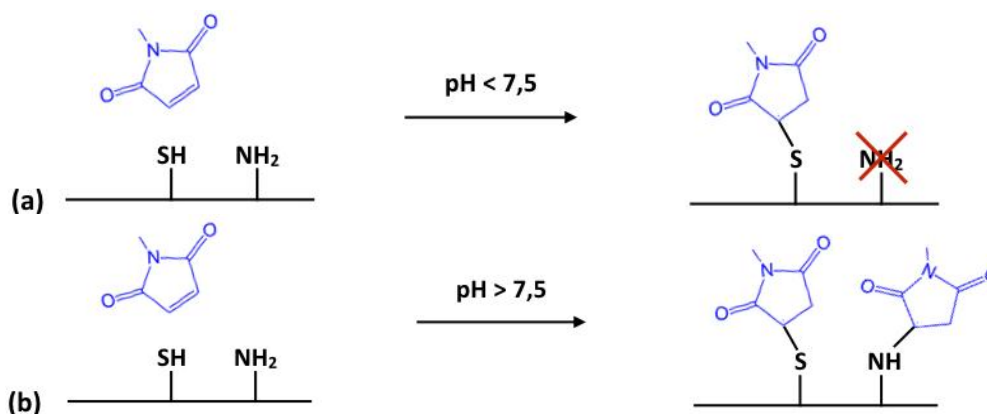


Figure 71 : (a) Le maléimide réagit spécifiquement avec une fonction thiol à pH < 7,5 et (b) perd sa spécificité pour réagir soit avec une fonction thiol ou avec une fonction amine à pH > 7,5.

Le docétaxel ne possédant pas de fonction adéquate pour être directement couplé aux TiONts-PEG₃₀₀₀, il est alors nécessaire de l'activer avec cet agent de couplage intéressant en formant une liaison carbamate (DTX-PMPI). Tandis que parallèlement, la fonction maléimide permet de former une liaison covalente avec l'une des fonctions thiols des TiONts-PEG₃₀₀₀ (TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX).

III.1.2. Activation du DTX par le PMPI

Le docétaxel (poudre blanche ; Biotrend, lot : BG0588/02), peu soluble dans l'eau, est préalablement dissous dans 3 mL de DMSO (diméthylsulfoxyde). Cette solution est ensuite ajoutée dans 20 mL de tampon borate (0,1 M ; pH 8,5) contenant du PMPI (poudre jaune, Fisher Scientific) (Figure 72a). Le rapport molaire est ainsi fixé à 1 DTX : 4 PMPI. La solution est placée au bain à ultrasons pendant 5 min afin de bien l'homogénéiser. Puis la réaction d'activation dure 24 heures sous agitation magnétique (400 tr/min) à température ambiante. Une partie de la solution est dialysée (0,5 - 1 kDa) pendant 1 semaine pour éliminer le PMPI en excès qui n'a pas pu activer le DTX puis elle est lyophilisée pour pouvoir réaliser des caractérisations. La poudre de DTX-PMPI obtenue est jaunâtre montrant bien la présence du DTX et du PMPI (Figure 72b). Le reste du DTX-PMPI en solution est utilisé pour son greffage à la surface des TiONts-PEG₃₀₀₀. Il n'est pas exclu que la méthode de purification utilisée pour le DTX-PMPI hydrolyse partiellement la fonction maléimide rendant impossible son greffage sur le thiol du PEG₃₀₀₀.

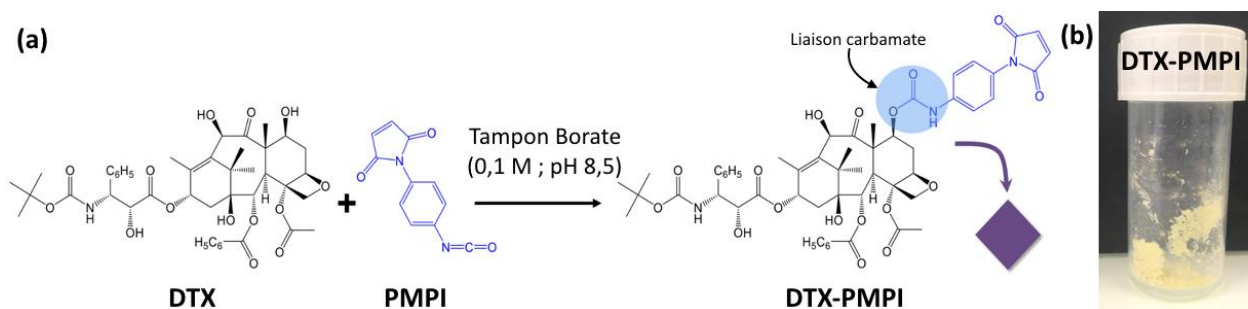


Figure 72 : (a) Greffage du PMPI pour l'activation du DTX et (b) photographie de la poudre de DTX-PMPI obtenue après purification et lyophilisation.

N.B. : Le docétaxel étant une molécule cytotoxique, le DTX seul et le DTX-PMPI sont manipulés avec précaution sous hotte avec des moyens de protections individuels (gants, lunettes, masque FF3P, blouse). Les déchets sont stockés dans un récipient de récupération prévu à cet effet dans une salle ventilée.

III.1.3. Mise en évidence de l'activation du DTX par le PMPI

Le DTX est activé par le PMPI pour obtenir une fonction adéquate afin de le greffer sur les TiONts-PEG₃₀₀₀. Les bandes de vibrations IR-TF signalées en bleu sont attribuées au DTX-PMPI (Figure 73). L'analyse infrarouge du DTX-PMPI n'a pas permis d'observer la vibration intense correspondant à la liaison isocyanate (**N=C=O**) du PMPI située entre 2200 cm⁻¹ et 2300 cm⁻¹. Cette observation a donc permis d'affirmer l'absence de PMPI ou l'activation du DTX par le PMPI. La poudre étant jaunâtre (Figure 72b), prouvant la présence du PMPI, il est donc fort possible que le DTX ait été activé par le PMPI. De plus, la fonction carbamate a pu être décomposée comme une liaison amide secondaire avec des vibrations localisées à 1310 cm⁻¹ (**v(CN)**), 1520 cm⁻¹ (**v(NH)**) et 1640 cm⁻¹ (**v((C=O)-NH-R)**). D'autres

liaisons caractéristiques du DTX et du PMPI sont présentes avec les liaisons attribuées aux t-butyles à 1380 cm^{-1} mais aussi aux liaisons carbonyles (1720 cm^{-1}), hydroxyles (3400 cm^{-1}), aux cycles aromatiques et aux alkyles aliphatiques ($3100 - 2800\text{ cm}^{-1}$) montrant l'activation du DTX (bandes de vibrations représentées en rouge).

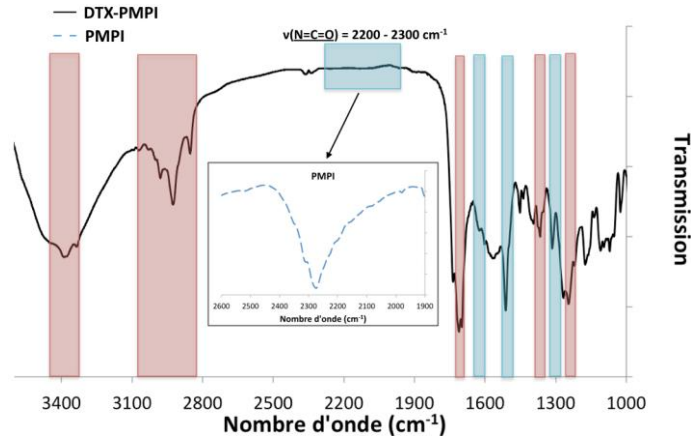


Figure 73 : Spectre IR-TF du DTX-PMPI mettant en évidence les bandes de vibrations du DTX-PMPI (bandes en bleues) et la présence du DTX, ainsi que le PMPI (bandes en rouges). Le spectre IR-TF du PMPI seul prouve l'absence d'une liaison caractéristique du PMPI lors de l'activation : la liaison isocyanate qui réagit avec un hydroxyle formant une liaison carbamate.

Des analyses complémentaires réalisées par RMN ^1H montrent que les signaux correspondent principalement au DTX car le spectre RMN ^1H du PMPI est confondu avec celui du DTX (Figure 74). Cependant, lorsque le déplacement chimique en RMN ^1H du DTX et du DTX-PMPI sont comparés, des modifications sont observées notamment sur la gamme 3,5 – 5,5 ppm et démontrent que le DTX est effectivement modifié par le PMPI. Parmi les hydroxyles présents au sein du DTX, la justification de la régiosélectivité de la réaction entre le DTX et le PMPI est précisée en Annexe 5. Les déplacements chimiques expérimentaux du DTX et du DTX-PMPI sont également indiqués en Annexe 5.

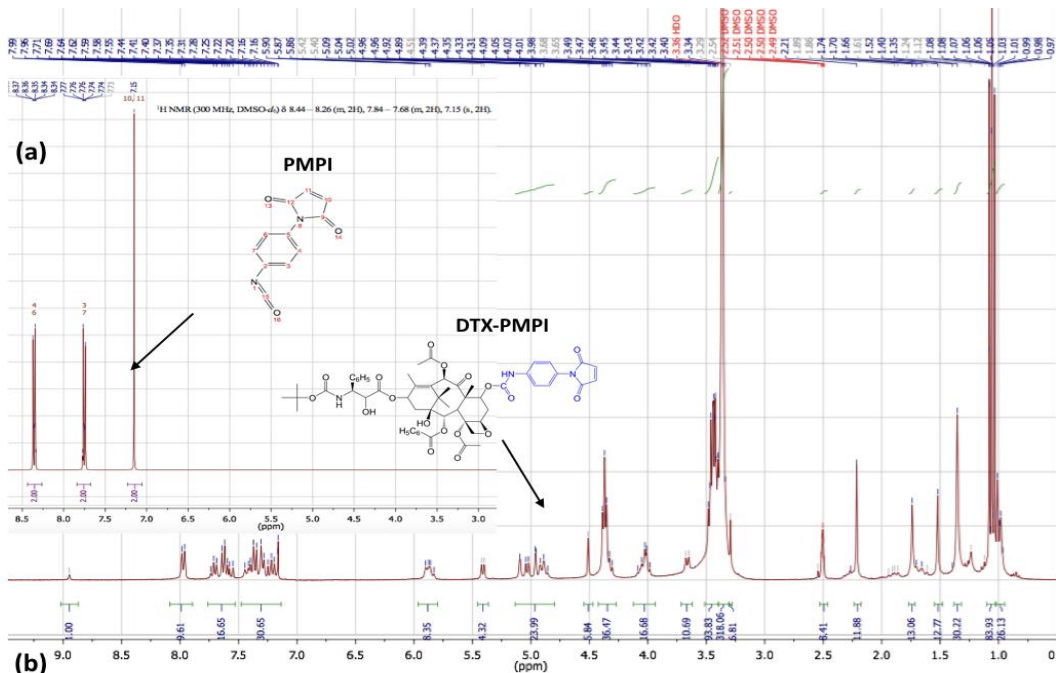


Figure 74 : Spectres RMN ^1H du (a) PMPI et (b) du DTX-PMPI.

La quantification par analyse XPS, ramenée à la concentration atomique de l'oxygène, révèle des taux relativement proches entre les valeurs expérimentales et théoriques du DTX, du PMPI et du DTX-PMPI (Tableau 9). De plus, cette analyse montre une légère augmentation du taux d'azote et de carbone du DTX-PMPI par rapport au DTX. Quant au PMPI, le rapport de l'azote sur l'oxygène est de 2 pour 3 d'après sa formule moléculaire. Or, cette analyse montre que le taux est plutôt de 2,4 azotes pour 3 oxygènes indiquant une possible hydrolyse du PMPI. En effet, l'hydrolyse de la fonction isocyanate en amine diminue la quantité d'oxygène avec un groupement CO₂ partant.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}
DTX	76,1	22,2	1,7
% atomique (DTX) / O _{1s}	3,43	1,00	0,08
% atomique (DTX théorique) / O _{1s}	3,07	1,00	0,07
PMPI	72,8	15,1	12,1
% atomique (PMPI) / O _{1s}	4,82	1,00	0,80
% atomique (PMPI théorique) / O _{1s}	3,67	1,00	0,67
DTX-PMPI	75,8	21,4	2,8
% atomique (DTX-PMPI) / O _{1s}	3,54	1,00	0,13
% atomique (DTX-PMPI théorique) / O _{1s}	3,18	1,00	0,18

Tableau 9 : Analyses XPS des concentrations atomiques expérimentales et théoriques du DTX, du PMPI et du DTX-PMPI.

L'analyse XPS des niveaux C_{1s}, O_{1s} et N_{1s} du PMPI permet de déterminer si la molécule est ou non hydrolysée (Figure 75a). Dans le cas d'une hydrolyse totale, le maléimide se transforme en une fonction amide et en une fonction carboxyle alors que l'isocyanate s'hydrolyse en une fonction amine. Le seuil O_{1s} montre la possibilité qu'une partie du PMPI soit hydrolysée. En effet, la proportion de la contribution du maléimide devrait être la même que celle de l'isocyanate. Cependant, la composante à 532,2 eV (14%) est caractéristique de l'hydrolyse de la fonction maléimide en formant les liaisons (O=C)-NH-C et (O=C)-OH. Quant à la décomposition du niveau N_{1s}, la composante observée à 399,8 eV (50,2%) peut correspondre à la fonction N=C=O, C-NH₂ et à (O=C)-NH-C. Par ailleurs, sa proportion est égale à la composante à 400,5 eV (49,8%) correspondant au groupement imide (O=C)-NH-(C=O) caractéristique de la fonction maléimide. Par conséquent, le taux d'hydrolyse est minime puisque la liaison C-NH₂ n'est pas retrouvée sur le niveau C_{1s} du PMPI. Ainsi, l'hydrolyse de la fonction isocyanate est très faible voire inexistante. De plus, il y a quasiment autant de fonction maléimide que de fonction isocyanate d'après le niveau N_{1s} même s'il n'est pas exclu que le maléimide soit faiblement hydrolysé d'après le niveau O_{1s}. Pour conclure, le PMPI utilisé semble suffisamment réactif *i.e.* non hydrolysé pour activer le DTX.

Quant au DTX-PMPI, l'augmentation de la composante du niveau C_{1s} à 285,4 eV et à 284,6 eV du DTX-PMPI attribuée respectivement au **benzène** / C=C et C-C / C-H montre une modification chimique par rapport au DTX seul (Figure 75b-c). La décomposition du niveau O_{1s} du DTX-PMPI a, elle aussi, montré une hausse de la composante située à 532,1 eV (60,9%) avec l'apport du PMPI comparé au DTX (48%). Cette différence est due à l'hydrolyse de la fonction maléimide se trouvant à cette position alors que la liaison caractéristique de cette fonction non hydrolysée (O=C)-NH-(C=O) est localisée à 532,9 eV (39,1%). Enfin, le DTX ne possède qu'une seule composante à 399,5 eV correspondant à la liaison amide tandis que le DTX modifié par le PMPI met en avant l'apparition d'une nouvelle

composante, en plus de cette dernière, à 400,4 eV (64,9%) attribuée à la liaison carbamate [266] et au maléimide non hydrolysé.

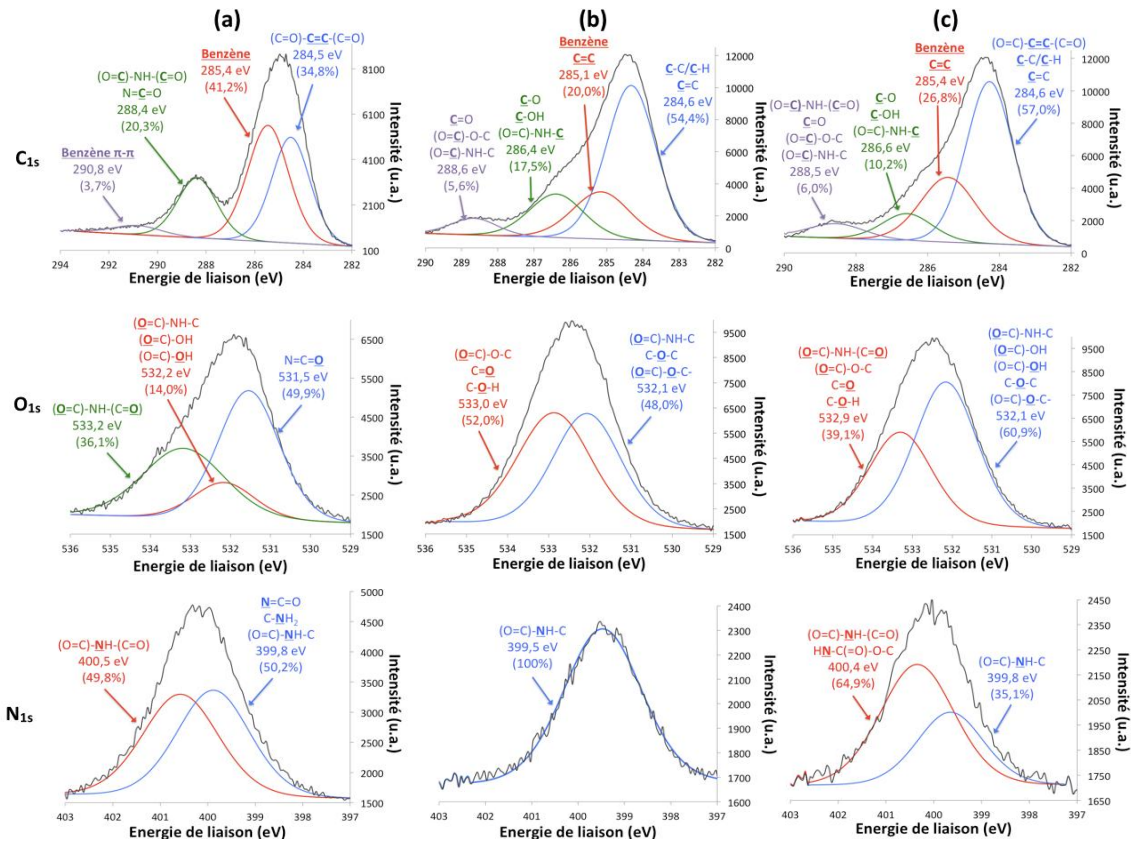


Figure 75 : Analyses XPS : décomposition des niveaux C_{1s}, O_{1s} et N_{1s} du (a) PMPI, (b) DTX et (c) DTX-PMPI.

En accord avec l'IR-TF et la RMN ¹H, l'XPS met en évidence la modification chimique qui est apportée par le PMPI sur le DTX afin qu'il puisse être greffé sur les TiONts-PEG₃₀₀₀.

III.2. Fonctionnalisation des nanotubes de titanate par le DTX-PMPI

III.2.1. Synthèse des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX

Les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sont préparés à partir du DTX-PMPI et des TiONts-PEG₃₀₀₀ (Figure 76). Dans un premier temps, les TiONts-PEG₃₀₀₀ sont agités magnétiquement (400 tr/min) en présence du tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) pendant 30 min. Le TCEP permet de rompre les éventuels ponts disulfures et de libérer les fonctions thiols afin que le greffage soit optimisé. Ensuite, le DTX-PMPI est ajouté à la suspension de nanotubes se trouvant dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) après avoir homogénéisé l'ensemble dans un bain à ultrasons pendant 5 min. Ce tampon est utilisé pour favoriser la réaction du maléimide avec le thiol du PEG₃₀₀₀. La quantité de DTX-PMPI est introduite en large excès par rapport à la quantité de PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts (1 PEG₃₀₀₀ : 20 DTX-PMPI). Après 24 heures de réaction sous agitation magnétique (400 tr/min) à 25°C, la suspension est purifiée par ultrafiltration (100 kDa) puis une partie est récupérée sous forme de poudre après lyophilisation pour la caractériser.

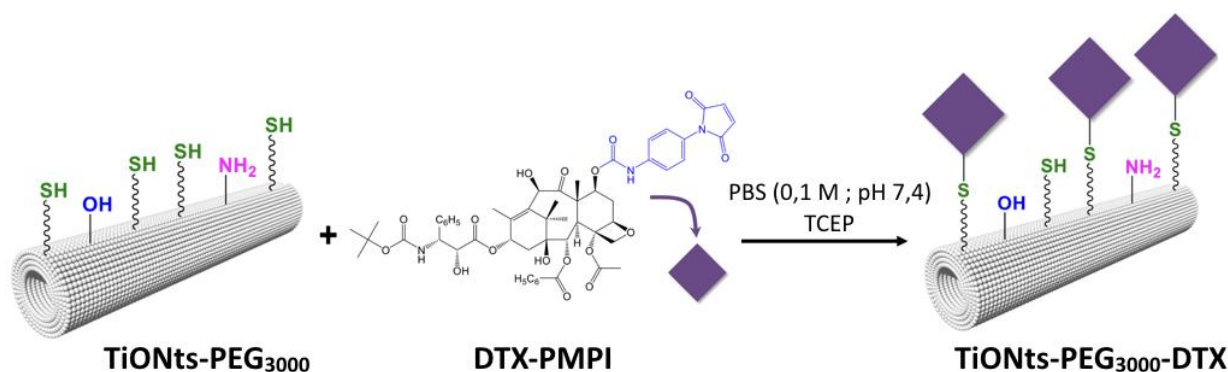


Figure 76 : Schéma illustrant le greffage du DTX-PMPI à la surface des TiONts-PEG₃₀₀₀.

III.2.2. Caractérisations et validation du greffage de l'agent thérapeutique

La comparaison par spectroscopie Raman entre les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (Figure 77) permet, tout d'abord, de montrer la signature des nanotubes de titanate à 285 cm⁻¹, 456 cm⁻¹, 830 cm⁻¹ et 930 cm⁻¹ (triangle bleu), ainsi que celles des nanorubans, en moindre proportions, à 190 cm⁻¹ et 200 cm⁻¹. De plus, la présence du DTX à la surface des TiONts-PEG₃₀₀₀ est observée avec l'apparition de nouvelles bandes sur le spectre des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX correspondant au DTX [267]. Les bandes situées à 625 cm⁻¹ et à 1005 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations provenant des cycles monosubstitués. Tandis qu'à 1605 cm⁻¹, 1635 cm⁻¹ et à 1710 cm⁻¹, les bandes de vibrations prouvent la présence, respectivement, des esters et correspondent aux élongations des cycles conjugués avec les carbonyles et aux carbonyles au sein du DTX. De plus, les signaux compris entre 1200 - 1500 cm⁻¹ pour les deux spectres correspondent à la déformation des CH₂ et des CH₃. Cependant, les alcools secondaires sortent également dans la même région que les alkyles (entre 1200 – 1430 cm⁻¹) d'où la bande plus intense à 1250 cm⁻¹.

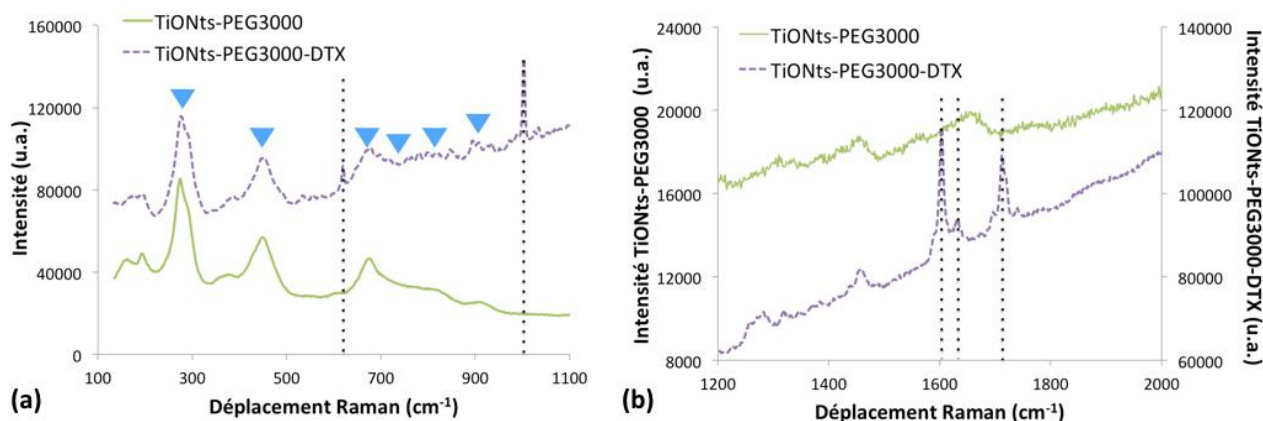


Figure 77 : Spectres Raman entre (a) 100-1100 cm⁻¹ et entre (b) 1200-2000 cm⁻¹ des TiONts-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (les triangles bleus correspondent à la signature des TiONts et les lignes verticales sont attribuées aux bandes caractéristiques du DTX).

Les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sont ensuite analysés par IR-TF pour mettre en évidence l'apparition de nouvelles bandes de vibrations attribuées aux liaisons (O=C-NH) à 1280 cm⁻¹ et aux liaisons (C=O)-NH à 1710 cm⁻¹ correspondant aux fonctions amides secondaires et aux carbamates (Figure 78). De plus, les bandes dans la zone comprise entre 1450 - 1300 cm⁻¹ et provenant des carbones aliphatiques du DTX-PMPI sont plus intenses par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀.

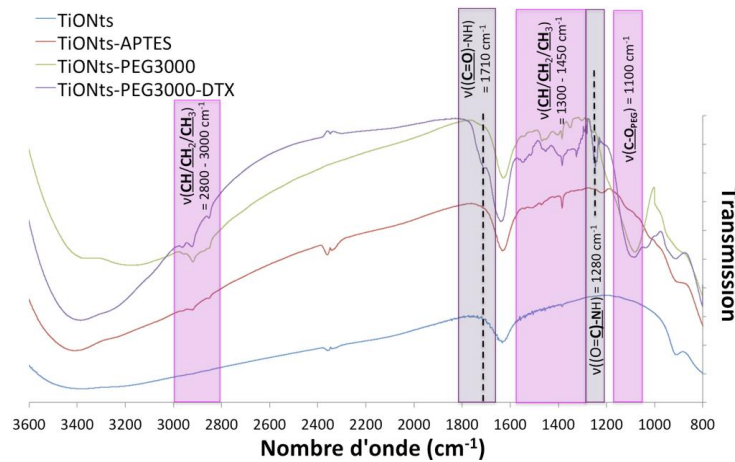


Figure 78 : Spectres infrarouge des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX.

La quantification par analyse XPS a indiqué une augmentation conséquente du pourcentage de carbone et d'oxygène lors du greffage de l'agent thérapeutique activé par le PMPI à la surface des TiONts-PEG₃₀₀₀. Alors qu'une diminution notable des autres éléments est observée car les éléments se trouvant maintenant en profondeur sont moins visibles. Ceci atteste la réussite du greffage de l'agent thérapeutique qui masque de plus en plus les TiONts (Tableau 10).

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}	S _{2p}
TiONts-PEG ₃₀₀₀	19,2	47,6	7,2	19,2	5,0	1,5	0,3
% atomique (TiONts-PEG ₃₀₀₀) / Ti	1,0	2,5	0,4	1,0	0,3	0,1	0,02
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	40,4	40,5	2,1	8,4	3,6	1,3	0,2
% atomique (TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX) / Ti	4,8	4,8	0,2	1,0	0,4	0,1	0,02

Tableau 10 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX.

Le greffage de l'agent thérapeutique est également visible en zétamétrie dans une solution de NaCl (10⁻² M) puisque cette modification de surface décale le PIE vers des pH plus faibles (PIE_{TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX} = 4,2) par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀ (PIE_{TiONts-PEG₃₀₀₀} = 5,7) en plus d'observer un effet d'écrantage des charges vers cette gamme de pH (Figure 79). Néanmoins, au pH physiologique, le potentiel zêta indique un potentiel d'environ -20 mV suggérant à la fois une répulsion stérique et électrostatique pour le nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX.

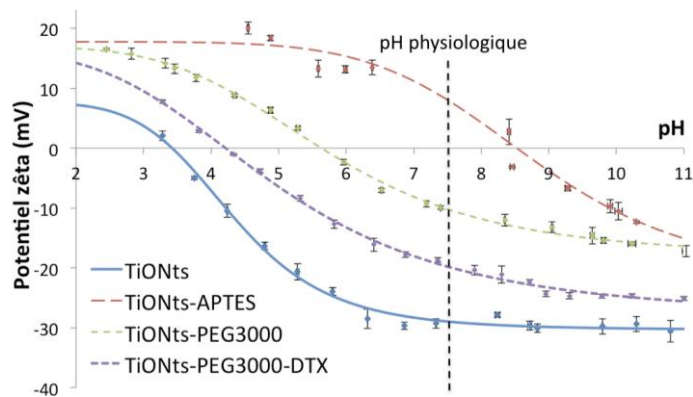


Figure 79 : Évolution du potentiel zêta en fonction du pH dans NaCl (10⁻² M) des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX. La ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique.

Les mesures d'absorbance en fonction du temps par turbidimétrie ont permis d'évaluer la stabilité colloïdale du nanohybride (Figure 80a). La stabilité colloïdale en milieu physiologique est meilleure grâce au DTX-PMPI à la surface des TiONts en raison d'un effet stérique et électrostatique à ce pH. La suspension des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX est restée stable durant 48 h dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 80b).

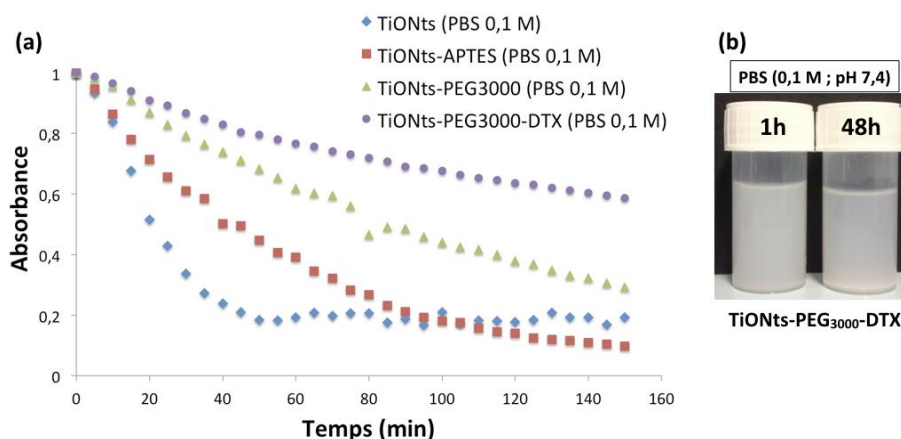


Figure 80 : (a) Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX afin d'évaluer leur stabilité colloïdale. (b) Photographie des suspensions stables des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX dans le PBS (0,1 M ; pH 7,4) après 1 h et 48 h.

Le taux de greffage du DTX-PMPI est estimé à 0,24 DTX.nm⁻² de nanotubes de titanate par ATG selon l'Équation 3 (Tableau 11). La perte de masse est, une nouvelle fois, plus conséquente par rapport au précédent greffage indiquant la présence et la persistance d'une matière organique supplémentaire à la surface des TiONts correspondant au DTX-PMPI (Figure 81). Cependant, ce taux est bien supérieur à celui qui a été trouvé pour les TiONts-PEG₃₀₀₀ (0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻² de TiONts). Ceci laisse à penser qu'il y a un autre mode d'interaction du DTX sur la surface des TiONts en plus de celui envisagé avec la fonction thiol du polymère.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	175	2,8	18	10,6 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	160	10,3	58	5,3 (±0,5) NH ₂	7	29 000
TiONts-PEG ₃₀₀₀	165	15,0	3073	0,060 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	6	330
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	150	20,9	1022	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310

Tableau 11 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX par ATG. ^(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

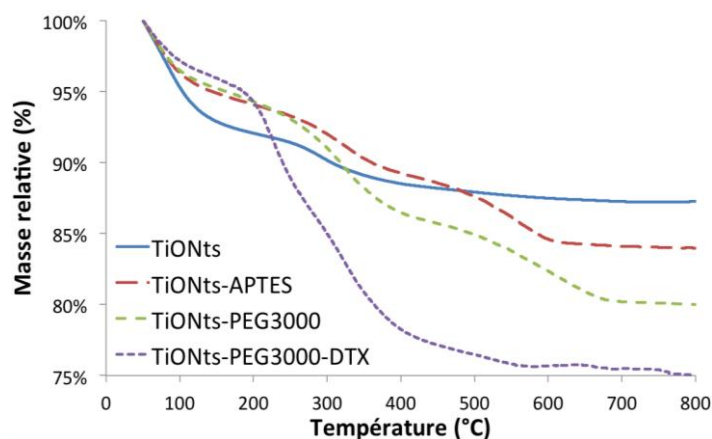


Figure 81 : Courbes ATG des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

III.2.3. Accroche partielle du DTX-PMPI *via* les fonctions amines de l'APTES et/ou adsorption à la surface du nanohybride

Le taux de greffage du DTX à la surface des TiONts, précédemment déterminé par ATG, est bien plus élevé que celui du taux de thiol (0,24 DTX.nm⁻² pour 0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻² de TiONts). Cette observation suggère donc qu'il y a un autre mode d'interaction entre le DTX-PMPI et les TiONts-PEG₃₀₀₀. Il est possible que le DTX-PMPI s'adsorbe et/ou s'accroche sur la surface des nanotubes ou bien que les longues chaînes carbonées du PEG₃₀₀₀ piègent le DTX-PMPI. Le taux reste inchangé malgré des lavages répétés par ultrafiltration (100 kDa) avec un traitement préalable au bain à ultrasons pendant 10 min, suggérant une bonne stabilité de l'édifice.

Une étude complémentaire a prouvé que le DTX-PMPI pouvait s'adsorber et/ou accrocher à la surface des TiONts-PEG₃₀₀₀. Pour cela, le polymère utilisé n'est plus un polymère hétérobifonctionnel. Il possède, un poids moléculaire semblable au PEG₃₀₀₀ (Boc-NH-PEG₃₀₀₀-COOH ; M = 3173 g.mol⁻¹), une fonction carboxyle pour réagir avec la fonction amine de l'APTES et un groupe fonctionnel *tert*-butoxycarbonyle (Boc) (groupe protecteur de fonction amine) à la place d'une fonction thiol, empêchant toute réaction chimique avec le DTX-PMPI. La courbe ATG confirme la présence du DTX modifié par simple contact avec un polymère « inactif » greffé à la surface des TiONts-APTES (Figure 82). Le nombre de PEG₃₀₀₀-Boc (greffé dans les mêmes conditions) est identique à celui du PEG₃₀₀₀ (0,06 PEG₃₀₀₀-Boc.nm⁻²). Le taux de greffage du DTX-PMPI est plus faible (0,13 DTX.nm⁻² de nanotubes) que celui trouvé lors du greffage avec le polymère « actif » (0,24 DTX.nm⁻² de nanotubes) (Tableau 12). Par conséquent, on peut conclure qu'une partie du DTX-PMPI est bien adsorbée et/ou attachée par des liaisons covalentes à la surface des tubes, dans le cas du lot TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX. En effet, il a été vu dans le paragraphe III.1.1. que la fonction maléimide de PMPI perd sa spécificité pour des pH supérieurs à 7,5 (ce qui est très proche du pH de greffage du DTX-PMPI sur les nanotubes : pH 7,4) et peut réagir avec la fonction amine de l'APTES. Ainsi, la réaction de couplage pourrait avoir lieu aussi bien avec des thiols qu'avec des amines (Figure 71). Cette hypothèse justifierait le décalage du PIE des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX vers des pH plus faibles par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀ (PIE_{TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX} = 4,2 vs. PIE_{TiONts-PEG₃₀₀₀} = 5,7) (Figure 79) puisque le DTX-PMPI aurait consommé des amines de l'APTES non greffées par le PEG₃₀₀₀. L'adsorption forte du DTX-PMPI entre les longues chaînes carbonées du PEG, ou à l'intérieur de la cavité

de tubes, ne peut cependant pas être totalement exclue, même si la couche d'APTES à la surface des TiONts devrait en limiter l'accès.

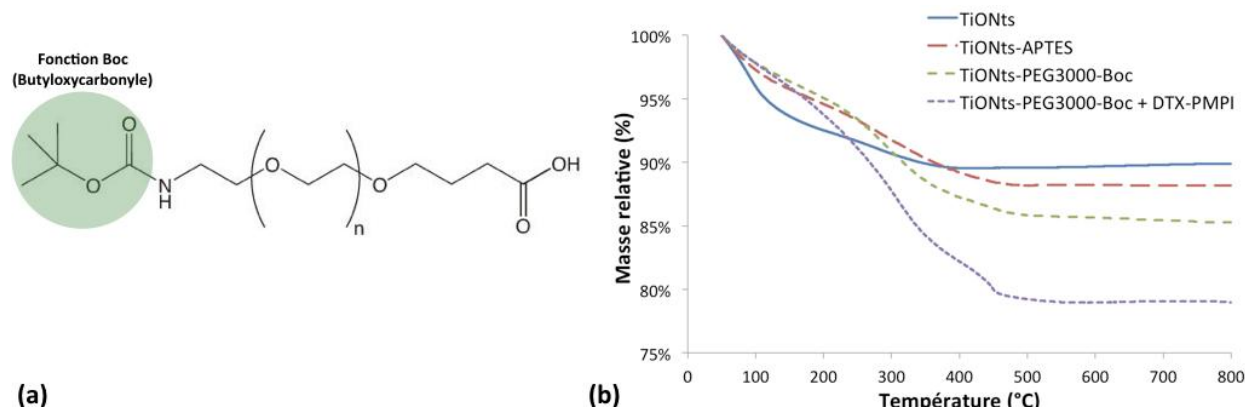


Figure 82 : (a) Molécule dont l'une des extrémités est inactivée, le Boc-NH-PEG₃₀₀₀-COOH ($M = 3173 \text{ g.mol}^{-1}$) et (b) courbes ATG sous air (25 mL.min^{-1}) avec une rampe de 5°C.min^{-1} montrant l'adsorption/ou le greffage du DTX-PMPI par simple contact entre les TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc et le DTX-PMPI.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol^{-1})	Molécule. nm^{-2} (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,6 ($\pm 1,5$) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	5,3 ($\pm 0,5$) NH ₂	7	14 230
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -Boc	165	13,2	3173	0,060 ($\pm 0,003$) PEG ₃₀₀₀ -Boc	2	330
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -Boc + DTX-PMPI	150	17,9	1022	0,13 ($\pm 0,01$) DTX-PMPI	2	710

Tableau 12 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc et de l'adsorption des TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc avec le DTX-PMPI par ATG. ^(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

De plus, les spectres infrarouges confirment les résultats de l'ATG (Figure 83). L'apparition de la bande de vibration IR-TF à 1100 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{PEG}})$) et l'augmentation de l'intensité des bandes situées entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{CH}/\text{CH}_2/\text{CH}_3)$) par rapport au spectre des TiONts-APTES indiquent la présence du polymère inactif sur la surface des TiONts. Par ailleurs, deux nouvelles bandes apparaissent sur le spectre des TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc + DTX-PMPI à 1280 cm^{-1} ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$) et à 1710 cm^{-1} ($\text{O}=\text{C}$)-NH comparé à celui des TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc. Ces bandes correspondent aux fonctions amides secondaires et aux carbamates. Ceci atteste que le DTX-PMPI peut s'adsorber ou être piégé efficacement sans qu'il puisse être relargué par de multiples étapes de purifications. Par ailleurs, la liaison formée entre le maléimide et l'amine de l'APTES peut être observé entre 1100 et 1200 cm^{-1} (amine secondaire). Ça pourrait expliquer que le DTX-PMPI soit aussi solidement accroché s'il formait des liaisons avec les amines restantes qui sont bien les fonctions les plus nombreuses.

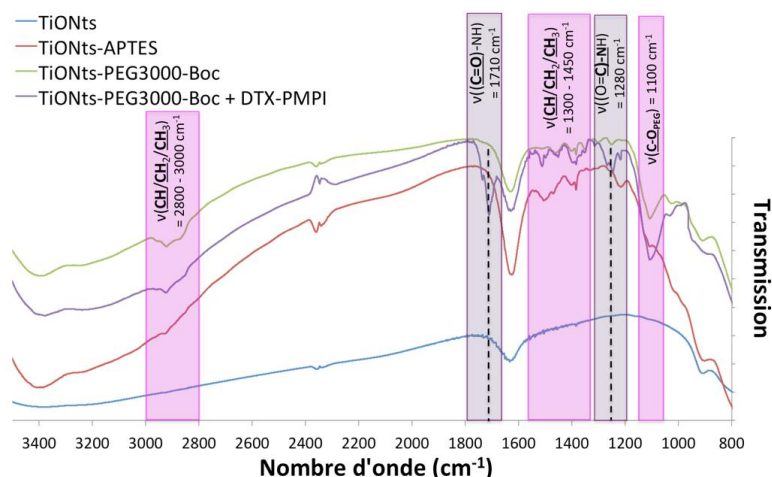


Figure 83 : Spectres infrarouge des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc et TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc + DTX-PMPI.

III.3. Conclusions

Tout d'abord, les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés avec succès par le DTX en vue d'améliorer l'efficacité thérapeutique lors des traitements. L'accroche de cette molécule s'est effectuée grâce au PMPI, qui possède une fonction très réactive (maléimide) avec la fonction thiol du PEG₃₀₀₀ et sert de d'agent de couplage entre les nanotubes et le médicament. Ainsi, l'activation du DTX par le PMPI a été mise en évidence par différentes techniques de caractérisations montrant la modification chimique du DTX (IR-TF, RMN ¹H et XPS). Parmi ces analyses, l'IR-TF du DTX-PMPI n'a pas permis d'observer la vibration intense correspondant à la liaison isocyanate ($N=C=O$) du PMPI alors que la poudre DTX-PMPI obtenue est jaunâtre montrant la présence du DTX et du PMPI. La fonction isocyanate du PMPI a donc réagit avec un hydroxyle du DTX pour le modifier et former une liaison carbamate. Quant à la fonction maléimide du PMPI, elle a pu réagir à la fois avec les fonctions thiols des TiONts-PEG₃₀₀₀ et les fonctions amines restantes de l'APTES pour accrocher le DTX-PMPI sur le nanohybride *via* des liaisons thioéthers.

Le greffage du DTX-PMPI sur les TiONts-PEG₃₀₀₀ a été prouvé par plusieurs techniques d'analyse telles que l'IR, l'XPS, la zétamétrie, l'UV-visible, le Raman et l'ATG. Le taux de DTX-PMPI déterminé est de l'ordre de 0,24 DTX.nm⁻². Cependant, ce taux est bien supérieur à la quantité de thiols présents à la surface des TiONts, ce qui indique une adsorption du DTX modifié ou une accroche *via* des liaisons covalentes avec les fonctions amines de l'APTES (pH > 7,5). Cette hypothèse a été confirmée avec l'utilisation d'un polymère ne possédant pas de fonction réactive avec le DTX-PMPI. La comparaison, entre le taux de DTX-PMPI adsorbé à l'aide du polymère inactif et celui observé pour le nanohybride, indique qu'une partie du DTX-PMPI est bien attachée par des liaisons covalentes sur les fonctions thiols (0,13 DTX.nm⁻² avec le PEG₃₀₀₀-Boc vs 0,24 DTX.nm⁻² avec le PEG₃₀₀₀). Ces mêmes taux sont observés malgré des lavages répétés suggérant une bonne stabilité de l'accroche, ce qui privilégierait le cas où les maléimides seraient aussi en partie liés à des amines.

Une dernière étape de fonctionnalisation est nécessaire afin de suivre le nanohybride final dans l'organisme à l'aide d'un agent chélatant (DOTA) pour complexer l'¹¹¹In avant de l'évaluer par des tests biologiques *in vitro* et *in vivo*.

IV. Greffage d'un macrocycle en vue de la détection du nanohybride en imagerie médicale

IV.1. Greffage d'un agent chélatant sur les amines libres à la surface des nanotubes de titanate : DOTA-NHS

L'agent chélatant, le DOTA-NHS, est fourni par la société CheMatech. L'intérêt de cette molécule, du point de vue du greffage, est l'ester de NHS qui va faciliter le greffage sur des nanotubes modifiés en surface par l'APTES. L'amine va réagir avec la fonction carboxyle du DOTA préalablement activée *via* cet ester NHS pour former une liaison peptidique. Les autres fonctions carboxyles du DOTA non activées ne rentrent pas en jeu lors du greffage et pourront agir sur la chélation et le maintien de l'élément radioactif à l'intérieur du macrocycle.

IV.1.1. Protocole de synthèse des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA

Cet agent chélatant est sélectionné pour réaliser de l'imagerie nucléaire en raison de sa capacité à complexer tout particulièrement l'¹¹¹In [268] pour l'imagerie SPECT afin de connaître la biodistribution *in vivo* du nanohybride dans le cas de souris (Chapitre 1. IV.2.3.2.). Le DOTA-NHS est ajouté dans une solution de PBS (0,1 M ; pH 7,4) contenant les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sous agitation magnétique (400 tr/min) à 25°C (Figure 84). Le macrocycle est greffé sur les amines libres restantes (non greffées par le PEG₃₀₀₀) *via* l'ester activé. Le rapport molaire est de 3 DOTA pour 2 NH₂ libre. De plus, le PBS est utilisé pour éviter d'hydrolyser trop rapidement l'ester. Ce greffage a été réalisé en dernier vu la sensibilité de l'imagerie nucléaire. En effet, une petite quantité de radioélément sur le nanohybride suffit pour pouvoir le suivre *in vivo*.

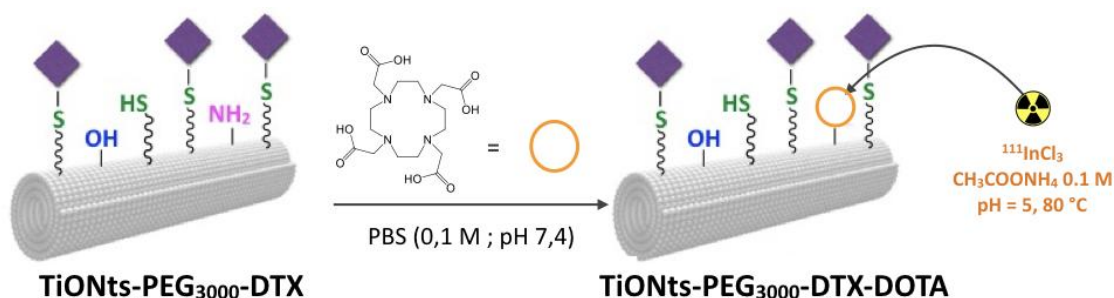


Figure 84 : Synthèse des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA.

Après 6 heures de réaction, la suspension est ultrafiltrée (100 kDa) pour éliminer le DOTA n'ayant pas réagi puis elle est lyophilisée pour être caractérisée et utilisée à des fins biologiques.

IV.1.2. Mise en évidence et quantité de DOTA greffée

La quantité du DOTA sur les amines libres de l'APTES, déterminée par ATG, est de 2,1 DOTA.nm⁻² correspondant à un taux deux fois inférieur à celui de l'APTES total à la surface des tubes. Ce qui est largement nécessaire pour pouvoir réaliser la complexation de l'¹¹¹In par la suite (Tableau 13 et Figure 85).

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONT ^(*)
TiONts	175	2,8	18	10,6 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	160	10,3	58	5,3 (±0,5) NH ₂	7	29 000
TiONts-PEG ₃₀₀₀	165	15,0	3073	0,060 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	6	330
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	150	20,9	1022	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX-DOTA	155	36,1	404	2,1 DOTA	1	11 500

Tableau 13 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

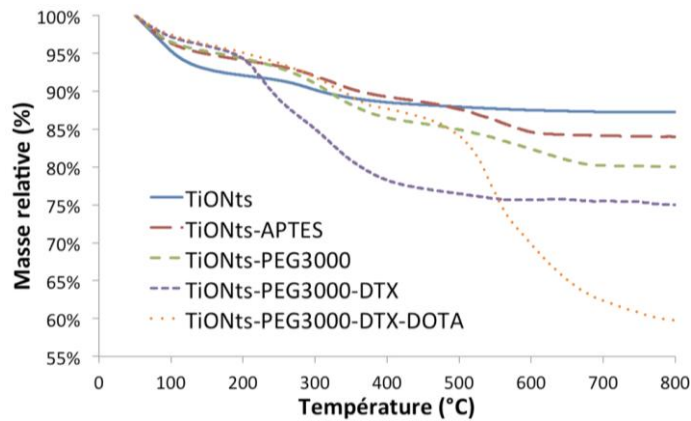


Figure 85 : Courbes ATG des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-PEG₃₀₀₀, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

Au pH physiologique, les valeurs du potentiel zêta des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA sont similaires (Figure 86a). Cependant, le PIE est décalé vers des pH plus élevés en raison de la présence des groupes carboxyles du DOTA (PIE_{TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA} = 5,3). Après 45 min dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4), les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA sont suffisamment stables même s'ils le sont moins qu'à l'issue du précédent greffage (Figure 86b). Cependant, la suspension du nanohybride dans les conditions physiologiques présente une stabilité colloïdale suffisante dans le temps pour les radiomarquer puis les injecter *in vivo*.

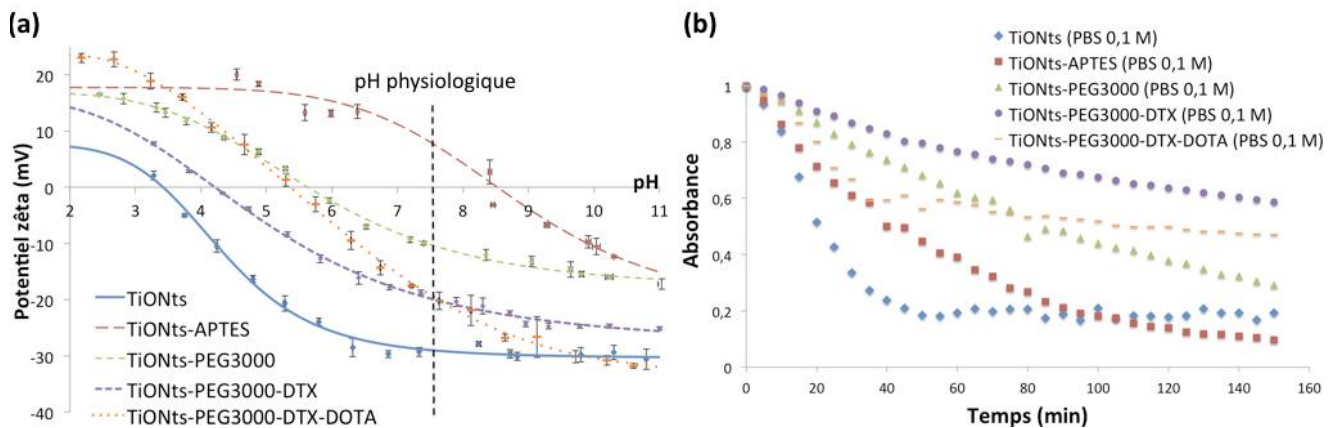


Figure 86 : (a) Zétamétrie dans du NaCl (10⁻² M) (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique) et (b) mesures d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm des TiONts et des différentes fonctionnalisations des TiONts.

IV.2. Radiomarquage par l'indium 111 des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA

Le radiomarquage par l'indium 111 a été effectué sur la plateforme SPECT du Centre Georges-François Leclerc (CGFL) à Dijon (avec l'aide du Dr. Bertrand Collin) dans les conditions de protection optimale contre les radiations ionisantes.

L'indium 111 ($t_{1/2} = 67,3$ h) est sous forme de chlorure d'indium (InCl_3) dans une solution d'acide chlorhydrique. Les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA sont dispersés dans une solution d'acétate d'ammonium (0,1 M) à pH 5,8. La solution d'indium libre correspondant à 15 MBq ($^{111}\text{In}^{3+}$; 8,7 pmol; pH = 1) est ajoutée à la suspension contenant 100 μg de nanohybride pour atteindre un pH de 3,5 afin d'optimiser les conditions de radiomarquage [269]. La suspension est agitée à l'aide d'un thermomixeur à 100°C et à 1000 tr/min durant 1 heure. Après incubation, les nanohybrides radiomarqués par l' ^{111}In (TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA- ^{111}In) sont mis en présence de 5 μL de DTPA à 20 mM solubilisé dans l'acétate d'ammonium (0,1 M) pendant 15 min, pour piéger les ions In^{3+} qui ne sont pas chélatés (le DTPA présente une meilleure affinité avec l' In^{3+} que le DOTA : $p_{\text{DTPA}}[\text{In}^{3+}] = 24,9$; $p_{\text{DOTA}}[\text{In}^{3+}] = 17,8$ [124]). Ensuite, le DTPA- ^{111}In est éliminé par centrifugation (14 000 x g pendant 10 min) *via* des microtubes possédant une membrane poreuse de 30 kDa qui retient le nanohybride radiomarqué. Enfin, la formulation est récupérée dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) prête à être injectée dans les souris pour les études *in vivo*.

Avant l'injection, le contrôle du radiomarquage et la pureté radiochimique du nanohybride sont vérifiés par ITLC (Instant Thin Layer Chromatographies) (Figure 87). Le rendement du radiomarquage est de l'ordre de 98% avec une pureté chimique supérieure à 99,9% [124, 156].

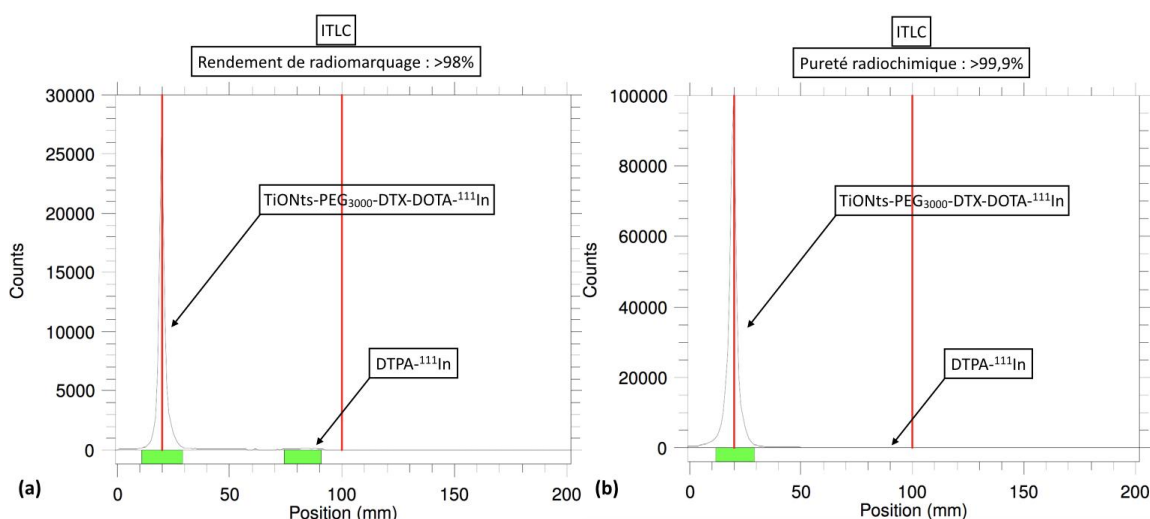


Figure 87 : Radiochromatogrammes établis par ITLC (a) après ajout du DTPA et (b) après purification.

IV.3. Conclusions

La stratégie utilisée pour greffer l'agent thérapeutique et l'agent chélatant sur la surface des TiONts s'est avérée concluante. Le nanohybride multifonctionnel obtenu présente une stabilité colloïdale suffisante dans les conditions physiologiques pour pouvoir réaliser les études *in vitro* et *in vivo*.

vivo. Différentes techniques de caractérisations ont prouvé la présence à la fois du DTX et de l'agent chélatant à la surface des TiONts même s'il n'est pas impossible qu'une partie du DTX-PMPI soient adsorbés ou accroché *via* des liaisons covalentes. Plusieurs étapes de purifications optimisées sur une semaine ont aussi prouvé que le DTX ne se désorbait pas et restait à la surface des TiONts. Afin de valider biologiquement le nanohybride, il faut l'évaluer biologiquement sur des modèles de cancer de prostate lors d'études *in vitro* et *in vivo*.

V. Études *in vitro* et précliniques afin d'évaluer le nanohybride sur des tumeurs de prostate

Les résultats biologiques relatifs à l'évaluation du nanohybride final font l'objet d'une publication en 2017 intitulée « Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model » publiée dans le journal *International Journal of Nanomedicine*.

V.1. Tests de cytotoxicité du DTX-PMPI et du nanohybride final sur des lignées cellulaires de cancer de prostate

Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur deux modèles de cancer de prostate en utilisant des tests MTS (Promega Corporation, Madison, USA) après 96 h d'incubation (cellules 22Rv1 et PC-3). Le DTX est utilisé comme témoin positif. Les lignées cellulaires 22Rv1 et PC-3 sont des cellules de cancer de prostate hormono-résistantes. Les cellules 22Rv1 sont des cellules androgéno-dépendantes alors que les cellules PC-3 sont androgéno-indépendante. D'un côté, les cellules épithéliales de carcinome de prostate humaine 22Rv1 (American Type culture Collection, Manassas, Va) sont mises en culture dans le milieu RPMI-1640 avec 10% de FBS. De l'autre côté, les cellules d'adénocarcinome de prostate humaine PC-3 (American Type culture Collection, Manassas, Va) sont cultivées dans le MEM de Eagle modifié avec 10% de FBS. Toutes les cellules sont maintenues à 37°C avec 5% de CO₂.

L'activité cytotoxique du DTX-PMPI et celle du nanohybride sont alors évaluées pour les comparer au DTX seul. Ces études *in vitro* permettent de vérifier que l'activité cytotoxique du DTX est toujours active sur les deux modèles de cancer de prostate après sa modification par le PMPI et lorsqu'il est greffé sur le nanohybride.

V.1.1. Lignée cellulaire 22Rv1

Les tests de cytotoxicité sur les cellules 22Rv1 sont réalisés deux fois (tous deux indépendants) avec une gamme croissante de DTX (0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) pour le DTX libre, le DTX-PMPI, les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (100 nM de DTX

correspond à une quantité de 0,35 μg de TiONts par puits soit 1,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ établie par analyse ATG). La courbe de référence TiONts-PEG₃₀₀₀ (sans DTX) correspond à la quantité de TiONts-PEG₃₀₀₀ présente dans le nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX pour une concentration donnée en DTX. 10 μL de chaque échantillon étudié contenant la bonne concentration en DTX sont ajoutés dans les puits contenant 190 μL de milieu de culture pour les mettre en contact des cellules tumorales. Après 96 h d'incubation, la cytotoxicité des différents composés est évaluée en utilisant le test MTS en accord avec l'étude réalisée par Mirjolet *et al.* [23]. Les résultats sont révélés en utilisant une longueur d'onde d'absorption à 490 nm par rapport au groupe contrôle.

Les premiers résultats MTS sur les cellules cancéreuses de prostate humaines 22Rv1 (Figure 88) montrent que les TiONts-PEG₃₀₀₀ sans le DTX (courbe verte) ne présentent pas de cytotoxicité sur cette lignée cellulaire. Tandis qu'une activité cytotoxique attendue pour le DTX non modifié par le PMPI est observée (courbe noire), avec une concentration inhibitrice médiane (half-maximum inhibitory concentration, IC_{50}^{16}) de 3,5 nM en DTX. Cette valeur est en accord avec celle retrouvée dans la littérature [270]. La cytotoxicité du DTX-PMPI (courbe bleu) démontre que l'activation du DTX par le PMPI diminue son activité cytotoxique ($\text{IC}_{50} = 18 \text{ nM}$), probablement en raison des liaisons covalentes formées entre ces deux molécules. Malgré tout, le DTX-PMPI est toujours actif, condition nécessaire à la suite de la stratégie mis en œuvre. Finalement, même si la cytotoxicité du nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (courbe violette), qui inclut l'espaceur PEG₃₀₀₀, est plus faible que le DTX seul ou le DTX-PMPI, le DTX garde toujours une activité cytotoxique lorsqu'il est greffé sur le nanohybride ($\text{IC}_{50} = 390 \text{ nM}$).

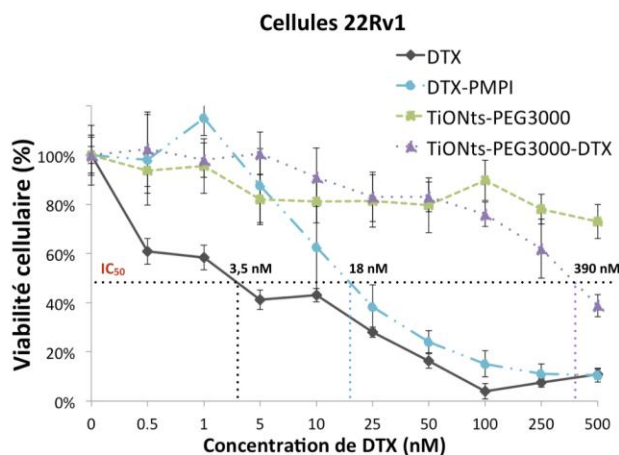


Figure 88 : Courbes de survie des cellules cancéreuses de tumeur de prostate 22Rv1 avec le DTX, DTX-PMPI, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX.

V.1.2. Lignée cellulaire PC-3

La cytotoxicité du DTX des différents échantillons est aussi évaluée sur les cellules PC-3. Les tests de cytotoxicité sont réalisés exactement dans les mêmes conditions que l'étude précédente réalisée sur la lignée cellulaire 22Rv1. Une gamme croissante de DTX (0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) est utilisée pour évaluer le DTX libre, le DTX-PMPI, les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les

¹⁶ L' IC_{50} est une mesure quantitative de l'efficacité d'un médicament en indiquant la quantité nécessaire pour inhiber la moitié d'un processus biologique, ici la viabilité des cellules cancéreuses de prostate. Elle permet notamment de pouvoir comparer l'efficacité pharmacologique de deux médicaments sur un même processus biologique.

TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX. Une fois de plus, la courbe de référence TiONts-PEG₃₀₀₀ (sans DTX) correspond à la quantité de TiONts-PEG₃₀₀₀ présente dans le nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX pour une concentration donnée en DTX.

Les résultats MTS sont très similaires sur la lignée cellulaire PC-3 (Figure 89) par rapport à la lignée cellulaire 22Rv1 (Figure 88). En effet, le DTX seul présente l'activité cytotoxique la plus élevée avec un IC₅₀ de 2,2 nM. Cette valeur est en accord avec celle trouvée dans la littérature [270]. De plus, le DTX activé par le PMPI induit une diminution de la cytotoxicité menant à un IC₅₀ de 18 nM. Finalement, les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX montrent l'activité la plus faible (IC₅₀ = 360 nM) comme c'était le cas avec les cellules 22Rv1 (IC₅₀ = 390 nM).

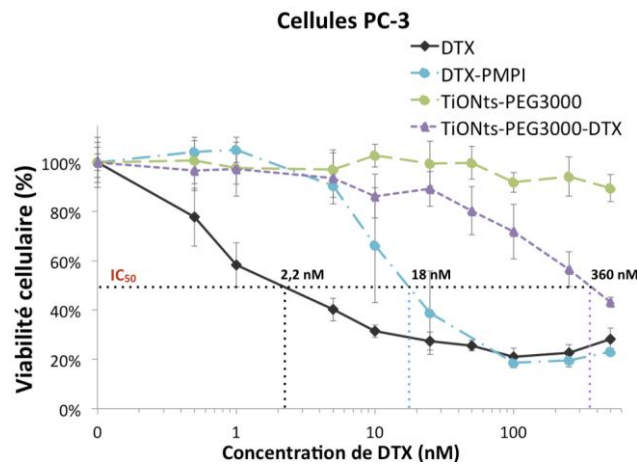


Figure 89 : Courbes de survie des cellules cancéreuses de tumeur de prostate PC-3 avec le DTX, DTX-PMPI, TiONts-PEG₃₀₀₀ et TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX.

V.1.3. Conclusions

Ces résultats très concluants ont montré que le DTX garde son activité cytotoxique lorsqu'il est greffé sur le nanohybride sur les deux lignées cancéreuses de prostate même s'il est moins actif. Les études *in vivo* de ce nanohybride se sont basées sur l'hypothèse que les TiONts devraient garder le DTX greffé plus longtemps à l'intérieur de la tumeur et de permettre d'avoir une activité cytotoxique sur une plus longue période comparée au DTX seul. Par ailleurs, le nanohybride sera injecté en IT pour concentrer au maximum l'agent thérapeutique dans la tumeur et avoir le maximum d'activité cytotoxique. À partir de ces résultats, il est nécessaire de réaliser des essais précliniques afin d'évaluer le nanohybride *in vivo*. Cependant, des modifications d'espaceur entre les TiONts et le DTX seront envisagées au cours de ces travaux de thèse pour essayer d'améliorer l'activité du nanohybride et faciliter les interactions entre le DTX et la tubuline (voir Chapitre 3. II.2.4.3.).

V.2. Études *in vivo* sur des souris Swiss nude mâles après injection intratumorale des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX(-DOTA-¹¹¹In) (PC-3)

Les études *in vivo* ont été effectuées sur des souris Swiss nude mâles âgées de 6 semaines (Charles River, France) avec des tumeurs xénotransplantées de cellules cancéreuses de prostate PC-3.

Cinq semaines avant les expériences, les tumeurs ont été administrés par voie sous-cutanée en injectant $10 \cdot 10^6$ cellules PC-3 dans 200 μ L de MEM contenant du Matrigel (50 : 50, V : V, BD Biosciences) dans le flanc droit de la souris. Les cellules cancéreuses PC-3 sont implantées 48 h après une irradiation de très courte durée du corps entier avec une source gamma (2 Gy, ^{60}Co , BioMep, France) afin d'améliorer à la fois le développement de la tumeur et l'homogénéité de la croissance. Les souris avec les tumeurs PC-3 ont été produites par Oncodesign (France).

Les souris sont maintenues à l'écart de tout organisme pathogène et toutes les expériences suivent le cahier des charges de la *European Federation of Animal Science*. De plus, toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne (France).

V.2.1. Étude de biodistribution du nanohybride radiomarqué par l' ^{111}In

50 μ L de $\text{TiONts-PEG}_{3000}\text{-DTX-DOTA-}^{111}\text{In}$ contenant une activité de 5 MBq sont injectés à plusieurs endroits dans la tumeur. L'étude de biodistribution *in vivo*, allant de 1 h à 96 h après injection, est réalisée en utilisant l'imagerie nucléaire SPECT/CT (NanoSPECT/CT®, small animal imaging tomographic gamma-camera, Bioscan Inc). Sept jours après l'injection, les animaux sont sacrifiés. Plusieurs organes comme la tumeur, les poumons, le foie, les reins et la vessie sont collectés et la radioactivité de ces échantillons est mesurée *ex vivo* 7 jours après l'injection IT via un comptage gamma (Wizard 1480, Perkin Elmer).

L'imagerie SPECT/CT a montré qu'une heure après administration IT, 94% de la dose administrée du nanohybride radiomarqué est retenue à l'intérieur de la tumeur, comparée à 3,8% pour le $\text{DOTA-}^{111}\text{In}$ (Figure 90 et Figure 91). 24 h après l'injection, l'activité des nanohybrides est principalement détectée dans la tumeur et en plus faible quantité dans le foie (de 4,4% à 24 h jusqu'à 5,2% à 96 h) ainsi que les reins (3,1% à 24 h jusqu'à 4,1% à 96 h). Globalement, une moyenne de 72,9% des $\text{TiONts-PEG}_{3000}\text{-DTX-DOTA-}^{111}\text{In}$ est maintenue à l'intérieur de la tumeur 96 h après l'injection IT tandis que le $\text{DOTA-}^{111}\text{In}$ est totalement éliminé 3 h après injection. La quantité de nanohybride retrouvée dans les poumons est inférieure à 1,2% de la dose administrée.

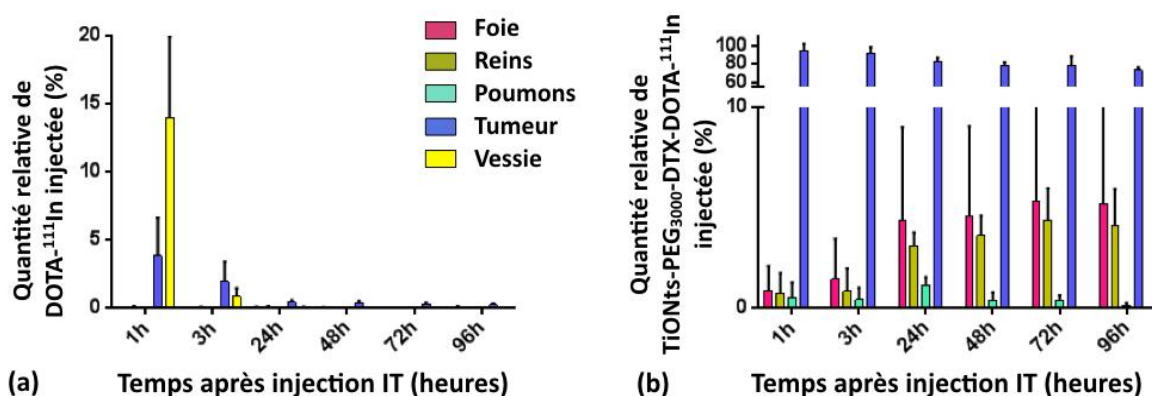


Figure 90 : Analyses de la cinétique de biodistribution pour différents organes tels que la tumeur, le foie, les reins, les poumons et la vessie (exprimée en fonction du pourcentage de l'activité de ^{111}In injectée, 5 MBq) en prenant compte de la diminution de l'activité d' ^{111}In après l'injection du (a) $\text{DOTA-}^{111}\text{In}$ et (b) $\text{TiONts-PEG}_{3000}\text{-DTX-DOTA-}^{111}\text{In}$ à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

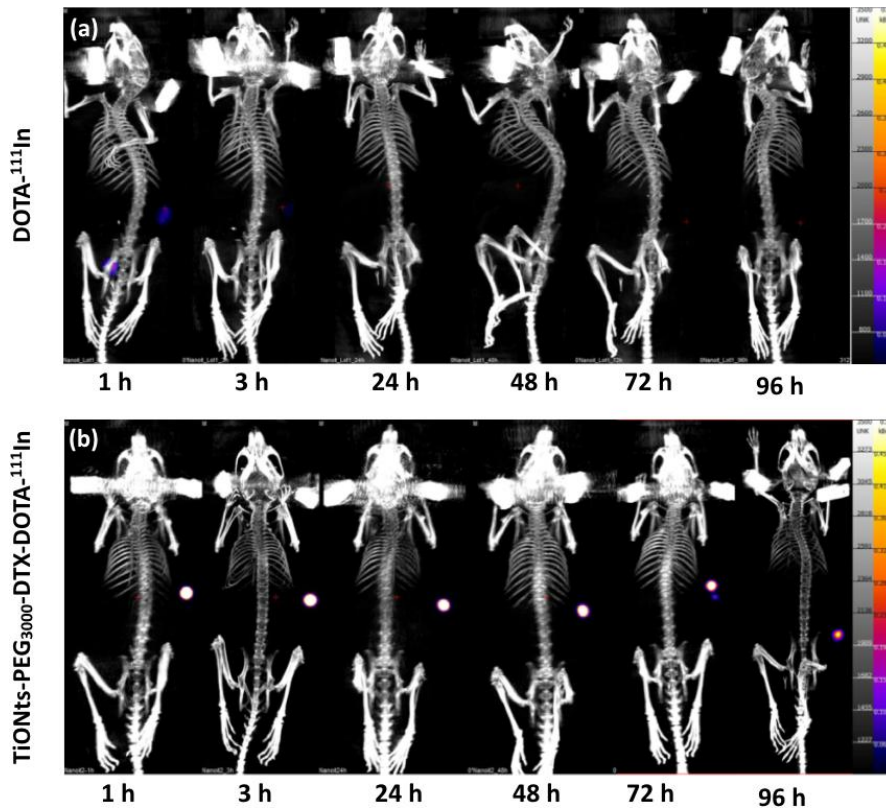


Figure 91 : Imagerie nucléaire SPECT/CT réalisée sur des souris Swiss nude mâle après injection IT du (a) DOTA-¹¹¹In et (b) TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA-¹¹¹In à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h (exprimée en fonction de l'activité de ¹¹¹In injectée (5 MBq) et en prenant compte de la diminution de l'activité de ¹¹¹In après l'injection).

Sept jours après l'injection IT, le comptage gamma démontre que moins de 30% du nanohybride a quitté la tumeur pour s'accumuler préférentiellement dans la vessie avant son élimination (entre 16% et 17%) (Figure 92). Une petite quantité est détectée dans d'autres organes comme le foie (6,2%), les reins (3,9%) et les poumons (0,8%). De plus, aucune trace de nanohybride n'est retrouvée dans le cœur ou dans les os. Les TiONts remplissent donc bien leur rôle de nanovecteurs en concentrant l'agent thérapeutique et l'agent chélatant dans les cellules cancéreuses avec plus de 70% du nanohybride encore présent dans la tumeur après 7 jours.

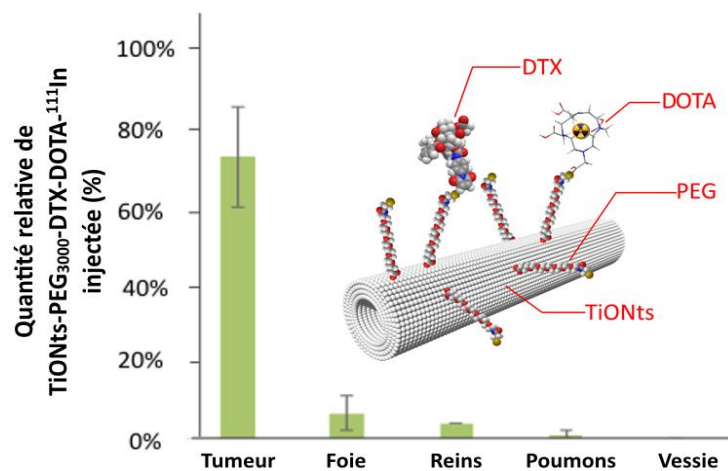


Figure 92 : Biodistribution du nanohybride dans différents organes disséqués tels que la tumeur, le foie, les reins, les poumons et la vessie en détectant la radioactivité via un comptage gamma 7 jours après injection IT.

V.2.2. Étude de l'évolution de la croissance tumorale de prostate sans et avec un traitement radiothérapeutique

Lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral moyen de 200 mm³, les souris sont aléatoirement réparties selon leur volume de tumeur individuel dans huit groupes (groupe contrôle, DTX seul, TiONts nus, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX ; sans ou avec RT) composés chacun de sept souris en utilisant le logiciel Vivo manager® (Biosystemes, France). Afin d'évaluer l'effet bénéfique du nanohybride combiné à la radiothérapie (RT), 50 µL de TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (contenant 12 µM de DTX greffé sur 10 µg de TiONts, correspondant à 60 µmol de DTX / g de TiONts déterminé par ATG, et le rapport massique est de 25 µg de DTX / kg de souris pour une souris de 20 g) sont injectés dans les tumeurs. Le volume injecté (50 µL) pour les groupes du DTX et des TiONts (sans et avec RT) contient les mêmes concentrations respectives en DTX et en TiONts présent sur les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX. Après 24 h d'incubation, les tumeurs sont irradiées durant trois jours consécutifs avec une dose quotidienne de 4 Gy pendant 96 jours en utilisant une source d'iridium de curiethérapie (Microselectron HDR, ELEKTA).

Le comportement et l'état de santé des souris sont surveillés deux fois par semaine et le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à une reprise de croissance tumorale (jusqu'à un volume maximum de 2000 mm³). De plus, le volume tumoral est comparé entre les différents groupes par une méthode non paramétrique de Mann Whitney¹⁷.

Il faut savoir que cette étude *in vivo* sur le suivi de la croissance tumorale est réalisée dans le but d'évaluer l'effet significatif de notre nanohybride (sans et avec RT) en observant un retard de croissance tumorale et non dans le but de détruire les tumeurs.

L'analyse MET montre que durant l'administration d'une radiothérapie (RT) (24 h après injection IT), les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sont principalement localisés dans les cellules et plus particulièrement dans le cytoplasme (Figure 93). L'évolution des volumes tumoraux est suivie durant plus de 3 mois sur des souris Swiss nude mâles avec des tumeurs de prostate humaine PC-3 greffés sur le flanc droit (Figure 94). Les groupes tels que le témoin contrôle, placebo (composé seulement du sérum physiologique), DTX seul et celui des TiONts nus sont comparables. Le suivi de la croissance tumorale de chacun de ses groupes est indispensable pour évaluer l'efficacité de notre nanohybride sans et avec RT. Tous les groupes ont présenté un retard de croissance tumorale lors du traitement RT par rapport aux groupes sans la RT.

¹⁷ La méthode de Mann Whitney est un test statistique non paramétrique qui permet de tester l'hypothèse selon laquelle la distribution des données est la même dans deux groupes.

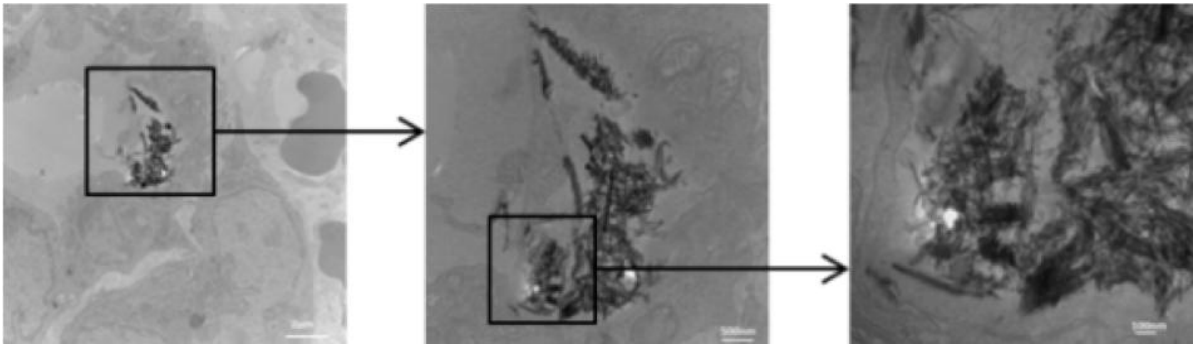


Figure 93 : Images MET montrant la localisation intracellulaire des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX 24 h après injection IT dans la tumeur PC-3 d'une souris.

De façon intéressante, les souris traitées avec les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sans la RT montrent un retard de croissance tumorale pour atteindre un volume de 1 000 mm³ comparé aux souris ayant reçu le DTX seul sans RT (40,5 jours pour le nanohybride contre 30,8 jours pour le DTX) (Figure 94). De plus, les courbes des groupes comprenant le DTX seul, le placebo et les TiONts nus en présence de RT se chevauchent et ne présentent pas d'effets significativement différents comme ce fut le cas sans la RT. Leurs retards de croissance tumorale par rapport aux traitements sans RT sont finalement dus à l'efficacité des radiations. Cependant, le traitement avec le nanohybride, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX, avec la RT induit le plus faible retard de croissance significatif pour atteindre un volume de 1 000 mm³ par rapport au DTX seul avec la RT (73,7 jours pour le nanohybride contre 56 jours pour le DTX) ($p = 0,013$ est une statistique montrant que le retard est significatif d'après la méthode de Mann Whitney). D'après l'action combinée des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX avec la RT, les résultats permettent de conclure que le nanohybride et la radiothérapie induisent un effet additif.

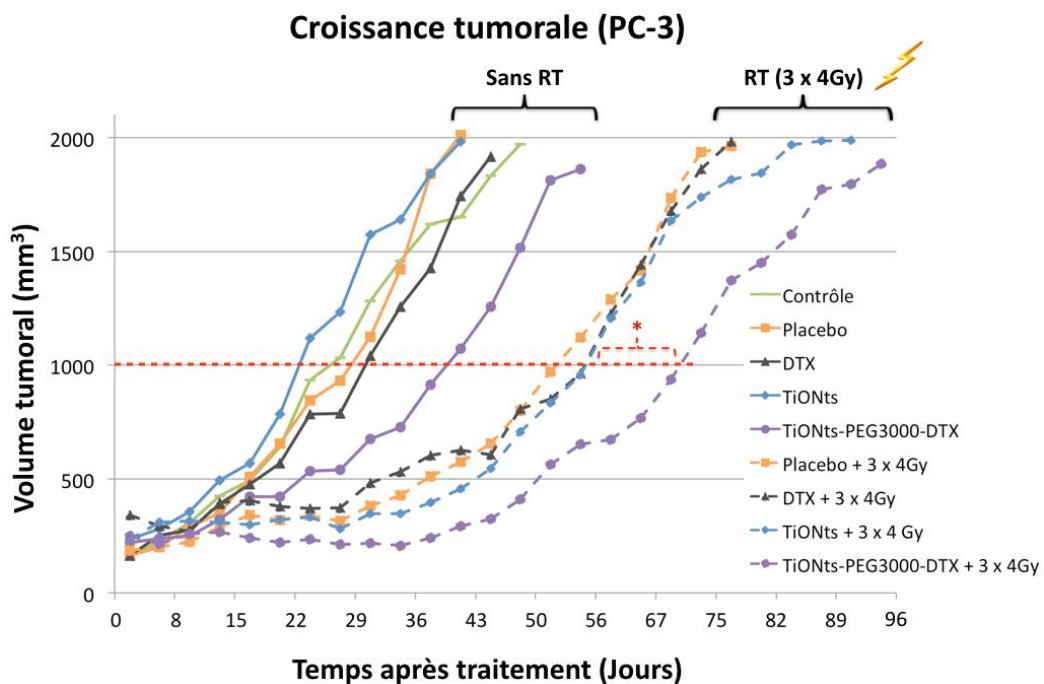


Figure 94 : Courbes de croissance des volumes tumoraux après avoir injectés le placebo, le DTX seul, les TiONts nus et les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sans et avec radiothérapie (RT) de 3 fractions quotidiennes de 4 Gy pendant 96 jours. Le traitement RT a débuté 24 h après l'injection IT dans les tumeurs xénotransplantées PC-3 (moyenne de 7 souris par groupe de traitement, 8 groupes au total). * $p = 0,013$ (TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX + RT vs DTX + RT ou TiONts + RT) est le résultat de la comparaison effectuée en utilisant la méthode non paramétrique de Mann Whitney.

Ce retard de croissance tumoral semble très intéressant parce que seulement 12 μ M de DTX sont injectés, qui est équivalent à 25 μ g/kg. Ces quantités sont 200 fois plus faibles que celles utilisées dans d'autres études (par exemple 5 mg/kg pour des nanoparticules polymériques contenant le DTX) [271]. De plus, 12 μ M de DTX correspondraient à une dose de 75 μ g/m² (pour une souris de 20 g avec une surface corporelle de 66 cm²) en comparaison des 75 mg/m² pour l'injection IV de DTX chez l'homme.

Concernant les courbes avec les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (+RT) et le DTX seul (+RT), aucune différence évidente n'a pu être observée pendant les 40 premiers jours après le traitement. En effet, le rayonnement ionisant peut provoquer la mort instantanée mais aussi retarder la mort (mort clonogénique). Cette mort est induite après l'activation d'un mécanisme de réparation de l'ADN peu efficace. Dans les situations cliniques, les effets de la RT peuvent être observés plusieurs semaines après la fin du traitement.

Ces résultats démontrent que le traitement avec les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX est le plus efficace. Le DTX semble bien avoir été concentré dans la tumeur avec une efficacité accrue et avérée, alors même qu'il est apparu moins cytotoxique une fois greffé à la surface des TiONts. Cette tendance peut s'expliquer notamment par le maintien du DTX dans les cellules tumorales grâce aux TiONts alors que le DTX seul, qui est comparable au DOTA-¹¹¹In utilisé dans l'étude de biodistribution, est rapidement éliminé après la première injection IT. Ce qui peut s'expliquer par le phénomène de résistance aux multimédicaments, qui provoque l'efflux de la molécule de DTX (*via* des canaux transmembranaires en glycoprotéine P [35, 272]). Les TiONts empêcheraient cet effet, au moins en raison de leur taille (170 nm de long).

V.3. Conclusions

Les tests biologiques *in vitro* ont permis de mettre en évidence que le nanohybride en présence de DTX a gardé une activité cytotoxique sur les deux lignées cancéreuses de prostate (cellules 22Rv1 et PC-3) même si le DTX est moins actif. De plus, l'administration *in vivo* du nanohybride directement dans la tumeur de prostate PC-3 a permis de garder le DTX plus longtemps dans la prostate, en améliorant son efficacité dans le temps sans qu'il puisse diffuser dans l'organisme et potentiellement éviter ainsi les effets secondaires du taxane. En effet, le traitement en présence du nanohybride sans et avec radiothérapie était plus efficace que le DTX seul en comparant les différentes évolutions des volumes tumoraux après plus de 3 mois d'études.

VI. Conclusions

Les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés avec succès pour former un nanohybride multifonctionnel porteur d'un agent thérapeutique et d'un agent chélatant, en utilisant un processus original de synthèse étape par étape (les caractéristiques de chaque greffage sur les TiONts sont rappelées dans le Tableau 14 et le Tableau 15). Cette stratégie a été choisie afin de contrôler au mieux la

chimie et la quantité de chaque greffage pour enfin, connaître le taux de docétaxel à la surface des TiONts. Le succès de chaque étape de greffage a été prouvé par plusieurs techniques de caractérisations et les TiONts modifiés ont montré une amélioration significative de leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Cette étude a aussi montré les possibles applications théranostiques par le greffage du DTX et du DOTA sur la surface des TiONts. Les tests biologiques ont permis d'évaluer et de valider ce nouveau nanohybride qui est retenu dans la tumeur à plus de 70%, 7 jours après son injection en IT et qui a permis d'améliorer l'efficacité radiothérapeutique. Le maintien du DTX dans la tumeur, à travers leur greffage sur les TiONts, limite leur diffusion dans l'organisme et évite également potentiellement les effets secondaires causés par les taxanes. Le but de cette étude était d'évaluer et de valoriser le potentiel du nanohybride développé dans ce chapitre sur des tumeurs de prostate xéno-greffées sur les flancs d'un modèle murin, après injection en IT, par rapport à l'agent thérapeutique seul (DTX). Notons qu'en aucun cas, l'objectif n'était de détruite totalement les cellules tumorales à ce niveau de l'étude. La reprise de croissance tumorale est même nécessaire pour apprécier la significativité de l'écart entre les résultats du nanohybride sans et avec radiothérapie. Finalement, le développement de ce nanohybride pourrait être associé à la méthode de curiethérapie pour les patients atteints du cancer de la prostate afin d'améliorer les traitements actuels [273].

Synthèses	Agents de couplage	Rapport molaire	Milieu réactionnel	pH de greffage	Température de greffage (°C)	Temps de réaction	Agitation magnétique (tr/min)	Purifications
TiONts-APTES	-	1 OH 10 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	9 - 10	25	24 h	400	* Évaporateur rotatif (250 mbar ; 80°C) * Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Activation du PEG ₃₀₀₀	EDC/NHS	100 EDC 200 NHS 1 COOH	MES 0,1 M	5	25	30 min	400	-
TiONts-PEG ₃₀₀₀	-	3 NH ₂ 1 COOH	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Activation du DTX par le PMPI	PMPI	1 DTX 4 PMPI	Tampon borate 0,1M	8,5	25	24 h	400	* Dialyse (0,5 - 1 kDa) * Lyophilisation
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	-	1 PEG ₃₀₀₀ TCEP en excès 20 DTX-PMPI	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX-DOTA	NHS	2 NH ₂ 3 DOTA	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation

Tableau 14 : Procédures expérimentales des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre.

	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	-	3,3	-28	non	10,6 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	8,5	+10	non	5,3 (±0,5) APTES	7	29 000
TiONts-PEG ₃₀₀₀	EDC/NHS	5,7	-10	~ oui	0,060 (±0,001) PEG ₃₀₀₀	6	330
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	PMPI	4,2	-20	oui	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX-DOTA	NHS	5,3	-20	oui	2,1 DOTA	1	11 200
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -Boc	EDC/NHS	n.d.	n.d.	n.d.	0,060 (±0,001) PEG ₃₀₀₀ -Boc	2	330
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -Boc + DTX-PMPI	PMPI	n.d.	n.d.	n.d.	0,13 (±0,01) DTX-PMPI	2	710

Tableau 15 : Caractéristiques des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

Fort de ces résultats qui font l'objet de deux publications (Loiseau *et al.* (2017) et Mirjolet *et al.* (2017)), la suite de ces travaux de thèse est principalement consacrée à l'amélioration de la stabilité colloïdale du nanohybride dans les conditions physiologiques par diverses stratégies. Il s'agira également d'augmenter l'effet radiothérapeutique du traitement. L'amélioration de la stabilité colloïdale peut être réalisée à travers différentes pré-fonctionnalisations, autres que l'APTES et le PEG₃₀₀₀ telles que des catéchols, phosphonates ou d'autres alcoxy-silanes ou encore, en faisant varier les longueurs de chaînes du polyéthylène glycol ($n = 5\ 000$ ou $10\ 000$, HS-PEG_n-COOH) (voir Chapitre 3.). Quant à l'effet thérapeutique, l'action combinée du nanohybride en présence de la radiothérapie peut être augmentée en améliorant le taux de greffage du DTX à la surface des TiONts ou en greffant des nanoparticules d'or (AuNPs, bien connues pour leur effet radiosensibilisant) [19] (voir Chapitre 4.).

**Chapitre 3. Fonctionnalisation
des nanotubes de titanate par
divers agents stabilisants en vue
d'améliorer leur stabilité
colloïdale dans les conditions
physiologiques**

Pour des applications biomédicales, certaines exigences sont nécessaires telles qu'une bonne biocompatibilité, une stabilité colloïdale à long-terme dans les conditions physiologiques et une interaction non spécifique avec le corps humain [274]. C'est pourquoi, dans ce chapitre, d'autres stratégies de greffage sont envisagées, en modifiant les agents électrostatiques et stériques utilisés, afin d'améliorer la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des TiONts, par rapport aux résultats obtenus dans le Chapitre 2. avec les TiONts-APTES et les TiONts-PEG₃₀₀₀. Cependant, il est nécessaire de garder le même cahier des charges, ainsi l'objectif est toujours d'avoir des fonctions réactives en surface des TiONts afin de greffer le DTX modifié par le PMPI.

La première partie de ce chapitre est dédiée à la modification de surface des TiONts nus et à l'amélioration de leur stabilité colloïdale par rapport aux résultats obtenus dans le Chapitre 2. avec les TiONts-APTES. Les molécules envisagées sont des alcoxysilanes, des catéchols ou encore des phosphonates, qui forment des couches plus stables que l'APTES sur les substrats inorganiques [88, 275, 276]. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'influence de la longueur de chaîne du polymère (HS-PEG_n-COOH ; n = 3 000, 5 000, 10 000) sur son taux de greffage à la surface des nanotubes et sur leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Les propriétés de surface de ces nanohybrides sont comparées pour deux protocoles de greffages de ces polymères : une méthode aqueuse *via* l'association EDC/NHS et une méthode organique *via* un agent de couplage peptidique, le PyBOP. Dans cette partie, des tests biologiques *in vitro* sont réalisés afin d'évaluer l'influence de la longueur de chaîne carbonée du polymère sur les interactions entre le DTX-PMPI greffé sur les TiONts-PEG_n et les cellules cancéreuses de prostate humaine PC-3.

I. Pré-fonctionnalisation des nanotubes de titanate par différentes molécules

Les nanoparticules d'oxydes métalliques possèdent des caractéristiques uniques comparées aux matériaux massifs. La modification de surface des nanoparticules est un défi chimique de taille. En effet, de très nombreux travaux ont étudié plusieurs stratégies dans le but d'obtenir une excellente stabilité colloïdale pour des applications biomédicales [190] et une surface réactive pour de futurs greffages (molécule active, agent de ciblage *etc.*) [36]. La stabilité colloïdale des nanomatériaux peut différer énormément pour une même pré-fonctionnalisation en fonction du milieu et de l'application visée [88]. Par ailleurs, les méthodes de modifications de surface varient selon les oxydes [277].

Dans cette partie, diverses possibilités sont discutées pour améliorer la stabilité colloïdale des TiONts à travers divers ligands organiques de type électrostatiques (*i.e.* induisant des répulsions de type électrostatique entre les TiONts) et permettant également d'introduire des fonctionnalités complémentaires et des fonctions d'intérêts en vue de futurs greffages [88, 275]. C'est pour ce dernier point que dans la suite de ce chapitre, ces molécules seront appelées « agents de couplage ». Toutes ces modifications de surface ont pour objectif d'obtenir une fonctionnalisation robuste sur des TiONts par des liens covalents en formant des monocouches.

I.1. Choix des agents de couplage

Les agents de couplage présentés ici sont choisis en fonction de leur réactivité avec la surface des oxydes métalliques, et de leur capacité à former une monocouche robuste dans l'objectif d'améliorer la stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Parmi ces ligands organiques, cette partie s'est concentrée sur un alcoxyasilane, le *N*-(6-aminohexyl)aminomethyltriéthoxysilane), des catéchols (L-3,4-dihydroxyphénylalanine, l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique et la nitrodopamine) et des phosphonates (l'acide 6-phosphonohexanoïque, l'acide alendronique et un poly(éthylène) glycol hétérobifonctionnel de type (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂) devant tous conduire à des liens covalents stables avec la surface des oxydes (Figure 95). Certaines de ces molécules sont déjà étudiées comme stabilisateurs de nanoparticules et comme agents de couplage *via* divers groupes fonctionnels disponibles tandis que d'autres n'ont jamais été utilisées comme telles [88, 204, 276, 278-280]. Dans cette étude, ce sont surtout les fonctions carboxyles et amines qui sont exploitées [148, 280-282].

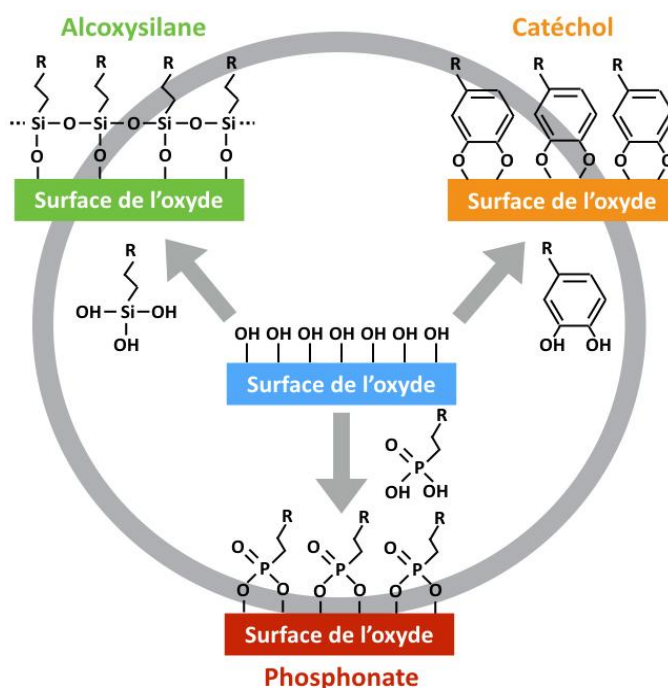


Figure 95 : Illustration des différentes stratégies de pré-fonctionnalisation à la surface des TiONts par un nouvel alcoxyasilane, des catéchols et des phosphonates (un seul mode de greffage est arbitrairement représenté).

Il est à noter qu'un nouveau lot de TiONts est utilisé dans ce chapitre mais qu'il présente les mêmes caractéristiques que le lot obtenu dans le Chapitre 2. , bien que le taux d'hydroxyles soit, ici, légèrement plus faible (10,2 OH.nm⁻² vs 10,6 OH.nm⁻²). Ce nouveau lot a été préparé dans le souci de couvrir tous les travaux de cette thèse, par homogénéisation des produits issus de trois synthèses (Chapitre 2. I.). Notons en effet que le chapitre 2 a été en partie réalisé durant mon stage de M2. Par ailleurs, le calcul des taux de greffage de chaque molécule à la surface des TiONts est réalisé à partir de la surface spécifique des TiONts nus ($S_{\text{BET}} = 174 \pm 1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$). En effet, la quantité de poudre obtenue après chaque nouveau greffage n'est pas suffisante pour mesurer la surface spécifique (cette mesure est très consommatrice et la poudre analysée ne peut pas être réutilisée) en plus des autres caractérisations et de la quantité nécessaire pour les nanohybrides intermédiaires.

I.2. Agents de couplage siloxaniques en vue d'améliorer la stabilité colloïdale

Suite aux résultats du chapitre précédent, cette partie est consacrée à l'optimisation du greffage de l'APTES sur les TiONts en formant une monocouche dans les conditions physiologiques. Le greffage d'un alcoxyasilane (le *N*-(6-aminohexyl) aminomethyltriéthoxysilane, nommé AHAMTES) est aussi décrit. En effet, la température, le milieu de synthèse, la concentration et la nature de l'aminosilane peuvent jouer un rôle important sur les caractéristiques finales de la couche formée et sur les propriétés des nanohybrides découlant de ces greffages [253].

I.2.1. Tentative d'optimisation du greffage de l'APTES sur les TiONts

L'objectif est ici de former une monocouche d'APTES sur les TiONts en optimisant les conditions de synthèse afin de favoriser à la fois une cinétique rapide pour l'hydrolyse de l'APTES (formation des silanols) et une cinétique lente pour l'oligomérisation des silanols (Chapitre 2. II.1.1.1.). Ainsi, le taux d'hydrolyse est plus faible à des pH avoisinant 7 pour les alcoxyasilanes. Alors que la cinétique d'oligomérisation est minimale pour des pH se situant aux alentours de 4 [132]. Ainsi, la gamme de pH optimale est comprise entre 5 et 6 pour garantir un bon compromis. Toutefois, un pH égal à 5 est préféré pour maximiser l'état de dispersion des TiONts nus (voir Figure 48, Chapitre 2. I.2.3.) afin de favoriser un greffage homogène sur tous les tubes. De plus, la quantité d'APTES engagée doit être contrôlée pour éviter une surabondance d'aminosilane favorisant la formation de multicouches. Enfin, l'influence de la température a un fort impact sur la cinétique de réaction. En effet, une élévation de la température favorise la condensation du polysiloxane et la vitesse de réaction à la surface des TiONts [254]. De ce fait, la température est cette fois-ci apportée au cours de la synthèse (chauffage à reflux) et non plus post-synthèse par évaporateur rotatif (voir Chapitre 2. II.1.1.2.).

I.2.1.1. Optimisation du protocole de synthèse de l'APTES

La suspension de TiONts est dispersée dans un volume eau/éthanol 1 : 1 (V : V) puis le pH est ajusté à 5 à l'aide d'une solution de HCl à 0,1 M. La concentration obtenue est de 3 mg.mL⁻¹. D'après les travaux de Pontón [132], la quantité d'APTES qui doit être engagée pour former une monocouche est estimée à partir de l'Équation 5 :

$$X = \left(\frac{A}{W} \right) \times f$$

Avec : X : Quantité d'APTES estimée pour avoir une monocouche à la surface des nanoparticules (g)
 A : Surface spécifique des nanoparticules (m².g⁻¹)
 W : Surface de mouillabilité d'un ligand (APTES : 353 m².g⁻¹)
 f : Quantité de nanoparticules (ici, les TiONts) à silaniser (g)

Équation 5 : Relation pour estimer la quantité d'APTES à engager pour former une monocouche sur les nanoparticules. D'après [132].

Dans notre cas, cette équation donne un rapport molaire de 1 APTES pour 1,15 OH à la surface des nanotubes (le taux d'hydroxyles est déterminé par l'ATG, voir Chapitre 2. I.2.). Malgré tout, le facteur choisi pour la nouvelle synthèse est fixé à 3 APTES pour 1 OH tandis que le taux d'APTES était 10 fois supérieur lors de son greffage sur les tubes au cours de la précédente étude (Tableau 16) (voir Chapitre 2. II.1.1.2.). Ce facteur diffère de l'Équation 5 pour compenser les éventuelles

dégradations et les réactions d'hydrolyse dans le flacon commercial d'APTÉS (ce sont des précautions prises en raison des nombreuses utilisations de l'APTÉS et des conditions de stockage : réfrigérateur, septum/N₂). De plus, ce rapport a pour but d'accélérer la formation de la monocouche d'aminosilane [18]. Le volume d'APTÉS est ajouté goutte à goutte dans la suspension de TiONts. Après avoir ajusté à nouveau le pH de la suspension à 5, le mélange des TiONts-APTÉS est ensuite chauffé à reflux (60°C) sous agitation magnétique (400 tr/min) pendant 5 heures.

La suspension est ensuite ultrafiltrée avec de l'eau ultrapure sur une membrane possédant un seuil de coupure de 100 kDa pour éliminer les réactifs n'ayant pas réagi ainsi que l'éthanol. La mesure de la conductivité des eaux de lavages a montré une bonne purification de la suspension après la dernière ultrafiltration ($\sigma < 10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Enfin, une partie de la suspension est lyophilisée pour pouvoir réaliser les caractérisations sur poudre. La quantité de groupements amine greffés à la surface des TiONts et la stabilité colloïdale des nanoparticules sont évaluées dans les parties qui suivent.

	Rapport molaire (OH : APTÉS)	Rapport volumique des solvants (H ₂ O : EtOH)	pH de greffage	Température de greffage (°C)	Temps de réaction (h)	Agitation magnétique (tr/min)	Purifications
TiONts-APTÉS (ancien protocole)	(1 : 10)	50 : 50	9 - 10	25	24	400	* Évaporateur rotatif (250 mbar ; 80°C) * Ultrafiltration (100 kDa)
TiONts-APTÉS (nouveau protocole)	(1 : 3)	50 : 50	5	60	5	400	* Ultrafiltration (100 kDa)

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des deux protocoles de greffage de l'APTÉS sur les TiONts.

1.2.1.2. Preuve du greffage de l'APTÉS à la surface des TiONts : mise en évidence d'une quantité moindre greffée... vers la formation d'une monocouche ?

Les TiONts-APTÉS sont analysés par IR-TF afin de pouvoir comparer les deux protocoles de synthèses. Une nouvelle fois, les bandes de vibrations attribuées aux liaisons caractéristiques de l'APTÉS sont présentes (bandes de vibrations signalées en orange, Figure 96) : liaisons **Si-O-Si** à 1000 cm⁻¹, **C-NH₂** à 1080 cm⁻¹, **C-C-N** à 1200 cm⁻¹ et **NH₂** à 3200 cm⁻¹ [124, 132]. Alors que les bandes de vibrations (signalées en rose) confirment la présence d'hydroxyles à 3370 cm⁻¹ et de la chaîne aliphatique de l'APTÉS entre 1450 - 1300 cm⁻¹ et 3000 - 2800 cm⁻¹. L'augmentation de la bande de vibration correspondant aux hydroxyles traduit une condensation incomplète des oligosiloxanols. L'analyse infrarouge ne permet donc pas de montrer des différences significatives entre les deux greffages.

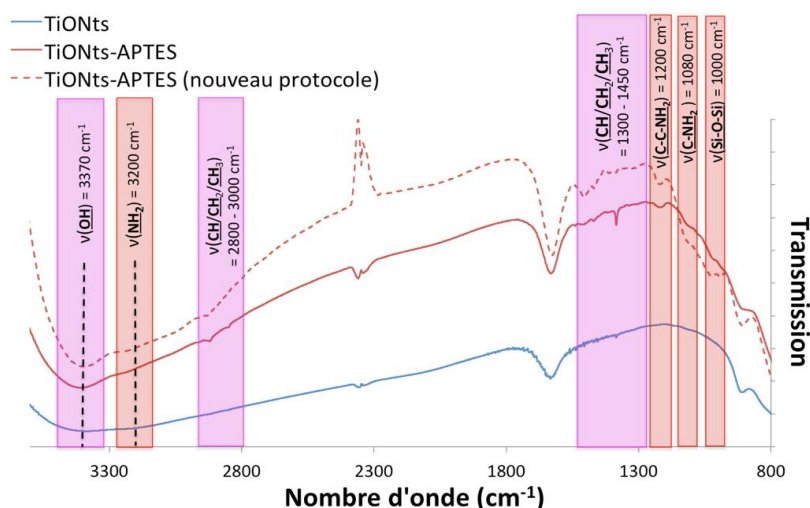


Figure 96 : Spectres infrarouges des TiONts et des TiONts-APTÉS selon les deux protocoles différents.

Le nanohybride issu du nouveau protocole de greffage de l'APTES sur les TiONts est analysé par XPS puis comparé aux TiONts-APTES de l'ancien lot (Tableau 17). Les mêmes éléments chimiques sont observés pour les deux protocoles. Cependant, les concentrations atomiques du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du silicium sont en légère baisse pour cette nouvelle synthèse de TiONts-APTES.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-
TiONts-APTES	13,1	53,4	8,3	19,2	3,0	3,0
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,7	2,8	0,4	1,0	0,2	0,2
TiONts-APTES (nouveau protocole)	11,2	56,8	5,7	21,5	2,3	2,5
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,5	2,6	0,3	1,0	0,1	0,1

Tableau 17 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts et des TiONts-APTES selon les deux protocoles de synthèse étudiés.

La décomposition des seuils O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} des TiONts-APTES est réalisée (Figure 97). Le seuil O_{1s} montre une élévation du taux d'hydroxyles à la surface des nanotubes, ce qui tend à prouver que le taux de condensation des silanols serait encore plus incomplet (Figure 97(O_{1s})). Tandis que les observations des niveaux C_{1s} et N_{1s} permettent de confirmer l'analyse quantitative (Figure 97(C_{1s} ; N_{1s})) avec un taux plus faible en fonctions amine.

Le niveau C_{1s} montre en effet la diminution de la contribution de la liaison C-NH₂ à 286,2 eV : passage de 44% pour l'ancien protocole des TiONts-APTES à 25% pour le nouveau greffage de l'APTES. Tandis que la décomposition du niveau N_{1s} favorise légèrement la liaison C-NH₃⁺ (passage de 56% à 59,3%) au détriment de la liaison C-NH₂, ceci car le milieu réactionnel est plus acide (passage d'un pH 9 - 10 à 5) [148, 258].

Toutes ces observations peuvent être dues à la diminution de la quantité d'APTES greffée à la surface des nanotubes lors de la synthèse en favorisant la création d'une monocouche.

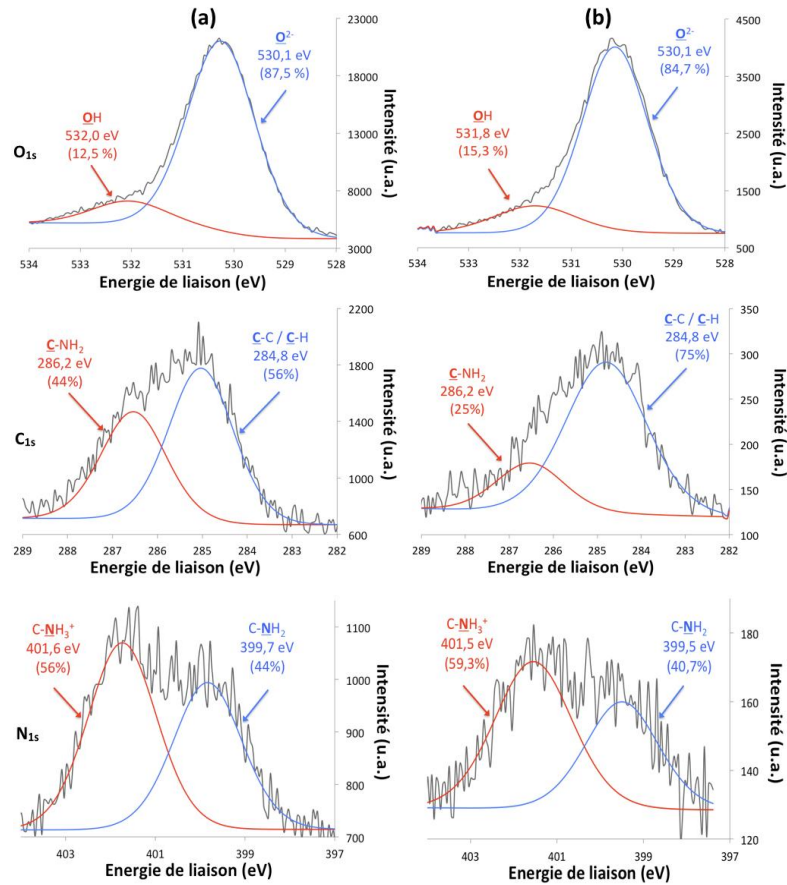


Figure 97 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} de (a) l'ancien protocole et (b) du nouveau protocole de synthèse des TiONts-APTES.

I.2.1.3. Évaluation de la stabilité colloïdale des TiONts-APTES issus des deux protocoles

Les résultats obtenus pour le nouveau protocole de synthèse de l'APTES à la surface des TiONts sont similaires à ceux de l'ancien greffage concernant la zétamétrie et l'étude de stabilité colloïdale, dans le temps, par spectroscopie UV-visible. Le nouveau greffage a lui aussi permis de décaler le PIE vers un pH plus élevé (PIE_{TiONts-APTES} = 6,9) par rapport à celui des TiONts nus (PIE_{TiONts} = 3,3) (Figure 98a). Cependant, ce décalage du PIE est moins prononcé que pour l'ancienne synthèse (PIE_{TiONts-APTES} = 8,5). Ainsi, la faible quantité d'APTES engagée à la surface des nanotubes laisse à penser qu'un plus grand nombre d'hydroxyles n'est pas fonctionnalisé. L'hypothèse d'une condensation incomplète des silanols n'est toujours pas exclue. Ceci expliquerait l'augmentation du potentiel zêta (en valeur absolue) à des valeurs de pH plus élevées en raison d'une plus grande quantité d'hydroxyles. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'augmentation des charges positives à des pH faibles semble due à une plus forte contribution des liaisons C-NH₃⁺. Enfin, le potentiel zêta est faiblement négatif (-6 mV) au pH physiologique (pH 7,4) au lieu de (+10 mV) pour le premier protocole, rendant le nouveau protocole plus attrayant pour privilégier les interactions des nanotubes avec les membranes cellulaires (voir Chapitre 1. I.3.4.).

La stabilité colloïdale des nanohybrides issus de ces deux protocoles de greffage est observée en suivant leur absorbance en fonction du temps, pendant 150 min à $\lambda = 600$ nm dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 98b). Les deux greffages montrent des résultats assez proches et une mauvaise stabilité dans ces conditions au-delà de 40 min, en raison des potentiels trouvés par zétamétrie proches

de zéro. Notons que les agents de répulsion de type électrostatique sont peu efficaces dans des milieux ionisés (dans notre cas $[\text{NaCl}] = 10^{-2} \text{ M}$). Ainsi, le nouveau protocole de greffage de l'APTES sur les TiONts ne permet pas d'améliorer leur stabilité colloïdale au pH physiologique mais semble former une monocouche d'alcoxy silane à la surface des TiONts.

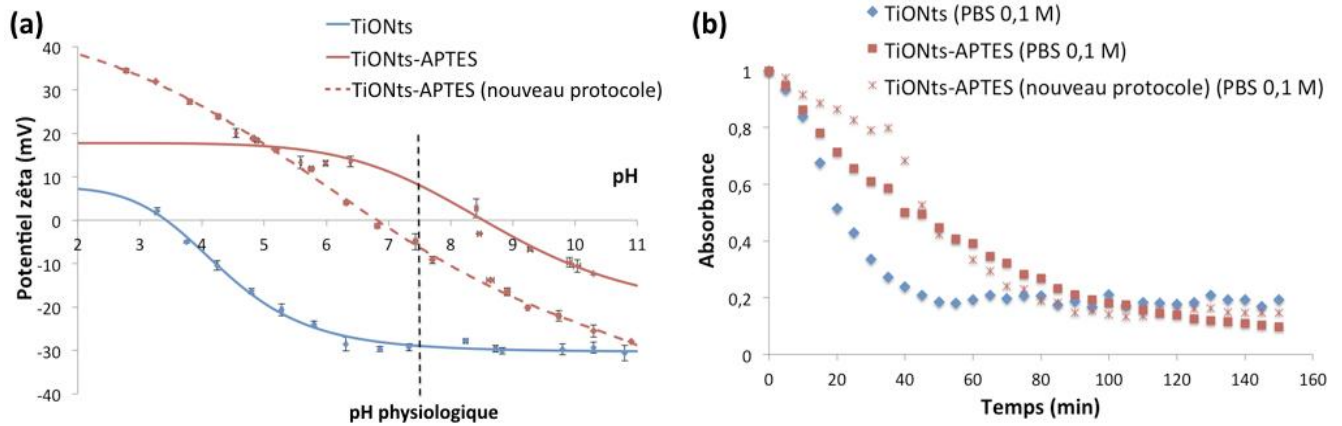


Figure 98 : (a) Évolution des potentiels zêta en fonction du pH (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique) dans du NaCl (10^{-2} M) et (b) courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600 \text{ nm}$ pour les TiONts et les différentes synthèses de TiONts-APTES afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

1.2.1.4. Estimation de la quantité d'APTES greffée sur les TiONts

Les nouvelles synthèses des TiONts et des TiONts-APTES sont analysées par ATG sous air de 50°C à 800°C (Tableau 18 et Figure 99). La perte de masse due au nouveau greffage des TiONts-APTES est moins conséquente qu'avec l'ancien échantillon (Figure 99a). Le taux de silane à la surface des nanotubes (Équation 3) varie de $5,3 \text{ NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$ à $2,6 \text{ NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$ d'un protocole à l'autre. L'analyse ATG corrobore les autres caractérisations déjà réalisées en prouvant une quantité réduite d'APTES à la surface des nanotubes. Par conséquent, ce résultat conforte l'idée d'avoir réduit le nombre de couches à la surface des nanotubes.

	Température de début de dégradation ($^\circ\text{C}$)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Molécule $\cdot \text{nm}^{-2}$ (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	175	2,8	18	10,6 ($\pm 1,5$) OH	10	-
TiONts-APTES	160	10,3	58	5,3 ($\pm 0,4$) NH_2	7	29 000
TiONts (nouvelle synthèse)	190	2,6	18	10,2 ($\pm 1,5$) OH	10	-
TiONts-APTES (nouveau protocole)	175	6,3	58	2,6 ($\pm 0,2$) NH_2	9	14 230

Tableau 18 : Estimation des taux de greffage des différentes synthèses de TiONts et de TiONts-APTES par ATG.

(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

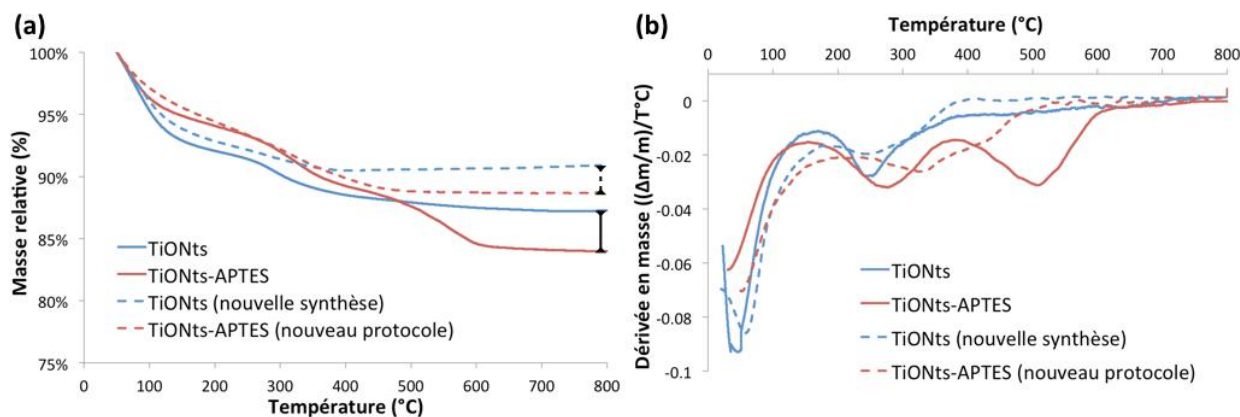


Figure 99 : Comparaison des courbes (a) ATG et (b) DTG des différentes synthèses de TiONts nus et de TiONts-APTES sous air ($25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. L'écart symbolisé par la ligne continue représente la différence de perte de masse correspondant à la fonctionnalisation par l'APTES avec l'ancien protocole tandis que l'écart symbolisé par la ligne en pointillés représente la différence de perte de masse correspondant à la fonctionnalisation par l'APTES avec le nouveau protocole.

I.2.1.5. Conclusions

La nouvelle stratégie de greffage de l'APTES à la surface des TiONts tend à limiter la formation d'une multicouche d'aminosilane. L'objectif est ici de libérer au mieux la fonction amine, au détriment d'un taux de greffage élevé. Ce point sera vérifié par la suite lors du greffage du PEG (voir paragraphe II.1.2.1.). Ceci a pour conséquence d'optimiser l'effet électrostatique avec un potentiel zêta plus élevé en valeur absolue pour des pH faibles et élevés. Cependant, au pH physiologique, les TiONts-APTES s'agglomèrent fortement et ne sont pas stables. Ceci est un frein en vue des applications biologiques, d'où la nécessité de réaliser d'autres greffages pour pallier à cet inconvénient majeur. D'ailleurs, la diminution de l'encombrement autour de la fonction amine peut favoriser l'approche d'autres molécules, telles qu'un polymère, lors des fonctionnalisations. Dans la suite du manuscrit, les TiONts-APTES utilisés sont synthétisés à partir du protocole décrit dans cette partie. Un autre choix d'alcoxyasilane, le *N*-(6-aminohexyl)aminomethyltriéthoxysilane (AHAMTES), est présenté dans la partie suivante afin de le comparer au greffage de l'APTES sur les TiONts.

I.2.2. Choix du *N*-(6-aminohexyl)aminomethyltriéthoxysilane (AHAMTES)

Cette partie met en valeur la nature de l'aminosilane qui a un rôle prépondérant sur les caractéristiques finales de la couche formée et sur les propriétés du nanomatériau. Une des principales difficultés de l'utilisation des aminosilanes est le fait qu'il existe plusieurs voies possibles d'interaction entre eux et la surface des oxydes : *via* des attractions électrostatiques, des liaisons siloxanes et hydrogènes (Figure 100a) [253, 276, 283].

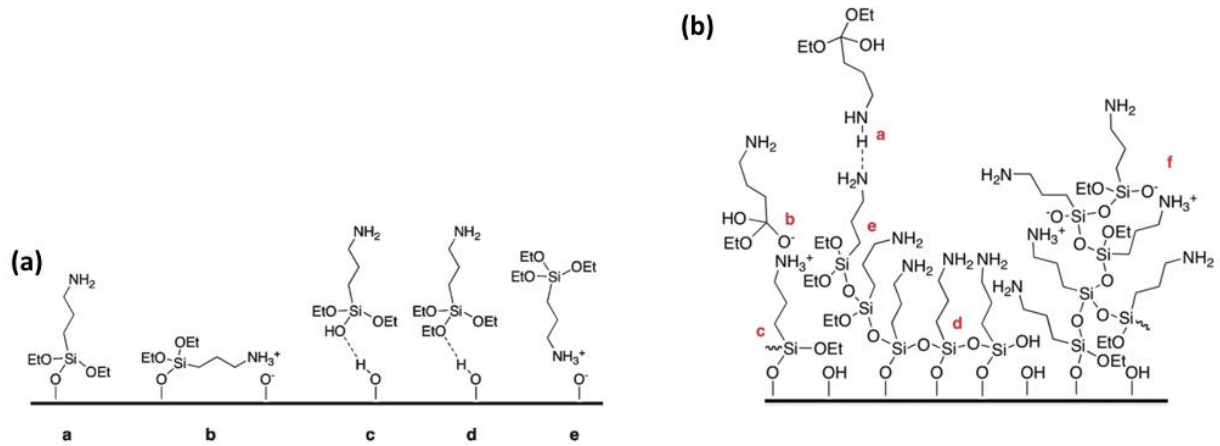


Figure 100 : (a) Différents types d'interaction entre l'APTES et un substrat inorganique de type oxyde. (b) Illustration de la structure finale complexe et désordonnée d'une couche d'APTES. D'après [276].

Ces conformations peuvent provoquer la formation de multicouches inhomogènes et un faible rendement de greffage. Certaines liaisons formées peuvent également se rompre facilement selon leur milieu d'exposition. C'est le principal problème de l'APTES qui se détache des TiONts lorsqu'il est soumis à un environnement aqueux trop longtemps. Ce phénomène est dû à l'hydrolyse de la liaison siloxane catalysée par la fonction amine [253, 283]. Ainsi, la couche siloxanique de l'APTES, étudiée dans le Chapitre 2. peut rapidement devenir instable selon les conditions de stockage. Enfin, la fonction amine à l'extrémité des aminosilanes peut créer des liens intra et intermoléculaires avec le silane rendant la structure de la couche finale très complexe et désordonnée (Figure 100b) [284].

Il est alors nécessaire de maîtriser la stabilité hydrolytique des aminosilanes en contrôlant leur longueur de chaîne alkylée et en intégrant une fonction pour limiter les interactions intramoléculaires (ici une amine secondaire) [283]. Le *N*-(6-aminohexyl)aminomethyltriéthoxysilane, nommé AHAMTES, est choisi pour éviter ce phénomène. Ainsi, les liaisons siloxanes entre les fonctions silanes et silanols ne se forment plus facilement. La fonction amine de l'AHAMTES est moins susceptible de participer à l'hydrolyse des liaisons siloxanes catalysées intramoléculairement en raison de la longueur de la chaîne alkylée séparant l'atome de silicium et le groupement amine (Figure 101) [276]. Ces caractéristiques rendent donc très intéressant cet alcoxysilane.

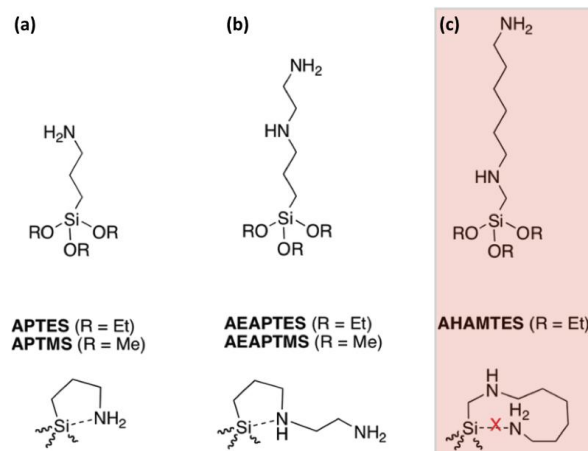


Figure 101 : Les aminosilanes sont classés en trois catégories selon leur capacité à former des interactions intramoléculaires. Représentation (a) de l'APTES et de l'APTMS, (b) de l'AEAPTES et de l'AEAPTMS et (c) de l'AHAMTES. D'après [276].

I.2.2.1. Protocole de fonctionnalisation de l'AHAMTES sur les TiONts

Le greffage de l'AHAMTES sur les TiONts est réalisé à partir des mêmes conditions de synthèse que celles décrites dans le protocole des TiONts-APTES de ce chapitre. Brièvement, la suspension de TiONts est redispersée dans un volume eau/éthanol 1 : 1 (V : V) (3 mg.mL^{-1}) puis le pH est ajusté à 5 à l'aide d'une solution de HCl à 0,1 M. La quantité d'AHAMTES engagée est 3 fois supérieure par rapport au taux d'hydroxyles à la surface des TiONts. Ensuite, l'AHAMTES est ajouté goutte à goutte dans la suspension en TiONts. Le milieu réactionnel des TiONts-AHAMTES est chauffé à reflux (60°C) sous agitation magnétique (400 tr/min).

Après 5 heures de réaction, la suspension est ultrafiltrée (100 kDa) avec de l'eau ultrapure. La mesure de la conductivité des eaux de lavages après la dernière ultrafiltration atteste d'une bonne purification de la suspension ($\sigma < 10 \mu\text{S.cm}^{-1}$). Enfin, une partie de la suspension est lyophilisée pour les caractérisations sur poudre.

I.2.2.2. Caractérisations des nanohybrides TiONts-AHAMTES

L'analyse IR est effectuée sur les TiONts-AHAMTES (Figure 102). Les bandes de vibration correspondant aux chaînes aliphatiques de ce nouvel aminosilane, situées entre $1550 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ et entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, sont présentes (bandes de vibration signalées en rose). Elles sont plus intenses, par rapport au spectre obtenu avec les TiONts-APTES, en raison d'un plus grand nombre de fonctions alkyles sur l'AHAMTES. Par ailleurs, les liaisons caractéristiques de l'AHAMTES sont aussi trouvées à 1060 cm^{-1} (**Si-O-Si**), 1080 cm^{-1} (**NH₂**), 1250 cm^{-1} (**C-C-NH₂** et **NH**), 3250 cm^{-1} (**NH₂**) et 3450 cm^{-1} (**NH**) (bandes de vibration signalées en rouge) [285]. Cependant, il est possible d'observer un décalage de 50 cm^{-1} pour les signaux des liaisons **Si-O-Si** ainsi que pour les fonctions **C-C-NH₂** et **NH** entre le spectre des TiONts-APTES et celui des TiONts-AHAMTES. En effet, des interactions intramoléculaires peuvent se former entre l'atome de silicium et la fonction amine de l'APTES et décalent ces bandes vibrations vers des nombres d'onde plus élevés en comparaison à l'AHAMTES (paragraphe I.2.2.).

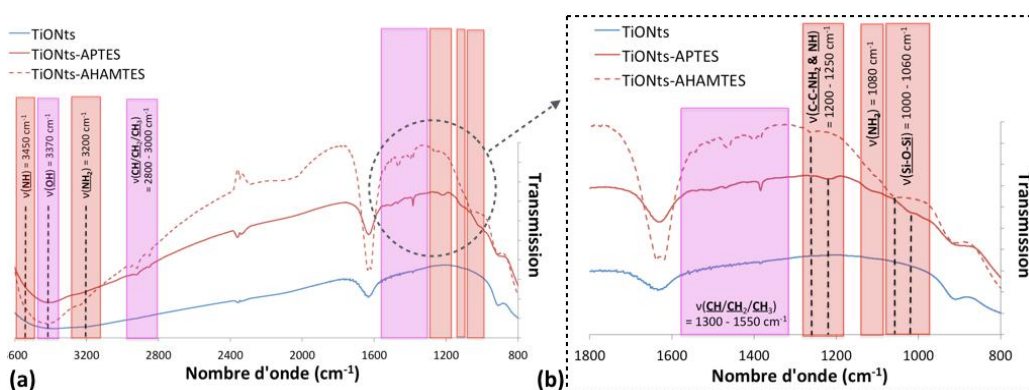


Figure 102 : Spectres infrarouges des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AHAMTES entre (a) $3600 - 800 \text{ cm}^{-1}$ et entre (b) $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$.

L'analyse ATG montre des résultats similaires pour les deux aminosilanes (Tableau 19). Bien que la perte de masse des TiONts-AHAMTES soit plus conséquente par rapport aux TiONts-APTES en raison d'une plus grande quantité de matière organique à dégrader, le taux de greffage de l'AHAMTES à la surface des TiONts est similaire, avec une valeur de $2,1 \text{ AHAMTES.nm}^{-2}$ (Figure 103). Cette valeur légèrement plus faible qu'avec l'APTES, peut être liée à la longueur de chaîne carbonée plus importante. De plus, les courbes DTG montrent, elles aussi, de fortes ressemblances.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONT ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-AHAMTES	185	9,6	129	2,1 (±0,2) AHAMTES	3	11 500

Tableau 19 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AHAMTES par ATG.

(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

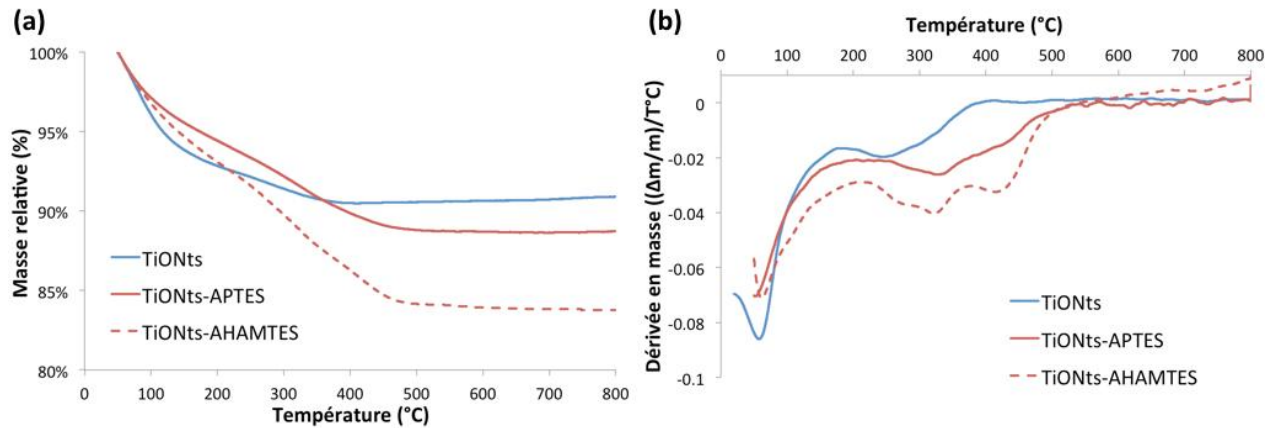


Figure 103 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AHAMTES sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

Le PIE des TiONts-AHAMTES est, comme c'est le cas avec les TiONts-APTES, décalé vers des pH plus élevés ($PIE_{AHAMTES} = 7,4$) ($PIE_{APTES} = 6,9$) par rapport aux TiONts nus ($PIE_{TiONts} = 3,3$). Les potentiels zêta sont globalement moins élevés en les comparant aux TiONts-APTES (Figure 104a). De plus, au pH physiologique, le potentiel zêta est proche de zéro et confirme la stabilité colloïdale médiocre au-delà d'une heure de mise en suspension, dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) des TiONts-AHAMTES (Figure 104b). Une certaine amélioration de cette stabilité due à l'AHAMTES est cependant observée, en comparaison avec celle apportée par l'APTES. Cependant, ces résultats ne sont pas suffisants pour affirmer que ces pré-fonctionnalisations, à partir d'un alcoxy silane, améliorent la stabilité des TiONts dans les conditions physiologiques.

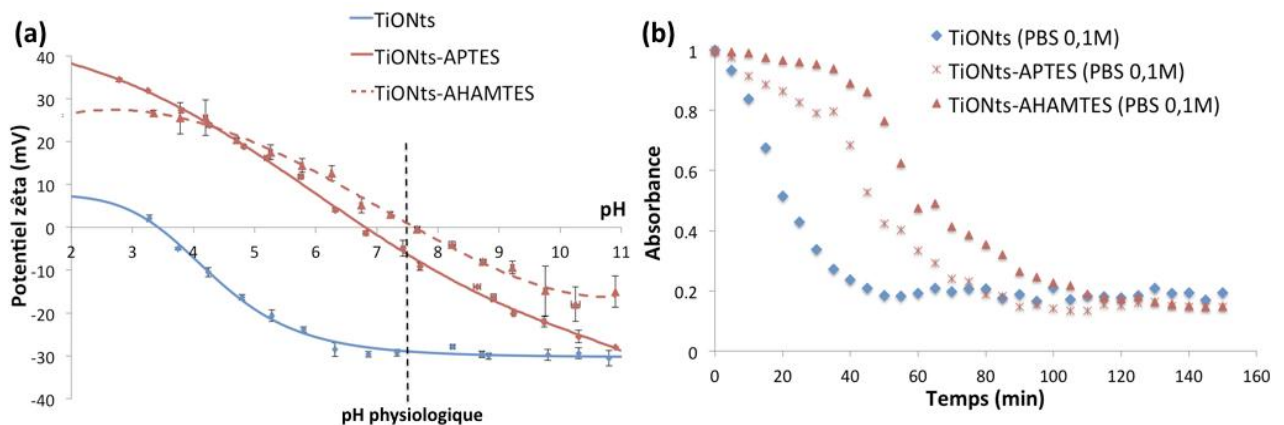


Figure 104 : (a) Évolution des potentiels zêta en fonction du pH (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique) dans du NaCl (10⁻² M) et (b) courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AHAMTES afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

I.2.2.3. Conclusions

Les résultats du nouveau protocole de synthèse des TiONts-APTES et le greffage de l'AHAMTES sur les TiONts se sont avérés intéressants afin de tenter d'obtenir une monocouche siloxanique et une fonction d'intérêt à la surface des TiONts, ici un groupement amine. Les taux de greffages des deux aminosilanes ($2,6 \text{ APTES.nm}^{-2}$ et $2,1 \text{ AHAMTES.nm}^{-2}$) sont largement suffisants pour effectuer d'autres fonctionnalisations ultérieures. L'AHAMTES s'est avéré tout aussi efficace, voire plus efficace, que l'APTES, pour stabiliser la suspension de nanotubes. Cependant, les greffages effectués dans le paragraphe II de ce chapitre et dans le Chapitre 4. sont réalisés à partir des TiONts-APTES avec le nouveau protocole établi dans cette partie. Ceci afin de garder la même base de travail pour comparer l'étude à celle du Chapitre 2. D'autres agents stabilisants tels que des catéchols et des phosphonates sont testés dans les parties qui suivent pour tenter d'améliorer encore la stabilité colloïdale des nanotubes de titanate dans les conditions physiologiques.

I.3. Modification de surface des TiONts par un catéchol

I.3.1. Généralités sur les catéchols

Les applications des nanopoudres en suspension sont souvent limitées par la stabilité colloïdale insuffisante des nanoparticules. Les catéchols ont de bonnes propriétés d'agents stabilisants [279, 281] pour tenter d'y remédier ; ils présentent également une activité antioxydante [286]. Les catéchols forment en général une monocouche chargée à la surface de l'oxyde, qui permet de stabiliser les nanoparticules, d'absorber la lumière, de conduire à des réactions d'oxydo-réductions réversibles et ils présentent une barrière de potentiel intéressante pour des applications photovoltaïques et biomédicales [88]. Des dérivés de catéchols sont utilisés comme dispersants pour divers oxydes avec notamment les oxydes de titane et de fer [279, 287]. Malgré des propriétés chimiques similaires entre les différents catéchols, les affinités sur ces oxydes varient considérablement. Les catéchols peuvent former des liaisons faiblement réversibles et des liaisons fortes, dépendant de leur affinité avec les cations des oxydes [188]. Le mécanisme de greffage des catéchols sur les oxydes est relativement proche de celui des phosphonates (paragraphe I.4.). Brièvement, un complexe mono- ou bidenté peut se former avec un ou deux oxygènes du catéchol et l'atome métallique de l'oxyde, comme c'est le cas avec le titane.

Comme énoncé précédemment, les catéchols peuvent facilement s'oxyder, en raison d'un fort taux de transfert d'électron au sein de la molécule, en formant des quinones par un processus de réduction (Figure 105a) [288].

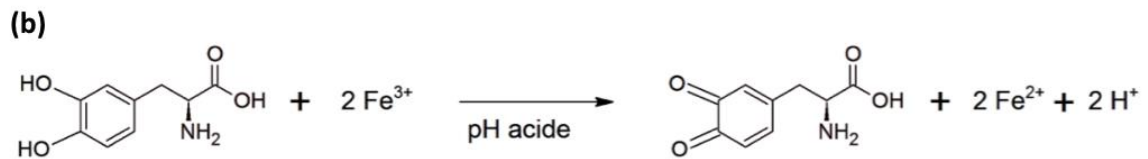
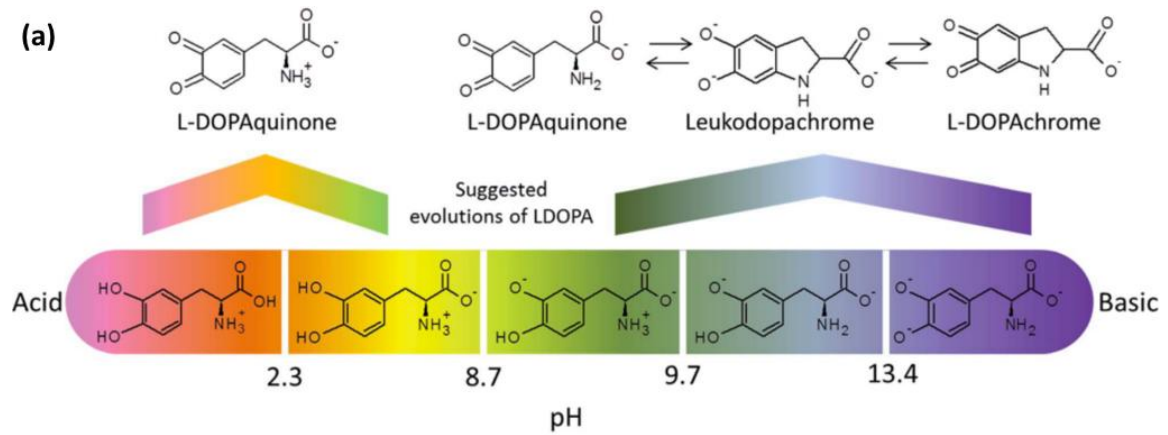


Figure 105 : (a) Oxydation d'un catéchol selon le pH et transformation des catéchols en quinone en milieu acide ; (b) réduction des ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} , par exemple dans le cas de Fe_3O_4 , en milieu acide. Cas de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA) [288].

Divers catéchols ont été développés en ajoutant un groupement attracteur d'électrons pour éviter ou limiter leur oxydation [289]. La stratégie la plus appropriée à ce jour est l'ajout d'un groupement nitro qui conduit à une augmentation de l'acidité des fonctions hydroxyles et améliore ainsi la force des liaisons [290]. Il a été montré que les catéchols se lient faiblement et de façon réversible aux nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 en favorisant leur dissolution [88] (Figure 105b) [18]. Par contre, les nitrocatéchols possèdent une grande affinité avec les oxydes et empêchent la dissolution des nanoparticules de Fe_3O_4 [290].

Enfin, le pH est un paramètre clé du greffage et de la conformation des catéchols à la surface de l'oxyde métallique. En plus d'être le facteur principal d'oxydation des catéchols, l'état de protonation des différents groupements est dépendant du pH (Figure 106a). Ainsi, la concentration et le pH du milieu réactionnel influent sur la capacité de greffage des catéchols (les pKa des hydroxyles des catéchols ont une valeur comprise entre 8,5 et 10) et sur la conformation de la molécule à la surface de l'oxyde (Figure 106b).

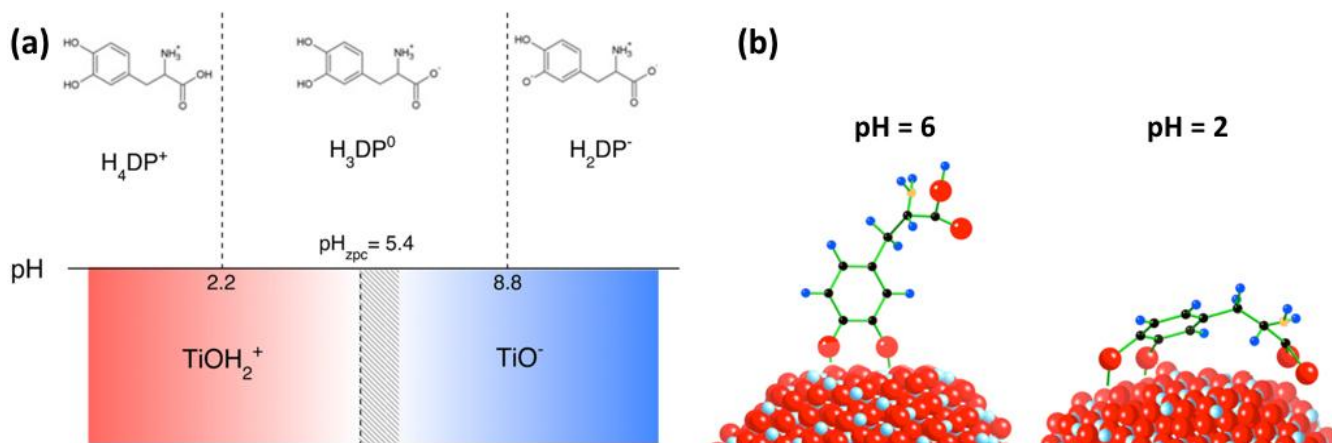


Figure 106 : Illustration de l'état (a) de protonation et (b) de conformation des catéchols (cas de la LDOPA) dépendant du pH, sur une surface de dioxyde de titane [291].

Une étude, relative au greffage de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA) sur le TiO_2 , a montré qu'un pH égal à 6 permet d'obtenir une conformation étirée et une orientation perpendiculaire à la surface des nanoparticules (ce qui a aussi été observé avec une forte concentration en catéchol lors des greffages) contrairement à un pH égal à 2, pour lequel la molécule semble « couchée » à la surface du TiO_2 [291]. Il est donc préférable d'avoir un pH aux alentours de 6 sur une surface de TiO_2 pour optimiser le greffage des catéchols à la surface de l'oxyde et avoir des fonctions réactives disponibles. Par ailleurs, une valeur de pH trop élevée favorise l'oxydation des catéchols [287] et cet effet n'est pas recherché dans cette étude. Le choix du pH est donc primordial pour avoir une bonne conformation de la molécule tout en limitant son oxydation en vue des futurs greffages.

I.3.2. Choix de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA), de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique (DHCA) et de la nitrodopamine (NDOPA) pour stabiliser les suspensions de TiONts

Le greffage de trois catéchols hydrophiles est réalisé pour modifier la surface des TiONts : la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA), l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique (DHCA) et la nitrodopamine (NDOPA) (Figure 107). Ces molécules présentent de nombreuses fonctions réactives en plus du groupement catéchol afin d'améliorer la stabilité colloïdale par répulsion électrostatique ($-COOH$, $-NH_2$, $-NO_2$). Ces mêmes fonctions permettent d'envisager des greffages ultérieurs de molécules comme des polymères, des agents thérapeutiques ou chélatants. Par ailleurs, les hydroxyles des catéchols ont une très forte affinité avec les oxydes de titane [281]. Les TiONts peuvent être fonctionnalisés par les catéchols sur une large gamme de pH (mais en tenant compte des remarques précédentes). Ces greffages induisent un complexe à transfert de charges de couleur orangée [287].

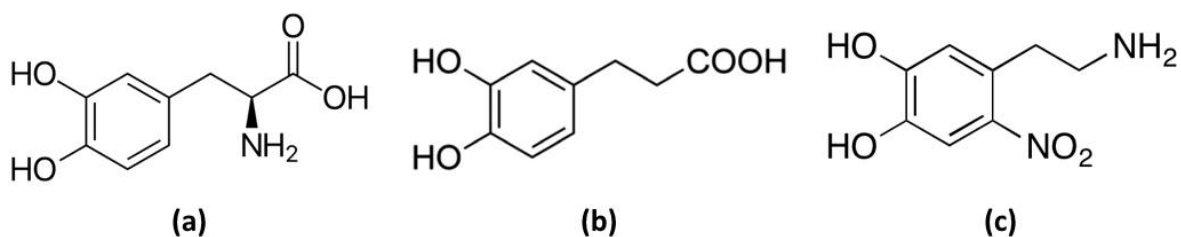


Figure 107 : Molécules de (a) L-3,4-dihydroxyphénylalanine (LDOPA), (b) acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique (DHCA) et (c) nitrodopamine (NDOPA).

Les catéchols sont en outre reconnus comme étant biocompatibles pour l'homme. Parmi ces molécules, la LDOPA est particulièrement employée pour le traitement de la maladie de Parkinson [292]. De plus, la conformation de la DOPA seule est identifiée comme une molécule très intéressante dans la bioadhésion de protéines. Ceci a permis de développer de nouveaux matériaux adhésifs et antialissures non toxiques [287]. Ensuite, le DHCA est non toxique et sans danger pour l'environnement (il est extrait de certains fruits et légumes) [203]. Sa fonction de surface (-COOH) permet notamment d'améliorer la dispersion des nanoparticules dans l'eau. Enfin, la NDOPA est utilisée principalement pour sa fonction nitro qui a pour but d'éviter une éventuelle oxydation de la molécule. Des études ont montré que le noyau benzénique substitué par une fonction NO_2 en plus des deux phénols favorise la formation d'un complexe plus stable. De plus, les valeurs des pK_a des fonctions hydroxyles accrochées au cycle aromatique sont plus faibles que celles des diphénoles non substitués, conduisant à une plus forte affinité avec les hydroxyles présents à la surface de l'oxyde métallique [293].

I.3.2.1. Protocole de greffage des catéchols sur les TiONts

Les différents greffages des catéchols, présentés ici, se sont tous déroulés dans les mêmes conditions afin de pouvoir comparer les résultats (Figure 108).

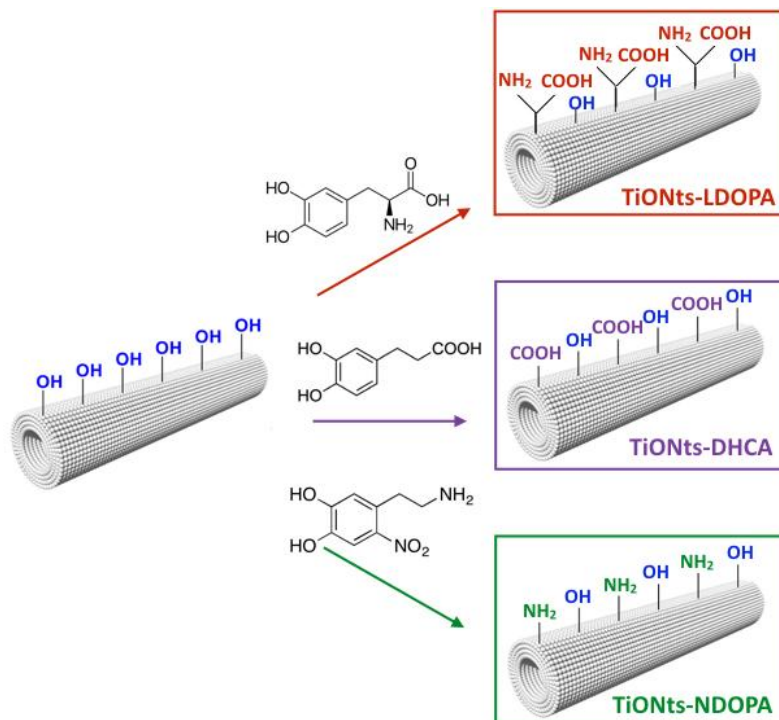


Figure 108 : Schéma des greffages des différents catéchols utilisés, à la surface des TiONts.

Le pH choisi est de 6 pour les raisons expliquées dans le paragraphe précédent. En effet, cette valeur permet à la fois d'avoir une assez bonne dispersion des TiONts dans l'eau (valeur éloignée du PIE des TiONts nus), de se rapprocher des pK_a des deux hydroxyles du cycle aromatique (pour favoriser le greffage) et de limiter l'oxydation des catéchols qui intervient dans un milieu fortement acide ou basique (LDOPA : $\text{pK}_{a_{\text{COOH}}} = 2,3$, $\text{pK}_{a_{\text{NH}_2}} = 9,7$, $\text{pK}_{a_{\text{OH}}} = 8,7$ et $13,4$; DHCA : $\text{pK}_{a_{\text{COOH}}} = 4,2$, $\text{pK}_{a_{\text{OH}}} = 9,2$ et $11,7$; NDOPA : $\text{pK}_{a_{\text{NH}_2}} = 8,7$, $\text{pK}_{a_{\text{NO}_2}} = 6,7$, $\text{pK}_{a_{\text{OH}}} = 6,5$ et $10,3$) [203, 279, 288] (Figure 109). De plus, une étude préalable a été réalisée sur la LDOPA afin de justifier le choix de ce pH, en solubilisant cette

molécule à différents pH. La coloration de la solution de LDOPA met en avant l'oxydation de cette molécule pour des pH supérieurs à 6 (Figure 110). Cet effet est similaire pour le DHCA.

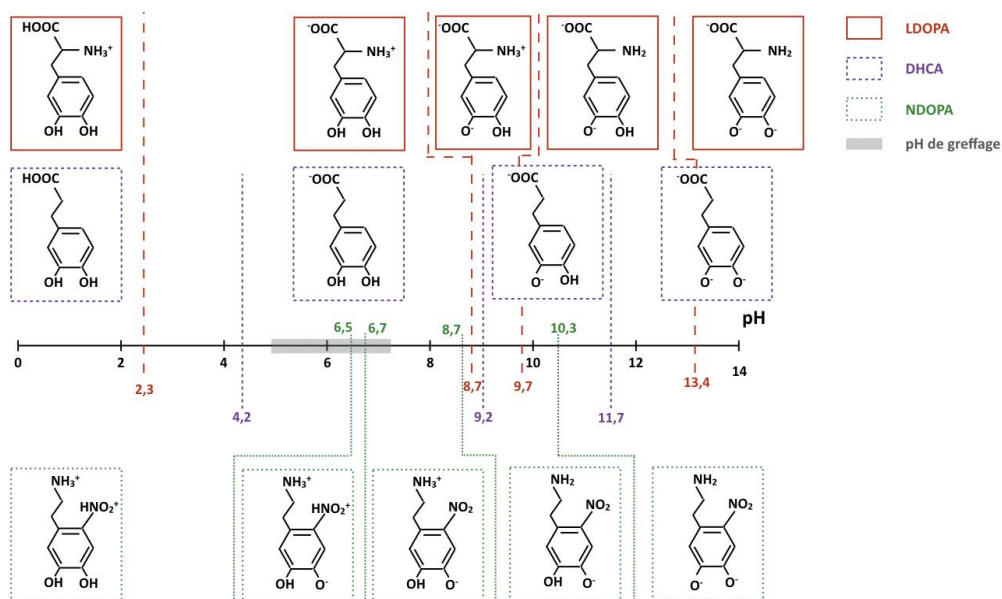


Figure 109 : Schéma représentant chaque forme acido-basique des molécules (LDOPA, DHCA, NDOPA) selon la gamme de pH.

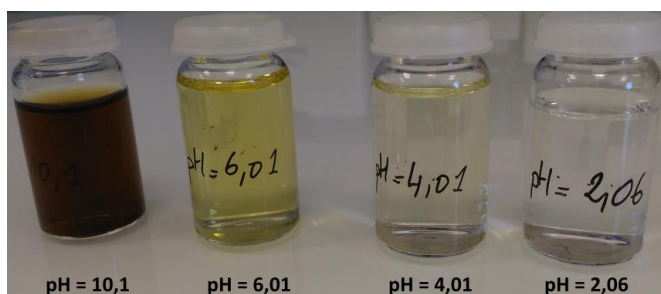


Figure 110 : Solubilisation de la molécule LDOPA à différents pH. La coloration des solutions met en avant l'oxydation de cette molécule à des pH de plus en plus basique.

La LDOPA et le DHCA sont achetées commercialement (Sigma Aldrich) tandis que la NDOPA est synthétisée en suivant les protocoles établis lors des travaux d'Amstad et de Zirbs [281, 294]. La RMN ^1H de la NDOPA, synthétisée et solubilisée dans du DMSO d_6 , montre une pureté de 86%. Le spectre est conforme à celui trouvé dans la littérature (Figure 111) [294].

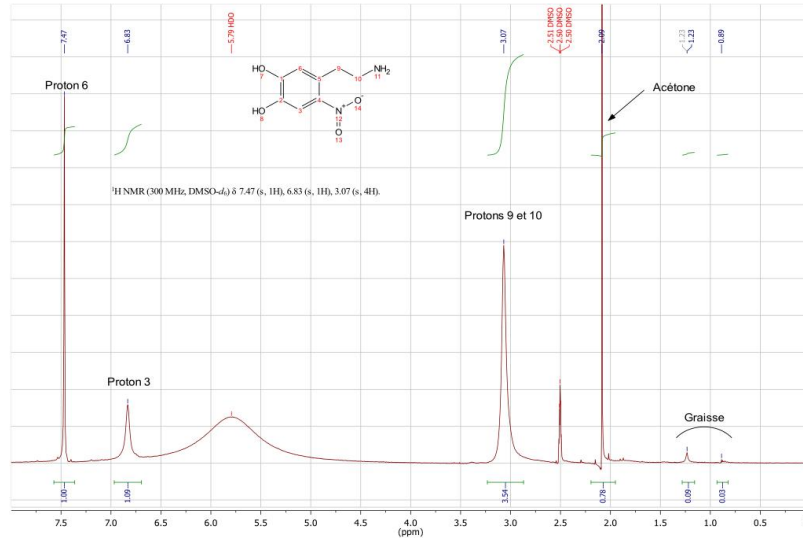


Figure 111 : Spectre RMN ¹H de la NDOPA synthétisée au laboratoire.

Les catéchols sont ajoutés dans une suspension aqueuse de TiONts (3 mg.L⁻¹). La quantité de molécules organiques pour chaque greffage est de 3 catéchols pour 1 OH en surface des TiONts. Le pH est ajusté à 6 (pH_{initial} = 8,2) avec une solution de HCl à 0,1 M. La synthèse se déroule à 25°C et sous agitation magnétique (400 tr/min) pendant 5 heures. Le milieu réactionnel est protégé de toute lumière par du papier d'aluminium afin d'éviter que le rayonnement n'oxyde les catéchols. Très rapidement, la suspension initialement blanche est devenue jaune orangé.

La suspension de TiONts est alors ultrafiltrée (100 kDa) à l'abri de la lumière jusqu'à obtenir une conductivité des eaux de lavages inférieure à 10 μS.cm⁻¹. De plus, la purification des TiONts fonctionnalisés par les catéchols est optimisée en analysant le filtrat de l'ultrafiltration par spectroscopie UV-visible après les différents lavages. Une large bande d'absorbance est observée vers 280 nm pour la LDOPA et le DHCA et vers 420 nm pour la NDOPA en raison du cycle aromatique présent sur les catéchols. Une fois que tous les catéchols libres sont éliminés, une partie de la suspension est lyophilisée pour les caractérisations sur poudre.

I.3.2.2. Mise en évidence des différents catéchols à la surface des TiONts

Les bandes de vibrations caractéristiques de chaque molécule sont observées sur les spectres infrarouges des TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA (Figure 112) [18, 279]. Les liaisons attribuées aux chaînes carbonées aliphatiques et aux cycles aromatiques sont observables entre 1220 - 1100 cm⁻¹, 1430 - 1350 cm⁻¹ et 3050 - 2800 cm⁻¹ (bandes de vibration en gris). La fonction **C-NH₂**, présente sur la LDOPA et la NDOPA est visible à 1050 cm⁻¹ (bandes en rose) tandis que la bande de vibration à 1710 cm⁻¹ est attribuée à la liaison **COOH** de la LDOPA et du DHCA (bandes en rouge). Ces mêmes liaisons sont aussi observées entre 3400 - 3200 cm⁻¹ en plus des **OH** présents sur les TiONts. De plus, la fonction **NO₂**, caractéristique de la NDOPA tend à prouver la présence de cette molécule à la surface des TiONts avec les bandes situées à 1320 cm⁻¹ et à 1440 cm⁻¹ (bandes en vert). Enfin, l'analyse IR met en avant la conformation des molécules organiques à la surface des TiONts. Les deux bandes de vibrations à 1250 cm⁻¹ et à 1480 cm⁻¹ suggèrent que les deux hydroxyles des catéchols forment des liaisons bidentées avec le titane [279, 295] même si elles se sont révélées moins intenses pour les TiONts-LDOPA et les TiONts-DHCA (bandes en bleu).

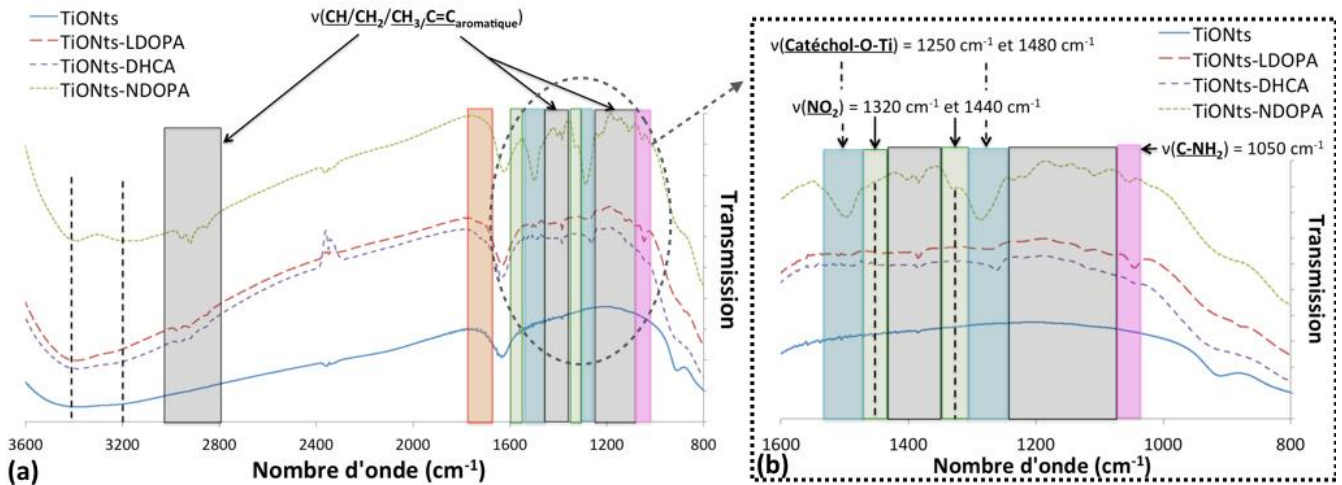


Figure 112 : Spectres IR des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA entre (a) 3600 cm^{-1} - 800 cm^{-1} et entre (b) 1600 cm^{-1} - 800 cm^{-1} .

L'XPS confirme aussi le greffage de chaque molécule organique à la surface des TiONts. L'analyse des concentrations atomiques met en évidence la hausse du taux de carbone et de l'oxygène pour les TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA comparés aux TiONts nus (Tableau 20). De plus, les pourcentages d'azote mesurés sur les échantillons TiONts-LDOPA et TiONts-NDOPA permettent de montrer la présence de la LDOPA et de la NDOPA à la surface des TiONts. Par ailleurs, le taux d'azote sur les TiONts-NDOPA s'est avéré plus élevé que celui sur les TiONts-LDOPA en raison de la fonction NO_2 .

Concentration atomique (%)	C_{1s}	O_{1s}	Na_{KLL}	Ti_{2p}	N_{1s}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-
TiONts-LDOPA	25,2	57,8	7,5	17,2	2,9
% atomique (TiONts-LDOPA) / Ti	1,5	3,4	0,4	1,0	0,2
TiONts-DHCA	23,1	51,4	9,0	16,5	-
% atomique (TiONts-DHCA) / Ti	1,4	3,1	0,5	1,0	-
TiONts-NDOPA	22,0	53,3	3,7	16,8	4,2
% atomique (TiONts-NDOPA) / Ti	1,3	3,2	0,2	1,0	0,3

Tableau 20 : Analyses XPS des concentrations atomiques des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA.

Les composantes de chaque molécule individuelle sont retrouvées après leur greffage sur les nanotubes de titanate [18, 290]. Comme l'IR, la décomposition des niveaux O_{1s} et C_{1s} permet de montrer que le groupement catéchol est présent à la surface des TiONts (Figure 113). En effet, la composante aux alentours de 533,2 eV sur le niveau O_{1s} des TiONts-LDOPA et des TiONts-DHCA est attribuée aux liaisons C-OH et C-O des hydroxyles provenant des catéchols (Figure 113a et c). Ces mêmes liaisons sont aussi observées sur le seuil C_{1s} à 286,3 eV, en plus de la composante liée au **benzène** et **benzène $\pi-\pi^*$** aux alentours de 285,3 eV et de 290 eV respectivement pour les trois greffages. Cependant, les liaisons C-OH et C-O sur le niveau O_{1s} ne sont pas visibles sur les TiONts-NDOPA, probablement en raison d'une meilleure optimisation du greffage *via* les fonctions hydroxyles des catéchols, sur le titane (Figure 113b). L'augmentation de la composante à 529,9 eV pour les TiONts-NDOPA (TiONts-NDOPA : 20,2% *versus* TiONts-LDOPA : 7,5% et TiONts-DHCA : 12,6%) attribuée à la formation de la liaison Ti-O-catéchol

confirme que les conditions de greffage sont préférables pour la NDOPA (pH de greffage = 6) (Figure 109).

De plus, la fonction carboxyle présente sur la LDOPA et le DHCA est visible à 532,4 eV et à 533 eV, sur le niveau O_{1s} mais aussi à 288,2 eV et à 288,5 eV sur le niveau C_{1s} respectivement. Sur le niveau N_{1s} , les fonctions NH_2 et NH_3^+ sont observées respectivement à 399,9 eV et à 401,3 eV pour la LDOPA tandis qu'elles sont situées à 399,6 eV et à 401,6 eV pour la NDOPA [295]. Pour finir, la fonction nitro de la NDOPA est à la fois visible sur le niveau O_{1s} à 531,2 eV (NO_2) et sur le niveau N_{1s} à 404,8 eV (NO_2) et à 406,4 eV (NO_3^+) [296]. L'infrarouge et l'XPS ont donc bien mis en évidence le greffage de ces molécules à la surface des TiONts.

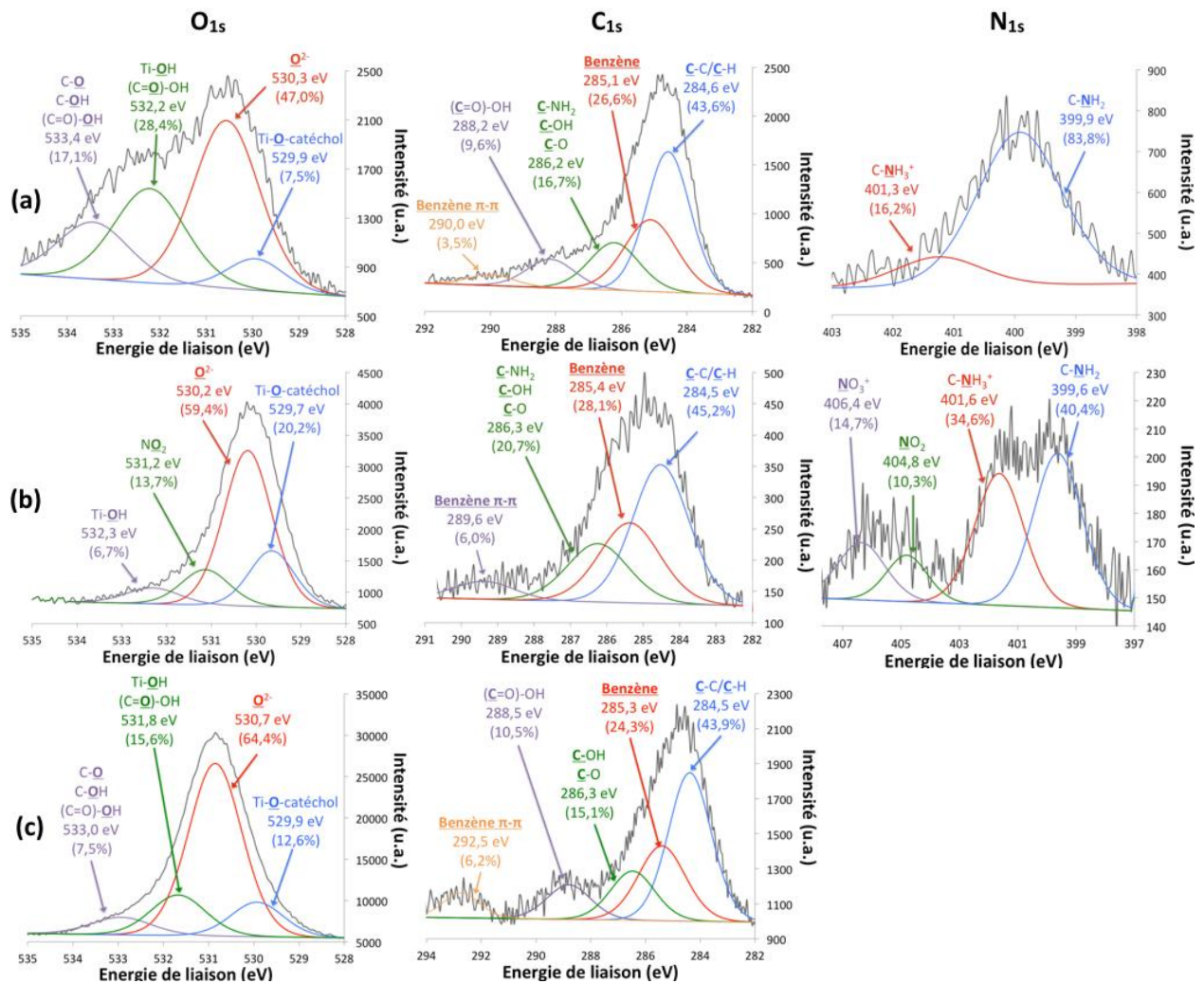


Figure 113 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} et N_{1s} des (a) TiONts-LDOPA, (b) TiONts-NDOPA et (c) TiONts-DHCA.

I.3.2.3. Estimation de la quantité de catéchols greffés à la surface des TiONts

Les différents nanohybrides obtenus sont caractérisés par ATG sous air avec une rampe de 5°C/min afin de déterminer le taux de greffage des catéchols à la surface des TiONts (Tableau 21 et Figure 114).

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONT ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-LDOPA	180	8,4	197	1,2 (±0,2) LDOPA	5	6 570
TiONts-DHCA	205	8,9	182	1,4 (±0,2) DHCA	4	7 660
TiONts-NDOPA	175	17,0	198	2,8 (±0,2) NDOPA	5	15 320

Tableau 21 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

D'après l'allure des courbes ATG et DTG, le greffage des molécules est bien mis en évidence par une perte de masse plus conséquente après les différents greffages (Figure 114). Le taux de greffage de la NDOPA sur les TiONts, toujours calculé à partir de l'Équation 3, est deux fois supérieur (2,8 NDOPA.nm⁻²) à celui obtenu pour la LDOPA ou pour le DHCA (1,2 LDOPA.nm⁻² et 1,4 DHCA.nm⁻² respectivement). La fonction NO₂ de la NDOPA semble permettre d'éviter l'oxydation du catéchol pour optimiser le greffage sur les TiONts, et le pH choisi est plus adapté pour cette molécule. Ainsi, les analyses, faites par IR, XPS et ATG, confirment la présence en plus grande quantité de NDOPA à la surface des TiONts.

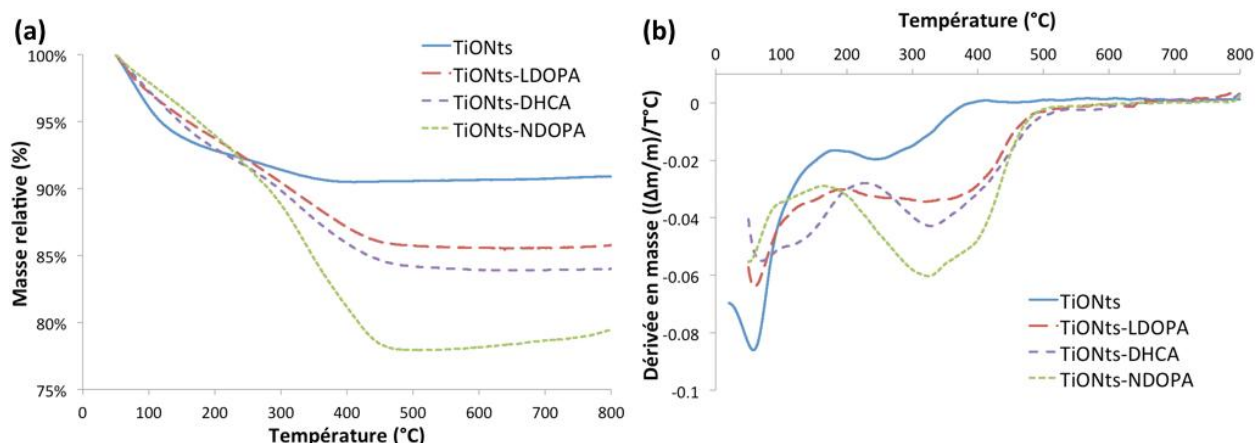


Figure 114 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

I.3.2.4. Influence du greffage des différents catéchols sur la stabilité colloïdale des nanotubes de titanate et résultats relatifs à l'oxydation de ces molécules en présence des tubes

Les mesures électrocinétiques (Figure 115) montrent que le PIE des TiONts-LDOPA n'a pas changé par rapport aux TiONts nus (PIE_{TiONts-LDOPA} = 3,3) contrairement aux TiONts-DHCA et aux TiONts-NDOPA (PIE_{TiONts-DHCA} = 2,7 et PIE_{TiONts-NDOPA} = 6,3). Cependant, le potentiel zêta est plus élevé en milieu acide lors du greffage de la LDOPA en raison de la contribution du groupement NH₃⁺ à ces pH (Figure 109). Quant aux TiONts-DHCA, la fonction carboxyle permet de décaler le PIE vers des valeurs de pH plus faibles, ce qui n'est pas visible avec les TiONts-LDOPA, probablement en raison des différentes valeurs des pK_{aCOOH} du DHCA et de la LDOPA. En ce qui concerne les TiONts-NDOPA, le PIE est fortement décalé vers des pH plus élevés, comme il a été montré avec les TiONts-APTES, en raison du pK_a de la fonction amine. Au pH physiologique (pH 7,4), les TiONts-LDOPA et les TiONts-DHCA possèdent un potentiel zêta du même ordre de grandeur que les TiONts nus (-33 mV environ) notamment grâce à la

présence de la fonction COO^- . Ceci pourrait justifier une répulsion par effet électrostatique meilleure que pour les TiONts-NDOPA (-10 mV). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors du greffage de LDOPA et de DHCA à la surface de nanoparticules de Fe_3O_4 [18].

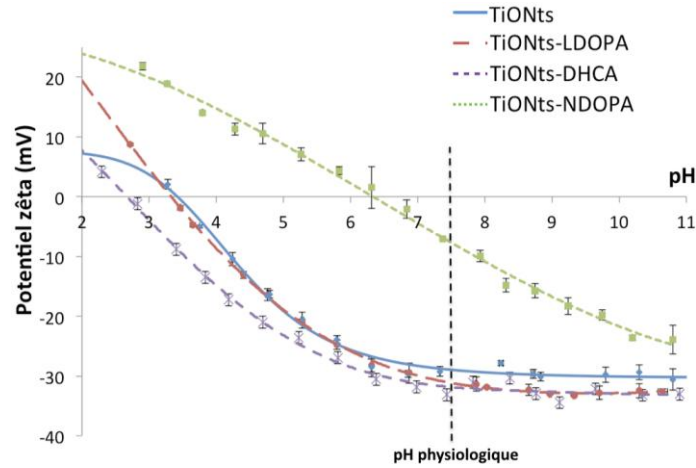


Figure 115 : Évolution des potentiels zêta en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

La Figure 116 confirme les résultats électrocinétiques avec une stabilisation colloïdale bien meilleure des TiONts modifiés par les molécules LDOPA et DHCA. La présence de la fonction carboxyle sur ces molécules semble responsable de cette amélioration. Même si les TiONts-NDOPA sont davantage déstabilisés dans les conditions physiologiques par rapport aux deux autres greffages, les TiONts-NDOPA ont tout de même une stabilité colloïdale meilleure que les TiONts-APTES (Figure 98b).

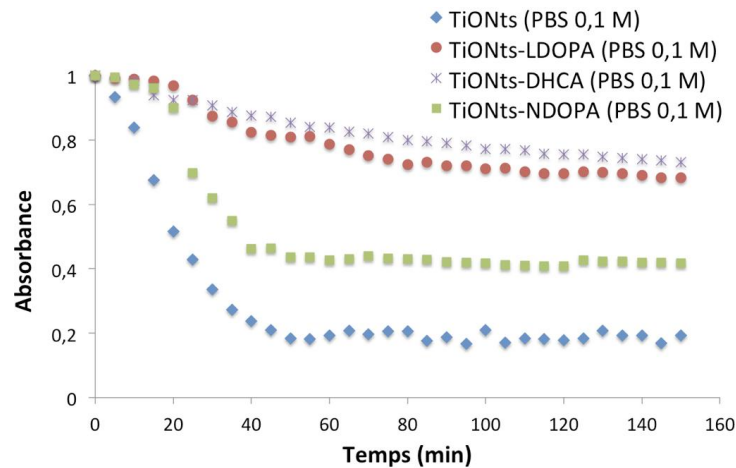


Figure 116 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm des TiONts, TiONts-LDOPA, TiONts-DHCA et TiONts-NDOPA afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

Enfin, une semaine après le greffage de la LDOPA sur les TiONts, un changement de coloration des suspensions est observé (stockage des suspensions à l'abri de la lumière) (Figure 117a). Cette coloration est d'autant plus marquée que la valeur du pH augmente, montrant le rôle déterminant du pH sur l'oxydation de cette molécule. Cet effet est aussi constaté pour les TiONts-DHCA. Tandis qu'aucun changement de coloration n'est observé pour les suspensions de TiONts-NDOPA après une semaine à différents pH (Figure 117b).

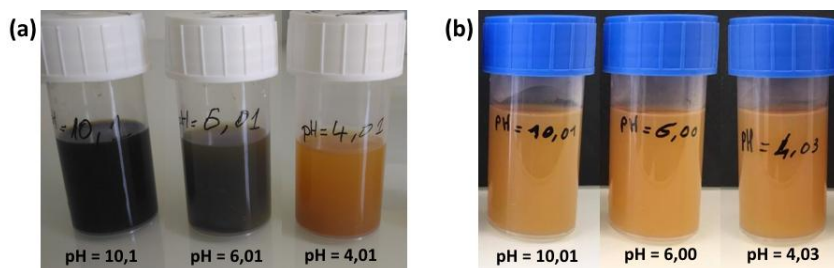


Figure 117 : Photographies des suspensions de (a) TiONts-LDOPA et de (b) TiONts-NDOPA dans un milieu aqueux à différents pH et à l'abri de la lumière, après une semaine.

I.3.2.5. Conclusions

Les agents stabilisants à partir d'un diphenol ont bien été greffés sur les TiONts : leur présence a été prouvée par plusieurs techniques de caractérisations telles que IR, XPS, ATG, etc. Cependant, le DHCA et la LDOPA peuvent se transformer en quinone en milieu acide et *via* des réactions d'oxydo/réduction, limitant leur greffage. Le pH choisi (pH 6) semble le plus adapté pour éviter ces phénomènes mais ceci au détriment d'un rendement de greffage élevé, en raison d'une plus faible déprotonation des hydroxyles du catéchol. Pour toutes ces raisons, la NDOPA a suscité notre intérêt. L'utilisation de cette molécule a notamment permis de limiter le processus d'oxydation. En effet, la présence de la fonction NO₂ sur le cycle aromatique du catéchol induit des délocalisations électroniques et permet de réduire les transformations avec la proximité des groupements NO₂ et NH₂. Par ailleurs, le taux de greffage de la NDOPA sur les TiONts a été bien meilleur car le pH de synthèse se rapproche fortement du pKa des deux OH par rapport à la LDOPA et au DHCA. Ces résultats sont prouvés par ATG avec une perte de masse plus conséquente pour les TiONts-NDOPA. De plus, les caractérisations réalisées par IR et XPS ont montré un plus grand taux de formation de la liaison Ti-O-catéchol. Cependant, il a été montré que le greffage de la molécule NDOPA sur les TiONts n'a pas amélioré significativement la stabilité colloïdale des TiONts-NDOPA dans les conditions physiologiques. Il s'agit alors de tester une autre catégorie de molécules stabilisantes, les agents de couplage de type phosphonate, pour lesquels de nombreux travaux ont déjà étudié leur fort potentiel à stabiliser en suspension diverses nanoparticules [204, 278, 282].

I.4. Modification de surface des TiONts par des agents de couplage de type phosphonate

I.4.1. Généralités sur les agents de couplage de type phosphonate

Les acides phosphoniques et leurs dérivés (R-PO(OR')₂; R, R' = hydrogène, alkyle) sont devenus de plus en plus attrayants en raison de leur forte affinité avec les surfaces hydroxylées [297]. Ils ont déjà fait leurs preuves dans des domaines biologiques pour des biocapteurs ou pour des implants médicaux [298]. Les mécanismes de chimisorption des agents phosphonates sur les substrats inorganiques sont grandement affectés par les conditions de réaction telles que la température, le pH du milieu, la concentration, le solvant et le type d'oxyde [88]. Le type d'interaction entre l'atome de phosphore et l'oxygène de l'hydroxyle peut différer selon la force de Lewis des atomes à la surface de l'oxyde métallique (Figure 118a). En effet, dans le cas d'une surface à forte acidité de Lewis, les liaisons (P-O-M) sont d'autant plus stables et fortes que l'atome P devient plus électrophile et induit des

hétérocondensations consécutives avec les hydroxyles. Dans le cas contraire, des liaisons hydrogènes peuvent se former en raison d'une plus forte affinité avec le phosphonate et les hydroxyles à la surface de l'oxyde métallique. De plus, la présence de trois atomes d'oxygène sur les phosphonates permet d'induire trois modes de chélation (mono-, bi- et tridentée). Les oxygènes peuvent alors être liés au même site métallique ou à différents atomes présents à la surface (Figure 118b) [299].

Les phosphonates sont alors intéressants, en comparaison des alcoxy-silanes, car ils forment des monocouches stables. Par ailleurs, ils sont moins susceptibles de se décrocher de la surface de l'oxyde par des réactions d'auto-condensation qui peuvent rompre les liaisons formées. Cela peut malgré tout arriver dans des conditions de déshydratation à forte température [298]. Également, les conditions de manipulation (les réactions de couplage des phosphonates sont souvent optimisées dans l'eau) et de stockage (sous air à 20°C) les rendent plus accessibles et moins contraignants que les aminosilanes ou les catéchols. Par ailleurs, les acides phosphoniques ont des affinités remarquables avec les oxydes métalliques ayant un fort degré d'oxydation tel que le titane (Ti^{4+}) [300]. Les stabilités hydrolytiques des monocouches lors de la formation des liaisons P-O-M sont alors meilleures que dans le cas des alcoxy-silanes et sont comparables à celles des catéchols [88, 301].

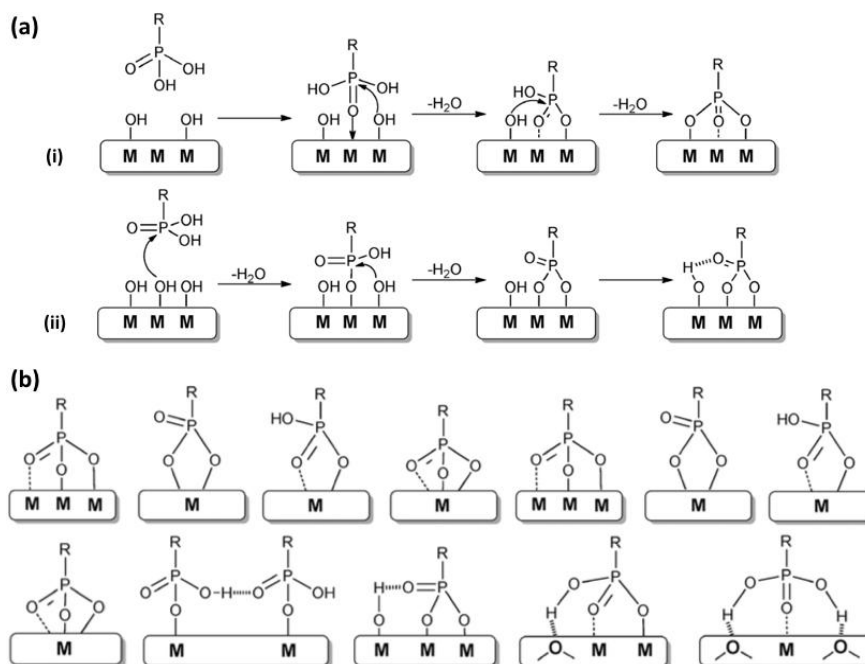


Figure 118 : (a) Présentation des deux principaux mécanismes de greffage d'un agent de type phosphonate sur une surface d'oxyde métallique. (b) Illustration des différentes conformations entre un phosphonate et la surface d'un oxyde métallique (chélation mono-, bi- et tridentée). D'après [88].

Enfin, les phosphonates utilisés lors de ces travaux de thèse sont, eux aussi, des molécules bifonctionnelles. D'un côté, le groupement phosphonate devrait posséder une forte affinité avec la surface des TiONts et de l'autre côté, une fonction réactive est présente pour générer un effet électrostatique susceptible d'améliorer la stabilité colloïdale des nanotubes et pour greffer ensuite d'autres molécules. Le choix s'est alors porté sur trois types de phosphonates : un monophosphonate (l'acide 6-phosphonohexanoïque nommé PHA), un bisphosphonate (l'acide alendronique, nommé ALD) et un poly(éthylène) glycol amino-phosphonique (dénommé $(HO)_2-(O)P-PEG-NH_2$). A notre connaissance, pour la première fois, ces deux dernières molécules ont été greffées à la surface de nanotubes de titanate. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Prof. Laurence Motte, de Paris XIII.

I.4.2. Choix de l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA), de l'acide alendronique (ALD) et d'un poly(éthylène) glycol de type phosphonate ((HO)₂-(O)P-PEG-NH₂)

Cette partie est consacrée au greffage de trois types de phosphonates en vue d'améliorer la stabilité colloïdale des nanotubes. Il s'agit de l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA), de l'acide alendronique (ALD) et d'un poly(éthylène) glycol de type phosphonate ((HO)₂-(O)P-PEG-NH₂) qui sont respectivement un monophosphonate, un bisphosphonate et un polymère avec un groupement phosphonate ($M = 2100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Figure 119). Ces agents sont tous des molécules hétérobifonctionnelles et le PHA a déjà été étudié au sein de notre laboratoire sur des nanoparticules d'oxyde de fer mais aussi lors de premières investigations sur les TiONts [18, 148]. Le PHA possède une fonction carboxyle à l'une des extrémités, tandis que l'alendronate et le polymère ont une fonction amine en plus de la fonction phosphonate.

Cette étude consiste aussi à comparer l'influence d'un monophosphonate et d'un bisphosphonate sur la stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. L'alendronate est particulièrement intéressant car il est déjà utilisé comme médicament anticancéreux (propriétés antitumorales), pour le traitement de l'ostéoporose et pour d'autres maladies osseuses [282, 302]. Enfin, la présence d'une longue chaîne carbonée, avec un groupement phosphonate d'un côté et une fonction amine de l'autre, devrait permettre d'avoir conjointement un effet stérique et un effet électrostatique, pouvant améliorer la stabilité colloïdale avec le polymère de type phosphonate.

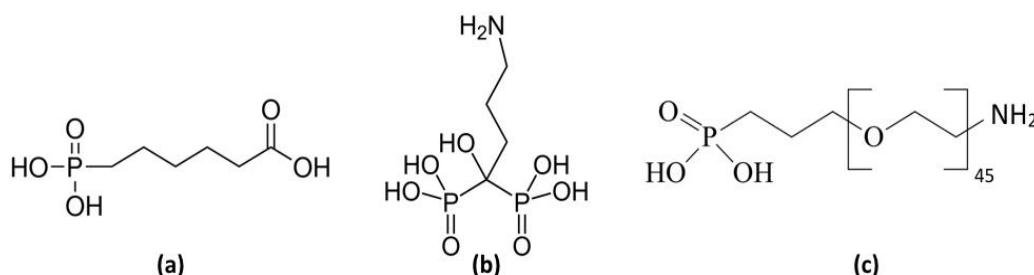


Figure 119 : Molécules (a) d'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA), (b) d'acide alendronique (ALD) et (c) d'un poly(éthylène) glycol amino-phosphonique ((HO)₂-(O)P-PEG-NH₂).

Il est à noter que l'alendronate possède cinq pKa ($\text{pKa}_1 = 0,8$ / $\text{pKa}_2 = 2,2$ / $\text{pKa}_3 = 6,3$ / $\text{pKa}_4 = 10,9$ en ce qui concerne les couples des deux phosphonates POOH/POO⁻ et $\text{pKa}_5 = 12,2$ pour le couple NH₃⁺/NH₂) (Figure 120). Dans une précédente étude, l'alendronate a été greffé à la surface de nanoparticules de maghémite à un pH égal à 2 *via* deux liaisons Fe-O-P (correspondant aux pKa_1 et pKa_2) [302]. Au pH 7,4 (pH physiologique), la charge négative du nanohybride alors obtenue était due à la déprotonation de la fonction OH du couple relatif au pKa_3 [302]. D'après la Figure 26, en théorie, afin de favoriser le greffage de l'alendronate *via* deux liaisons Fe-O-P, il est préférable de se placer à un pH compris entre 2,2 et 6,3. Cependant, le PIE des TiONts est d'environ 3 (Figure 48, Chapitre 2. 1.2.3.). Ainsi, pour former des liaisons Ti-O-P, il est préférable de se placer à un pH inférieur à 3 (Figure 120). Notons, qu'à pH 7,4, l'agglomération des TiONts est plus faible qu'en milieu acide (le potentiel zêta est de -35 mV en raison des groupements hydroxyles déprotonés). Il en est de même avec le PHA et avec le (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂ pour lesquelles les pKa du phosphonate sont aux alentours de 2 et 8,5. Finalement, le choix du pH doit tenir compte des pKa de ces trois molécules, de leur solubilité mais aussi, du PIE et de la stabilité des TiONts en suspension.

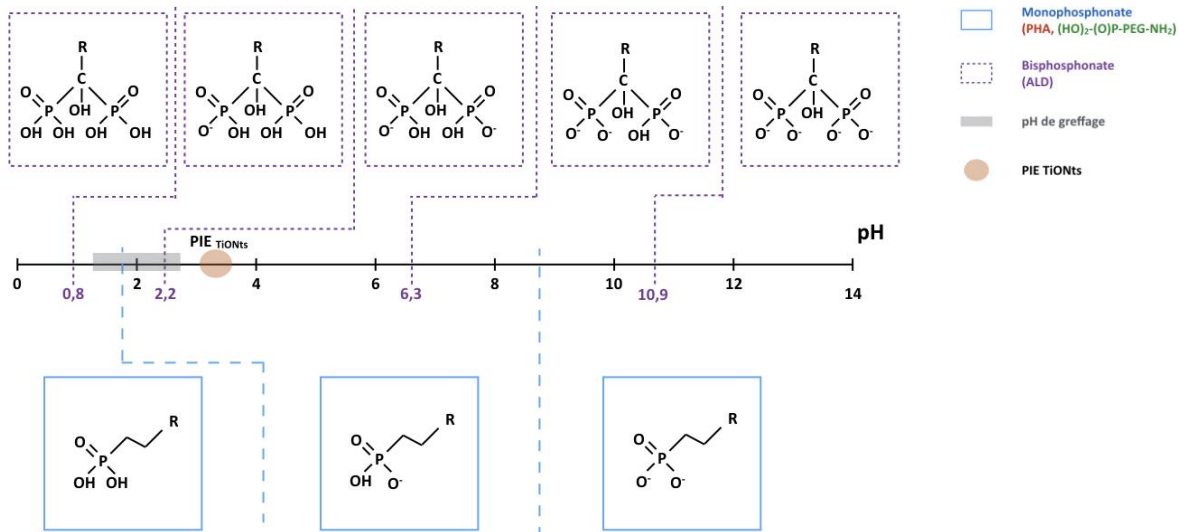


Figure 120 : Différentes formes acido-basiques des monophosphonates (PHA et $(\text{HO})_2\text{-(O)P-PEG-NH}_2$) et du bisphosphonate (ALD) selon la gamme de pH.

I.4.2.1. Protocole de greffage des agents de couplage de type phosphonate sur les TiONts

Le greffage de chacun des phosphonates est réalisé dans les mêmes conditions. Ainsi, le protocole décrit dans cette partie est le même, à quelques exceptions près qui seront exposées, pour les trois molécules (Figure 121).

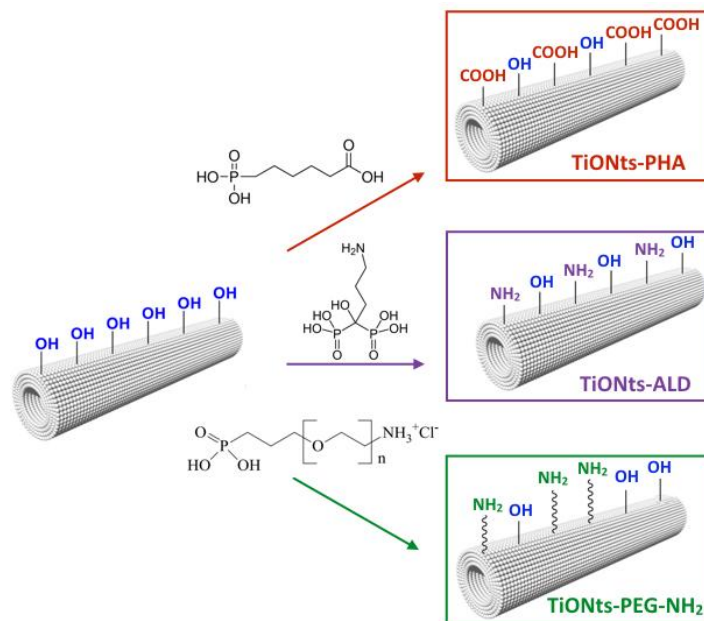


Figure 121 : Schéma des greffages des différents agents phosphoniques utilisés à la surface des TiONts.

Le pH de la suspension de TiONts ($\text{pH}_{\text{initial}} = 7$) est ajusté avec une solution de HCl à 1 M jusqu'à pH 2. En parallèle, le phosphonate est dissous dans une solution aqueuse (le pH initial de chacune des solutions est de 2 - 3). Cependant, contrairement aux autres molécules, l'alendronate est d'abord solubilisé à pH à 7 puis la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'HCl 1 M. Ensuite, la solution contenant le phosphonate est ajoutée lentement à la suspension de TiONts lors d'un traitement au bain à ultrasons pendant les 10 premières minutes de réaction pour favoriser la dispersion des TiONts, car ils ne sont pas stables à pH = 2 avec un potentiel de +8 mV (à proximité du PIE à pH = 3). Puis, la réaction est effectuée

sous agitation magnétique (400 tr/min) à 25°C (pH = 2 au cours de la réaction). Le rapport molaire est de 1 équivalent en hydroxyle se trouvant à la surface des TiONts pour 5 équivalents en phosphonate.

Après toute une nuit, la suspension est ultrafiltrée (100 kDa) afin d'éliminer les phosphonates non greffés. Entre chaque ultrafiltration, la suspension est redispersée dans de l'eau ultrapure afin d'optimiser le lavage de la suspension. Enfin, une partie des TiONts-phosphonates est lyophilisée pour les caractérisations sur poudre.

I.4.2.2. Mise en évidence des molécules de type phosphonate à la surface des TiONts

Des analyses IR sont menées pour prouver le greffage des différents phosphonates (Figure 122). Cette technique confirme la présence de ces molécules à la surface des TiONts pour chaque expérience avec l'apparition de nouvelles bandes de vibrations par rapport au spectre des TiONts nus. Parmi celles-ci, des bandes caractéristiques des fonctions phosphonates sont clairement identifiées avec les liaisons phosphonates (**P-O**) entre 1150 cm^{-1} et 920 cm^{-1} (bandes représentées en vert). Elles sont attribuées aux liaisons **P=O** ($\nu = 1130 \text{ cm}^{-1}$), **PO₃** ($\nu = 1030 \text{ cm}^{-1}$) et **P-OH** ($\nu = 960 \text{ cm}^{-1}$ et 920 cm^{-1}) [204, 280]. D'autres bandes de vibrations sont également observées entre 1550 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} mais aussi entre 3000 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} correspondant aux chaînes carbonées (bandes grises). Ces dernières sont plus intenses pour les TiONts-PEG-NH₂ avec la présence du polymère. Une autre bande de vibration, pour ce même échantillon, est observée et correspond aux liaisons **C-O_{PEG}** du polymère à 1100 cm^{-1} (bandes bleues). Ce large pic masque certaines liaisons du phosphonate puisque toutes ces bandes de vibrations se trouvent dans la même gamme de nombres d'onde. Malgré ceci, des pics caractéristiques de faibles intensités liées aux phosphonates sont observés entre 1150 cm^{-1} et 920 cm^{-1} . Les bandes de vibration de la liaison **C-N** ($\nu = 1230 \text{ cm}^{-1}$) et de la liaison **NH₂** ($\nu = 3200 \text{ cm}^{-1}$) tendent à prouver la présence de fonctions amines terminales, utiles pour de futurs greffages, ceci pour les TiONts-ALD et pour les TiONts-PEG-NH₂. Tandis que la fonction carboxyle du PHA est mise en évidence à 1750 cm^{-1} (**C=O**) et entre 3400 - 3200 cm^{-1} (**OH**).

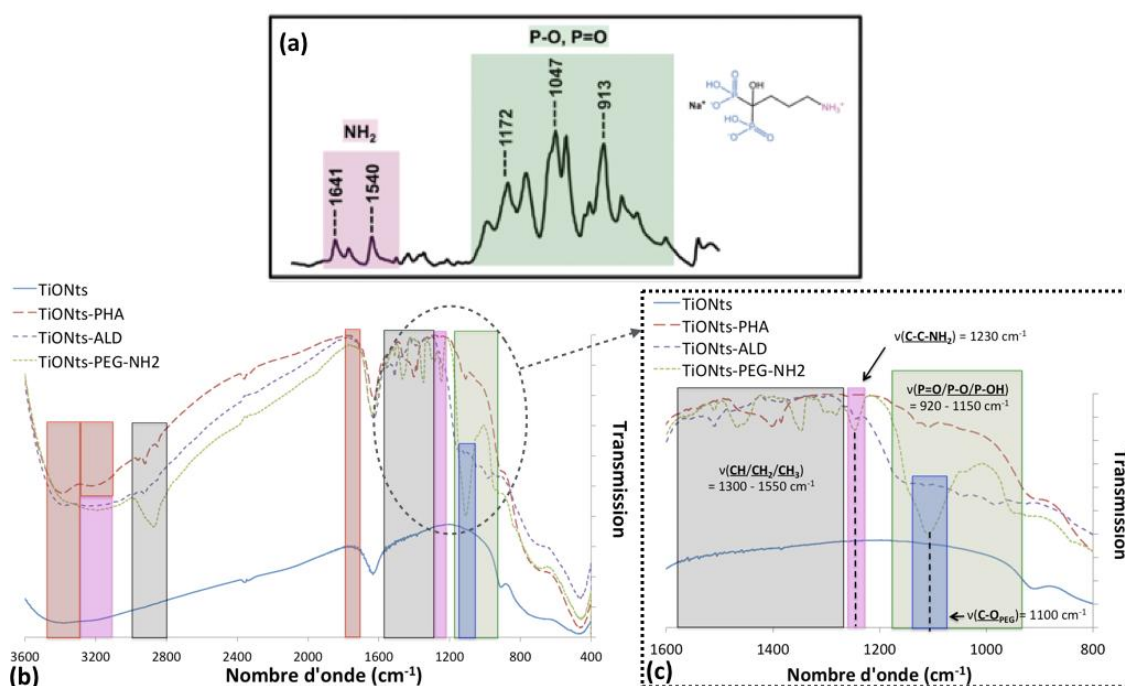


Figure 122 : Spectres IR de (a) l'alendronate seul [280] et des TiONts fonctionnalisés par le PHA, l'ALD et l'acide poly(éthylène) glycol amino-phosphonique de (b) 3600 cm^{-1} à 400 cm^{-1} et entre (c) 1600 cm^{-1} et 800 cm^{-1} .

Pour confirmer les résultats de la spectroscopie infrarouge, une analyse quantitative par XPS est réalisée afin de déterminer la composition chimique des nanotubes fonctionnalisés (Tableau 22). Des éléments chimiques propres aux molécules sont retrouvés tels que le phosphore mais aussi l'azote, propre à l'alendronate et au poly(éthylène) glycol amino-phosphonique. Le sodium est, quant à lui, éliminé lors du greffage puisque les réactions se sont faites en milieu acide (Chapitre 1. II.1.2.). Dans ces conditions, les ions Na^+ sont échangés avec les ions H^+ (ce qui est classique pour un tel pH).

Le PHA a déjà été étudié par XPS au sein du laboratoire par J. Paris [124]. Les valeurs expérimentales obtenues ici sont en accord avec les valeurs théoriques (formule chimique du PHA : $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_5\text{P}$). Pour les TiONts-PHA, le rapport atomique C/P est bien respecté puisqu'il est proche de 6 C pour 1 P, tout comme pour le PHA seul. L'analyse quantitative de l'alendronate seul (formule chimique $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{NO}_7\text{P}_2$) montre que les rapports atomiques des éléments, par rapport au phosphore, se rapprochent fortement de la composition chimique de la molécule. De plus, les concentrations atomiques montrent une augmentation des taux de carbone et d'oxygène, après greffage, par rapport aux TiONts nus, prouvant la présence de cette molécule. Enfin, le rapport atomique N/P est, lui aussi, proche de la valeur théorique puisque sur l'alendronate, il vaut 0,5 pour la molécule seule et 0,6 pour les TiONts-ALD. De plus, les concentrations atomiques des TiONts-PEG-NH₂ montrent une augmentation des taux de carbone et d'oxygène, après greffage, par rapport aux TiONts nus, prouvant la présence de cette molécule. Les concentrations atomiques du carbone et de l'oxygène sont plus importantes pour les TiONts-PEG-NH₂ comparées à celles des TiONts nus ou encore à celles des TiONts-ALD et à celles des TiONts-PHA en raison de la chaîne carbonée du polymère. Enfin, le rapport atomique N/P est à peu près respecté puisque pour le polymère seul, il est en théorie de 1 et s'approche de cette valeur (à la précision de la mesure près) pour les TiONts-PEG-NH₂. La proportion moindre de phosphore peut provenir du fait que la chaîne carbonée du polymère masque en partie cette contribution.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	P _{2p}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-
TiONts-PHA	19,5	58,0	-	19,0	-	3,5
% atomique (TiONts-PHA) / Ti	1,0	3,1	-	1,0	-	0,2
% atomique (TiONts-PHA) / P	5,8	16,6	-	5,4	-	1,0
PHA seul [124]	52,0	39,0	-	-	-	9,0
% atomique (PHA) / P	5,8	4,4	-	-	-	1,0
TiONts-ALD	16,0	58,7	-	16,9	3,0	5,4
% atomique (TiONts-ALD) / Ti	0,9	3,5	-	1,0	0,2	0,3
% atomique (TiONts-ALD) / P	3,0	10,9	-	3,1	0,6	1,0
ALD seul	32,1	49,0	-	-	6,5	12,4
% atomique (ALD) / P	2,6	4,0	-	-	0,5	1,0
TiONts-PEG-NH₂	27,4	55,5	-	15,5	0,9	0,7
% atomique (TiONts-PEG-NH₂) / Ti	1,8	3,6	-	1,0	0,05	0,06

Tableau 22 : Concentrations atomiques des molécules PHA et ALD, des TiONts et des nanohybrides TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ déterminées par XPS.

Les différents niveaux (O_{1s} , C_{1s} , N_{1s} et P_{2p}) des éléments chimiques sont décomposés pour à la fois prouver la présence des ligands à la surface des TiONts et déterminer si les liens entre les TiONts et les phosphonates sont covalents. La Figure 123 présente la décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} , N_{1s} et P_{2p} de l'ALD seul et des TiONts-ALD. La décomposition du niveau O_{1s} des TiONts-ALD met en avant des composantes correspondant à la fois aux TiONts nus et à l'alendronate seul. Les mêmes contributions que celles de l'ALD pur sont observées pour la décomposition du niveau N_{1s} et P_{2p} du nanohybride TiONts-ALD. En ce qui concerne le niveau O_{1s} des TiONts modifiés par l'ALD, les composantes caractéristiques des TiONts seules sont retrouvées : les oxygènes du réseau (O^{2-}) à 530,3 eV et les hydroxyles de surface (OH) à 531,6 eV. Cependant, une augmentation de la proportion de la composante à 531,6 eV révèle la présence d'autres liaisons à la surface des TiONts telles que les liaisons $P=O$. De plus, la composante à 529,8 eV (16,1%) atteste du greffage de l'alendronate sur les TiONts car elle est attribuée à la liaison $Ti-O-P$ [195]. D'autres attributions liées aux liaisons $P-O$ et aux liaisons $C-OH/P-OH$ de l'alendronate se situent respectivement à 530,9 eV et à 532,8 eV [303]. La décomposition du seuil C_{1s} des TiONts-ALD permet aussi de mettre en évidence l'apparition de nouvelles composantes telles que les liaisons $C-P$ et $C-NH_2$ à 286,1 eV par rapport aux TiONts nus. Par ailleurs, les mêmes composantes que celles de l'ALD sont retrouvées pour l'échantillon correspondant aux TiONts-ALD. D'autre part, en accord avec l'analyse quantitative du Tableau 22, l'apparition des seuils N_{1s} et P_{2p} sur les TiONts-ALD montrent la présence du bisphosphonate à la surface des TiONts. La décomposition du seuil N_{1s} laisse apparaître deux composantes à 399,7 eV et à 401,6 eV qui correspondent respectivement aux liaisons $C-NH_2$ et $C-NH_3^+$. Les proportions déterminées pour les composantes du niveau N_{1s} sont de 28,3% pour les liaisons $C-NH_2$ et de 71,7% pour les liaisons $C-NH_3^+$. En raison du pKa du couple NH_3^+/NH_2 de l'alendronate (12,2) et du pH de réaction (pH = 2), la forme $C-NH_3^+$ est privilégiée. Cette observation est en accord avec celle faite par l'analyse du potentiel zêta puisque la proportion plus élevée de la composante des $C-NH_3^+$ par rapport à celle des $C-NH_2$ conduit à une charge globale négative plus faible à la surface des TiONts fonctionnalisés à pH 2 (paragraphe I.4.2.4 et Figure 128).

Enfin, le niveau P_{2p} est décomposé pour l'alendronate seul et pour les TiONts-ALD. Ce seuil est assigné à deux composantes correspondant au $P_{2p(3/2)}$ à 133,1 eV et au $P_{2p(1/2)}$ à 134,1 eV. La différence d'énergie de liaison entre les composantes $P_{2p(3/2)}$ et $P_{2p(1/2)}$, de l'ordre de 0,9 – 1,0 eV, est conforme aux résultats de la littérature [304]. Le rapport des intensités entre ces deux composantes est respecté puisque la contribution $P_{2p(3/2)}$ est deux fois plus intense que la contribution $P_{2p(1/2)}$. Ces deux composantes sont attribuées à un seul type de liaison coïncidant aux PO_3^{2-} de l'ALD [305]. Les contributions P_{2p} sont retrouvées aux mêmes énergies de liaison entre l'ALD seul et l'ALD greffé sur les TiONts alors qu'il y aurait dû avoir un décalage vers les faibles énergies prouvant le greffage [304]. Ce décalage est en général expliqué par un environnement moins électronégatif pour les atomes d'oxygène du phosphonate, en raison des liaisons formées lors du greffage sur les nanoparticules, par rapport à la molécule seule. Par conséquent, l'environnement du phosphore est alors moins électronégatif et nécessite une énergie plus faible pour arracher un électron du niveau P_{2p} . Ce type de déplacement signifierait plutôt une interaction bi ou tri-nucléaire sur les nanoparticules (Figure 124). Or, ici, les résultats XPS du niveau P_{2p} ne montrent pas ce décalage, évoquant l'hypothèse d'une interaction de type mono-nucléaire pour l'alendronate sur les TiONts, à ce pH de réaction. L'IR tend à confirmer cette interaction avec l'observation d'une bande à 960 cm^{-1} pour le greffage de l'ALD correspondant à la liaison $P-OH$ (Figure 122). Cette bande affirme qu'il y aurait davantage de liaisons $P-OH$ pour ces conditions de greffages, suggérant également une interaction de type mono-nucléaire.

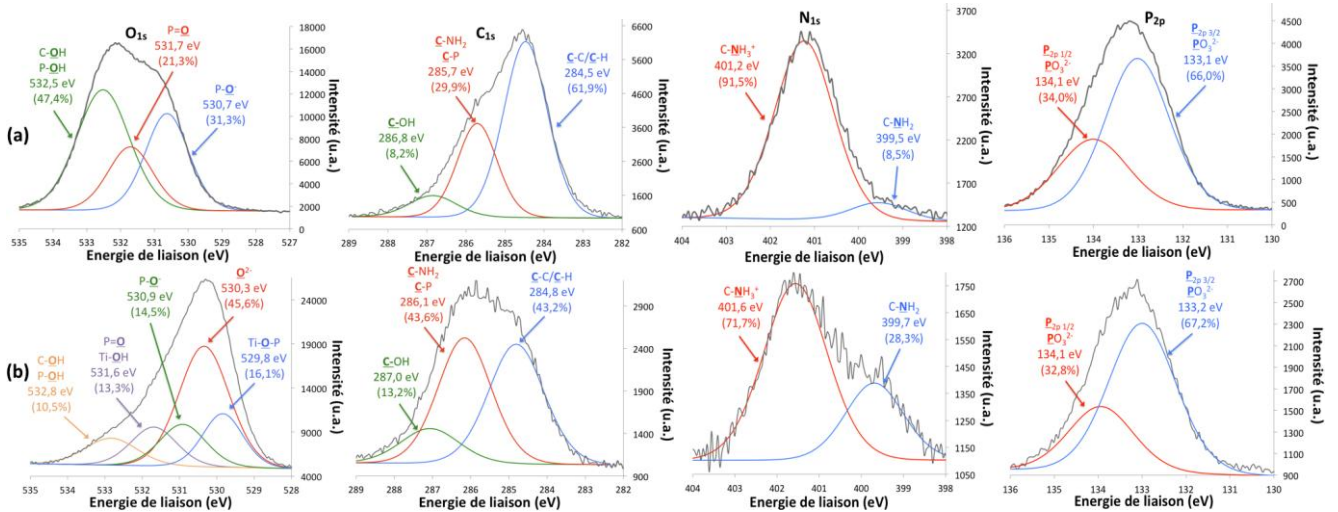


Figure 123 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s}, C_{1s}, N_{1s} et P_{2p} de l'ALD seul (a) et des TiONts-ALD (b).

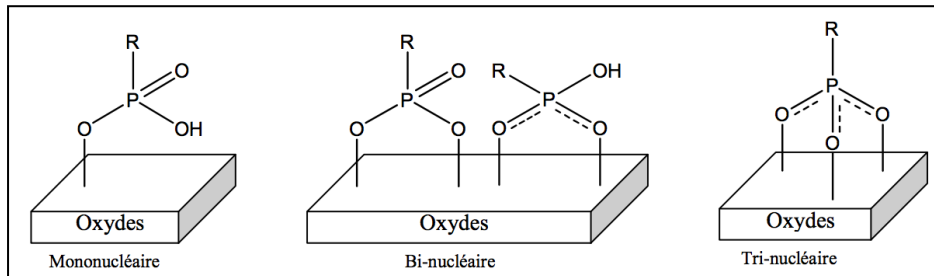


Figure 124 : Différents modes d'interaction des phosphonates avec la surface des oxydes [304].

En ce qui concerne la décomposition des différents niveaux des TiONts fonctionnalisés par le (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂, les résultats montrent de grandes similitudes avec les TiONts-ALD. Brièvement, la composante à 529,2 eV (12,2%) du niveau O_{1s} prouve la formation de la liaison Ti-O-P entre les TiONts et les phosphonates des TiONts-PEG-NH₂, (Figure 125). Le décalage de cette contribution, vers des énergies de liaisons plus faibles par rapport au greffage de l'ALD sur les TiONts (529,8 eV), tend à prouver que cette liaison est moins forte que dans le cas du greffage de l'ALD. Les atomes d'oxygène de cette molécule semblent moins liés au phosphore mais aussi au titane. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'ALD est un bisphosphonate alors que le (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂ est un monophosphonate.

D'autres composantes du niveau O_{1s} mettent en avant l'apparition de nouvelles contributions comme les liaisons P-O⁻ (530,9 eV ; 5,5%), C-O_{PEG}, P=O (532,0 eV ; 27,7%) et P-OH (532,9 eV ; 5,2%) correspondant à la molécule greffée. La décomposition du seuil C_{1s} des TiONts-PEG-NH₂ met en évidence de nouvelles composantes par rapport aux TiONts seuls, telles que les liaisons C-P, C-NH₂ [195, 258] et surtout les C-O_{PEG} à 286,3 eV (57,7%). D'autre part, il est possible de visualiser les seuils N_{1s} et P_{2p} malgré leur intensité très faible par rapport à ceux observées pour les TiONts-ALD. En les décomposant, les mêmes composantes que celles du bisphosphonate sont retrouvées à la surface des TiONts.

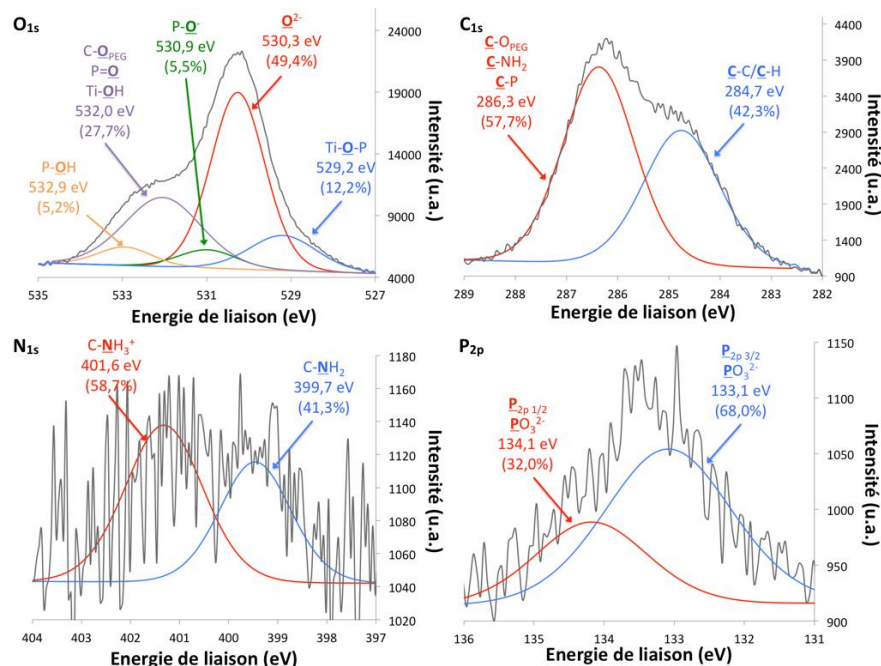


Figure 125 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} , N_{1s} et P_{2p} des $TiONts-PEG-NH_2$.

Quant aux $TiONts-PHA$, en plus de retrouver les composantes liées aux groupements phosphonates, la décomposition du niveau O_{1s} permet notamment de mettre en évidence la fonction carboxyle de cette molécule à 531,6 eV ($(C=O)-OH$) et à 532,7 eV ($(C=O)-\underline{O}H$) (Figure 126). Cette même fonction est observée à 285,9 eV ($\underline{C}-OH$) et à 288,2 eV ($\underline{C}=\underline{O}$) sur le seuil C_{1s} . Enfin, contrairement aux deux autres phosphonates, la liaison $Ti-\underline{O}-P$ n'est pas identifiée *via* cette analyse. L'IR et l'XPS ont alors prouvé la présence de ces trois molécules à la surface des $TiONts$.

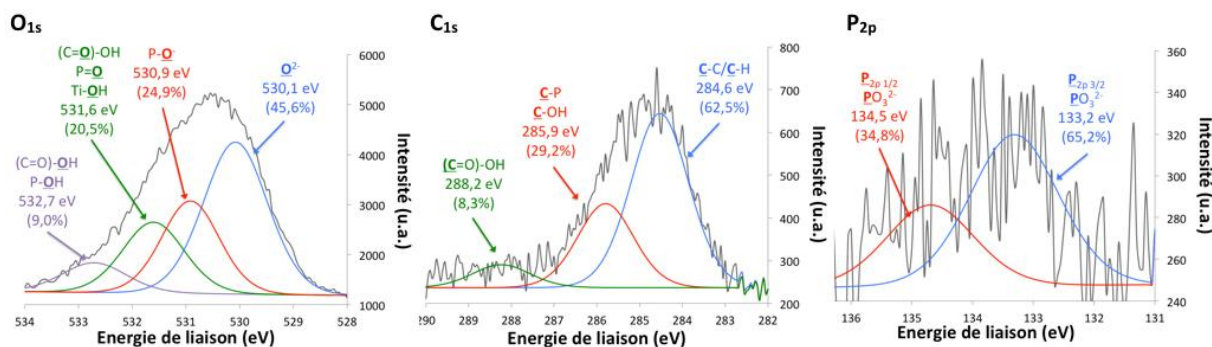


Figure 126 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} et P_{2p} des $TiONts-PHA$.

I.4.2.3. Estimation de la quantité des phosphonates à la surface des $TiONts$

Les différents nanohybrides sont caractérisés par ATG, sous air avec une rampe de 5°C/min, afin de déterminer le taux de greffage des phosphonates à la surface des $TiONts$ (Tableau 23 et Figure 127). D'après l'allure des courbes ATG et DTG, une partie de ces hydroxyles est bien remplacée par le PHA, l'ALD ou le $(HO)_2(O)P-PEG-NH_2$ (Figure 127). Le taux de greffage du PHA sur les nanotubes, calculé toujours à partir de l'Équation 3, est supérieur à celui obtenu pour l'alendronate et pour le polymère ($1,1 \text{ PHA} \cdot \text{nm}^{-2}$, $0,6 \text{ ALD} \cdot \text{nm}^{-2}$ et $0,2 \text{ (HO)}_2\text{(O)P-PEG-NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$) car c'est un monophosphonate ne possédant pas de longues chaînes carbonées. Ainsi, le PHA consomme deux fois moins de fonctions hydroxyles en surface des tubes. Il est donc normal de trouver un taux de greffage quasiment doublé pour le PHA par rapport à l'alendronate.

Notons que la quantité de polymère greffé (HS-PEG₃₀₀₀-COOH) sur les tubes par couplage peptidique EDC/NHS était largement plus faible : 0,2 (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂.nm⁻² *versus* 0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻², *i.e.* plus de 3 fois plus (Chapitre 2. II.2.2.). En comparaison avec le greffage du PHA, autre molécule possédant également un seul groupement phosphonate, le greffage de l'acide poly(éthylène) glycol amino-phosphonique est amoindri en raison de l'encombrement stérique du polymère par rapport au PHA. Par ailleurs, le rayon de giration (R_G) d'un PEG₂₀₀₀ (comme c'est le cas pour le polymère (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂) est autour de 2 nm théoriquement, alors qu'ici la densité de greffage atteint 0,2 chaîne.nm⁻², soit une surface par chaîne de 5 nm², bien inférieure à la surface projetée d'une chaîne en solution pour un polymère de ce même poids moléculaire ($\pi R_G^2 = 13 \text{ nm}^2$) : les chaînes de PEG greffées semblent donc très étirées (conformation en « brosse », Annexe 2).

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻²	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONT ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-PHA	195	8,3	196,1	1,1 (±0,1) PHA	5	6 020
TiONts-ALD	185	8,3	249,1	0,60 (±0,05) ALD	3	3 280
TiONts-PEG-NH ₂	160	17,5	2100	0,2 (HO) ₂ -(O)P-PEG-NH ₂	1	1 100

Tableau 23 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ par ATG.

(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

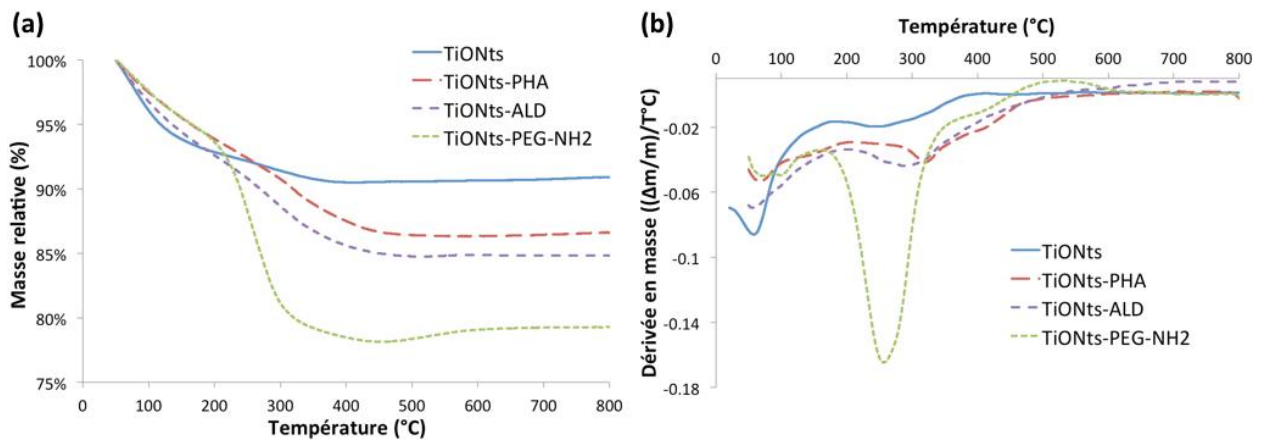


Figure 127 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

Ainsi, les pertes de masse plus importantes en ATG prouvent la présence de ces molécules à la surface des TiONts et confirment les nouvelles bandes de vibration observées par spectroscopie infrarouge et les évolutions des concentrations atomiques et les décompositions des seuils Ti_{2p}, O_{1s}, C_{1s}, N_{1s} et P_{2p}, déterminées par XPS.

I.4.2.4. Influence du greffage des différentes molécules phosphoniques sur la stabilité colloïdale

Le greffage de chacune des molécules sur les TiONts affecte le potentiel zêta de ces derniers puisque les PIE sont décalés vers un pH plus faible pour les TiONts-ALD et plus élevé pour les TiONts-PHA et les TiONts-PEG-NH₂ comparés aux TiONts nus (Figure 128). Les TiONts-PHA et les TiONts-PEG-NH₂,

possédant tous deux une unique fonction phosphonate, montrent le même PIE aux alentours de 4,2. Par ailleurs, la présence de la chaîne carbonée permet d'écranter les charges à la surface des TiONts modifiés par le polymère. Ainsi, au pH physiologique, le potentiel zêta passe de -28 mV pour les TiONts nus à -25 mV pour les TiONts-PHA et à -5 mV pour les TiONts-PEG-NH₂. Ce potentiel légèrement négatif peut être dû aux hydroxyles de surface des TiONts et aux POO⁻ majoritaires face aux NH₃⁺ (Figure 120). Concernant les TiONts-PHA, la fonction carboxylate favorise les charges négatives à pH 7,4 améliorant ainsi la répulsion de type électrostatique. La même tendance est observée pour les TiONts-ALD et les TiONts-PHA pour des pH au-dessus de 6,5. En effet, le potentiel des TiONts-ALD et des TiONts-PHA indique qu'il y a en majorité des charges négatives en raison de la déprotonation des groupements hydroxyles des TiONts demeurant en surface (Figure 121) mais aussi en raison des fonctions POO⁻, ce qui est normal au vu des 3 premiers pKa de l'alendronate : 0,8 ; 2,2 ; 6,3 (proches de ceux du PHA) (Figure 120). Le PIE des TiONts-ALD est proche de 2,2 et ces nanohybrides présentent un potentiel zêta d'environ -25 mV au pH physiologique. Ces résultats montrent que la formation de la liaison Ti-O-P à pH 2 est alors particulièrement favorisée pour les agents monophosphoniques en raison d'une quantité moins importante de groupements P-O⁻ (Figure 120). Mais aussi, la quantité d'OH résiduels est susceptible d'être plus faible en surface des TiONts car le taux de greffage est plus important par rapport aux bisphosphonates.

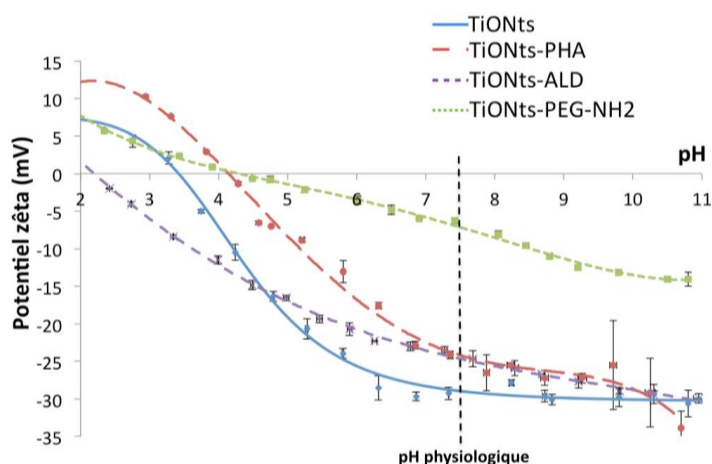


Figure 128 : Évolution des potentiels zêta en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

L'étude de la stabilité, par absorbance UV-vis dans du PBS (pH 7,4 ; 0,1 M) à $\lambda = 600$ nm en fonction du temps pour les TiONts-PHA, les TiONts-ALD et les TiONts-PEG-NH₂, montre une meilleure stabilité colloïdale et une plus faible sédimentation, pour les trois nanohybrides, en comparaison avec les nanotubes non modifiés en surface (Figure 129).

Les stabilités colloïdales des TiONts-PHA et les TiONts-ALD sont comparables au pH physiologique, ce qui était attendu d'après l'analyse zétamétrique, puisqu'ils ont un potentiel de surface similaire à ce pH. *A contrario*, les TiONts-PEG-NH₂ sont moins stables au pH physiologique que les deux autres nanohybrides et ce, malgré la gêne stérique causée par les chaînes carbonées du polymère dont le taux ne semble pas suffisant. La très bonne stabilité colloïdale, à pH physiologique, des TiONts-PHA et des TiONts-ALD prouve, une fois de plus, la modification effective de surface des TiONts.

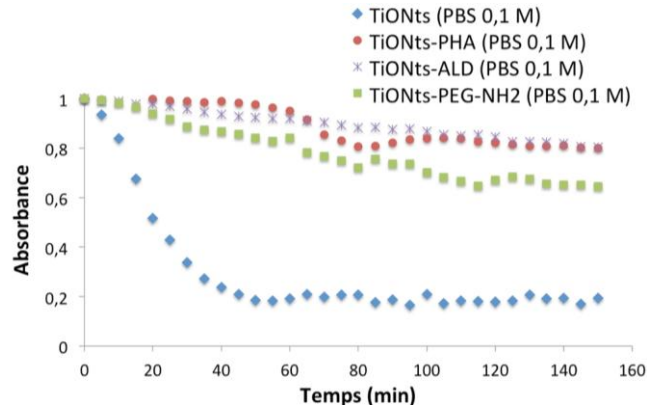


Figure 129 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ afin d'évaluer leur stabilité colloïdale.

L'état de dispersion des tubes, après les différents greffages du PHA, de l'ALD et du polymère (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂ est analysée par MET (Figure 130). Sur ces clichés, les greffages pour les TiONts-ALD et les TiONts-PHA semblent favoriser l'individualisation des nanohybrides, contrairement aux nanotubes nus qui s'organisent en fagots (Figure 43), même s'ils forment parfois quelques petits agglomérats. Ceci atteste, une fois de plus, que la modification de surface des TiONts par l'ALD et le PHA améliore grandement leur dispersion. Pourtant, ce sont les TiONts-PEG-NH₂ qui montrent une meilleure dispersion sur la grille d'observation alors qu'ils se sont révélés être moins stables par turbidimétrie. Ils présentent une dispersion homogène sur toute la surface observée, sans agglomérat : ce sont donc les chaînes du polymère qui doivent contribuer stériquement à cette individualisation. Cette analyse MET confirme donc les résultats ATG en montrant que cet état de dispersion est sans doute relié à une conformation en « brosse » du polymère. De plus, Cet état de dispersion remarquable (meilleur qu'avec le système TiONts/APTES/PEG) permet de visualiser quelques sous-produits de synthèse, comme des nanorubans, mais en quantité négligeable par rapport au nombre de nanotubes.

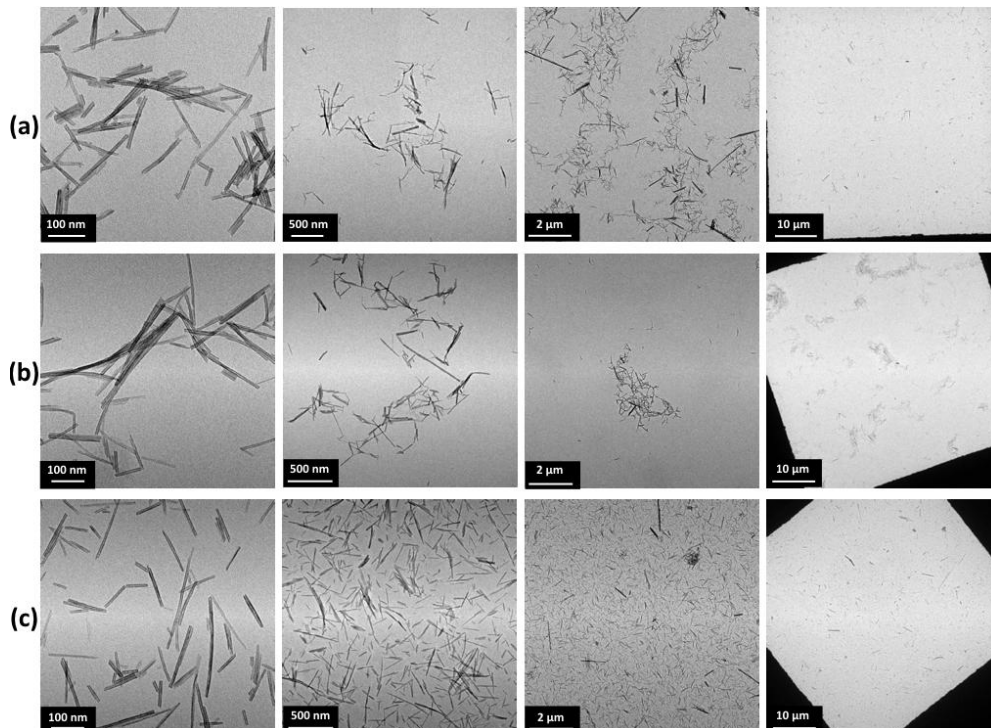


Figure 130 : Clichés MET des (a) TiONts-PHA, (b) TiONts-ALD et (c) TiONts-PEG-NH₂.

I.4.3. Conclusions sur les greffages des agents de couplage de type phosphonate, à la surface des TiONts

Les différentes caractérisations réalisées sur les nanohybrides TiONts-PHA, TiONts-ALD et TiONts-PEG-NH₂ ont mis en évidence la présence des agents de couplage de type phosphonate à la surface des nanotubes. Les analyses sur les différents greffages de phosphonates ont montré que les liaisons covalentes formées à la surface des TiONts sont principalement de type mono-nucléaire. Ce n'est pas étonnant puisque le pH de greffage était de 2 (Figure 120). Les résultats concernant la stabilité colloïdale de ces nanohybrides, dans les conditions physiologiques, sont les meilleurs en comparaison avec les autres systèmes : agents de couplage siloxaniques ou de type catéchols. Même si la quantité des phosphonates retrouvée à la surface des TiONts a été plus faible (1,1 PHA.nm⁻², 0,6 ALD.nm⁻² et 0,2 (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂.nm⁻²) par rapport aux greffages des alcoxysilanes et des catéchols, les taux de greffage sont restés suffisants pour envisager de futures fonctionnalisations avec leur fonction terminale disponible (ALD et (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂ : NH₂ ; PHA : COOH). Par ailleurs, le taux de greffage du PHA sur les TiONts-PHA a été supérieur à ceux de l'ALD et du polymère car c'est un monophosphonate ne possédant pas de longue chaîne carbonée pouvant gêner l'accrochage. De plus, le greffage du polymère par le groupement phosphonate qu'il possède à l'une de ses extrémités a permis d'améliorer significativement le taux de greffage par rapport au greffage d'un autre PEG *via* un couplage peptidique. La fonction amine à l'extrémité de l'ALD et du polymère permet d'envisager la même démarche que celle utilisée avec l'APTES afin de greffer le DTX sur les TiONts, *via* un polymère du type HS-PEG_n-COOH (le DTX est greffé sur la fonction thiol du PEG et le polymère s'accroche sur les TiONts *via* la fonction COOH).

I.5. Conclusions sur les greffages de divers agents de couplage à la surface des TiONts

L'étude du greffage de plusieurs molécules à la surface des TiONts, ayant la capacité de rendre leur surface plus réactive et d'améliorer leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques, a été réalisée avec succès. Les molécules utilisées et les conditions de synthèse ont été choisies de façon à créer une monocouche tout en optimisant le taux de greffage de chaque molécule. Les techniques d'analyses (IR, XPS, ATG, zêtamétrie, *etc.*) ont permis de prouver leur présence à la surface des TiONts avec des liens covalents entre le titane et les ligands. L'accroche des alcoxysilanes et des catéchols a montré que le pH de synthèse et la concentration des ligands étaient des paramètres importants pour optimiser le greffage de ces molécules. Cependant, le greffage de ces molécules sur les TiONts n'a pas montré d'amélioration significative sur la stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Les phosphonates ont, quant à eux, suscité une attention particulière, notamment en raison de l'état de dispersion remarquable et de la stabilité colloïdale très intéressants auxquels ils conduisent lorsqu'ils sont combinés avec les TiONts. Bien que leur taux de greffage soit plus faible que ceux des alcoxysilanes ou des catéchols, ils ont montré des résultats très satisfaisants.

Cependant, les études suivantes sont toutes réalisées à partir de l'APTES afin d'améliorer les résultats biologiques obtenus et de pouvoir les comparer avec les résultats présentés dans le Chapitre 2. (TiONts-APTES). Toutefois, la synthèse de ces nanohybrides est maintenant réalisée avec le nouveau protocole, établi dans ce chapitre.

II. Influence de la longueur de chaîne et du mode de couplage peptidique sur le greffage du PEG_n à la surface des nanotubes de titanate (HS-PEG_n-COOH ; n = 3000 ; 5000 ou 10 000)

Toujours dans le but d'optimiser le potentiel de notre système dans les conditions biologiques, cette partie se consacre à l'influence que pourrait avoir la longueur de chaîne carbonée du PEG, à la fois sur la stabilité colloïdale des TiONts et le taux de greffage à leur surface mais également sur l'activité biologique du DTX greffé. En effet, la longueur du polymère peut jouer un rôle important pour favoriser les interactions du DTX greffé sur les TiONts-DTX avec les tubulines présentes dans les microtubules afin de bloquer la division normale des cellules. Le polymère utilisé est alors le même que celui étudié dans le chapitre 2 (HS-PEG_n-COOH), seule la longueur de chaîne varie.

Le greffage des différents polymères est réalisé par deux stratégies de synthèse différentes. Dans un premier temps, les TiONts-APTES sont fonctionnalisés par le PEG_n en voie aqueuse (EDC/NHS) puis dans un second temps, le couplage peptidique, entre la fonction NH₂ de l'APTES à la surface des TiONts et le groupement COOH du PEG s'est effectué par voie organique (PyBOP). De plus, la modification de la longueur du PEG peut induire des comportements biologiques différents du nanohybride. Par conséquent, la cytotoxicité des nanohybrides est évaluée sur des cellules PC-3, lorsqu'ils sont couplés avec l'agent thérapeutique (DTX), pour les trois longueurs de chaîne carbonées envisagées.

II.1. Influence du greffage de différents PEG_n à la surface des TiONts en milieu aqueux : EDC/NHS (HS-PEG_n-COOH ; n = 3000 ; 5000 ou 10 000)

Le greffage des PEG_n sur les TiONts-APTES est réalisé selon le protocole décrit dans le Chapitre 2. mais avec différentes longueurs de chaîne PEGylée.

Brièvement, la fonction carboxyle du PEG_n est activée pendant 30 min sous agitation magnétique (400 tr/min) dans un tampon MES (0,1 M ; pH 5) en présence d'EDC et de NHS largement en excès (1 COOH : 100 EDC : 200 NHS). La solution d'activation est ensuite ajoutée lentement dans la suspension de TiONts-APTES redispersée dans du PBS à (0,1 M ; pH 7,4). Le rapport molaire engagé est de 3 moles de NH₂ à la surface des TiONts pour 1 mole de PEG_n. La réaction est maintenue à température ambiante sous agitation magnétique (400 tr/min) pendant 24 h. Enfin, le produit (TiONts-PEG_n) est lavé et purifié par ultrafiltration (100 kDa) avant d'être lyophilisé. Les poudres ou suspensions sont alors prêtes pour être caractérisées par analyse IR-TF, ATG, zétamétrie et par spectroscopie UV-visible.

II.1.1. Mise en évidence du PEG_n à la surface des nanotubes de titanate

La présence du polymère avec les différentes longueurs de chaîne est observée à la surface des nanotubes de titanate lors de l'analyse IR-TF (Figure 131).

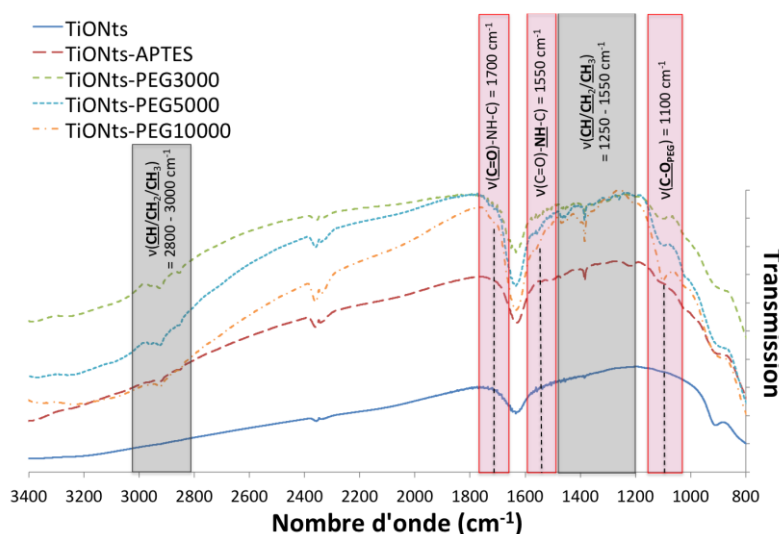


Figure 131 : Spectres IR-TF des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} (utilisation des agents de couplage : EDC/NHS).

De nouvelles liaisons de faible intensité font leur apparition à 1550 cm⁻¹ ((C=O)-NH-C) et à 1700 cm⁻¹ ((C=O)-NH-C). Elles sont caractéristiques de la liaison amide formée entre la fonction amine de l'APTES et la fonction carboxyle du PEG_n. Par ailleurs, la liaison C-O_{PEG} est une nouvelle fois visible à 1100 cm⁻¹ avec des intensités de plus en plus élevées au fur et à mesure que la longueur de la chaîne carbonée augmente. Il en est de même pour les liaisons caractéristiques des différents carbones aliphatiques (CH/CH₂/CH₃) entre 1550 – 1250 cm⁻¹ et entre 3000 – 2800 cm⁻¹.

II.1.2. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur les propriétés de TiONts

II.1.2.1. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur le taux de greffage

Les TiONts-PEG_n sont analysés par ATG sous air de 50°C à 800°C avec une rampe de 5°C.min⁻¹ afin de déterminer le taux de chaque polymère greffé (Tableau 24 et Figure 132). La perte de masse de chaque TiONts-PEG_n est plus conséquente que celle relative aux nanotubes nus mais elle est identique dans les trois cas et n'augmente pas, au fur et à mesure que la longueur de chaîne PEGylée augmente. En dépit d'un taux d'APTES plus faible qu'au cours du Chapitre 2. (mais sans doute sous la forme d'une monocouche plus dense et plus robuste), le taux de greffage de PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-APTES est similaire (0,05 PEG₃₀₀₀.nm⁻² ici vs. 0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻² (Chapitre 2. , Figure 59). De plus, la quantité de chaque polymère greffé à la surface des TiONts semble être liée à la longueur de la chaîne du polymère, puisqu'on voit que celle-ci diminue lorsque la longueur de chaîne augmente, sans doute pour des raisons d'encombrement stérique.

Notons par ailleurs que pour le greffage de ces différents PEG_{3000/5000/10000} *via* EDC/NHS à la surface des tubes, les surfaces de recouvrement par type de chaînes sont respectivement de 20, 35 et 62 nm². Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les surfaces projetées théoriques (πR_G^2) des

chaînes de 3, 5 et 10 kg/mol pour lesquelles les valeurs attendues de R_G sont respectivement de 2,5, 3,3 et 4,8 nm (ce qui fait 20, 35 et 72 nm² pour πR_G^2). Les chaînes greffées sont donc juste à la transition entre le régime en « champignon » et le régime en « brosse ».

La présence de chaque polymère est donc confirmée par IR-TF et par ATG, même si les taux demeurent faibles.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-PEG ₃₀₀₀	185	11,2	3073	0,050 (±0,004) PEG ₃₀₀₀	3	270
TiONts-PEG ₅₀₀₀	185	11,5	4847	0,029 (±0,002) PEG ₅₀₀₀	3	160
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀	185	11,4	9515	0,016 (±0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	90

Tableau 24 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} par ATG (utilisation des agents de couplage : EDC/NHS). (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

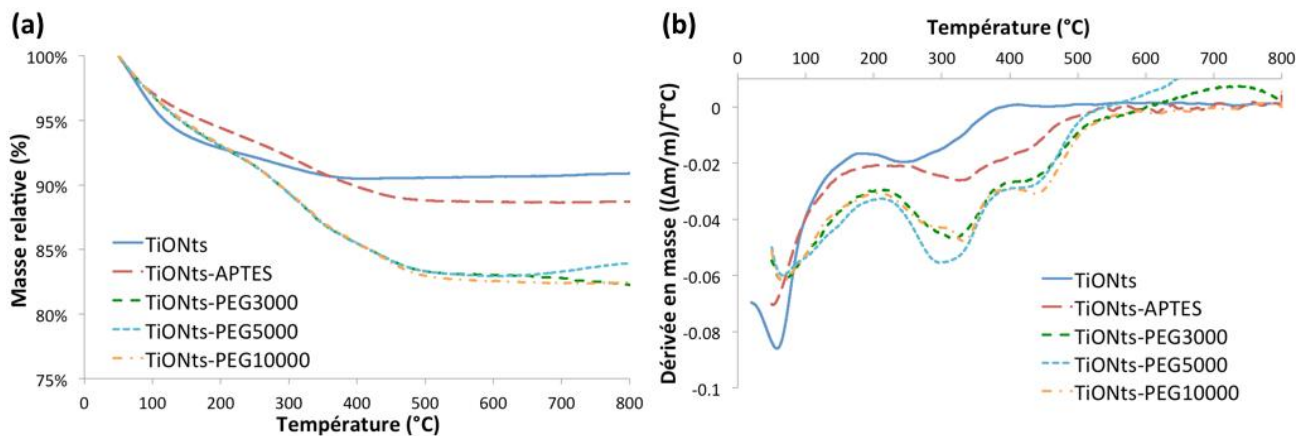


Figure 132 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹ (utilisation des agents de couplage : EDC/NHS).

II.1.2.2. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur la stabilité colloïdale des TiONts

La présence des PEG_n à la surface des TiONts modifiés par l'APTES est prouvée par zétamétrie avec l'observation d'un léger écrantage de charges, plus important pour les TiONts-PEG₅₀₀₀ et TiONts-PEG₁₀₀₀₀ (Figure 133). Le PIE est décalé vers des pH plus faibles ($PIE_{TiONts-PEG_n} = 5,5 - 6,5$) car le couplage des TiONts-APTES avec le polymère hétérobifonctionnel consomme des amines. Le potentiel zêta est resté aux alentours de celui obtenu pour les TiONts-APTES avec un potentiel de -10 mV environ au pH physiologique.

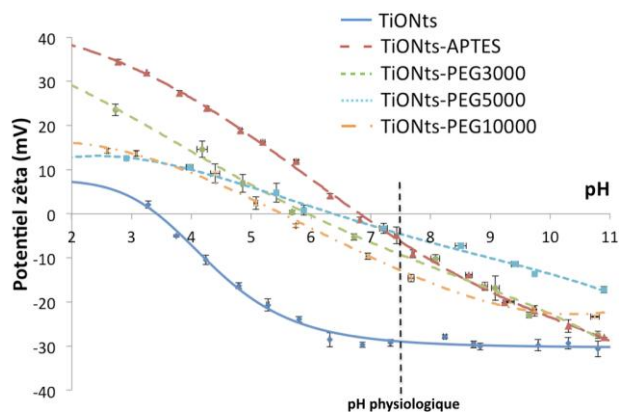


Figure 133 : Zétamétrie en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} avec l'utilisation des agents de couplage : EDC/NHS (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

La stabilité colloïdale des TiONts-PEG_n est alors observée en suivant leur absorbance en fonction du temps pendant 150 min à $\lambda = 600$ nm dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 134). Les TiONts-PEG_n montrent une meilleure stabilité, dans les conditions physiologiques, que les TiONts-APTES puisque les agents électrostatiques sont peu efficaces dans des milieux très ionisés. Pourtant, il n'y a pas de différence notable entre les différents poids moléculaires du polymère concernant la stabilité colloïdale des TiONts-PEG_n. Finalement, la modification de surface des TiONts par les différents polymères améliore significativement la stabilité colloïdale des suspensions au pH physiologique.

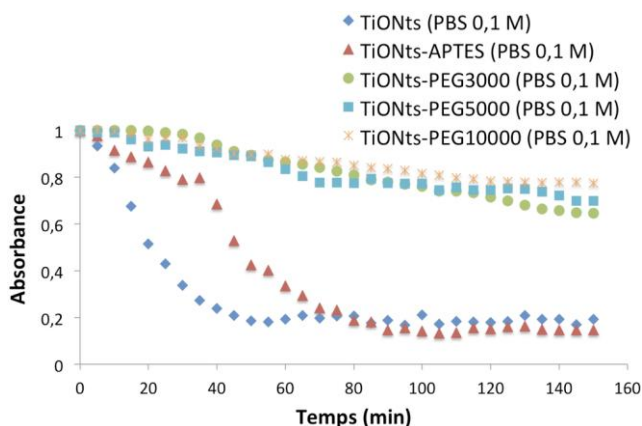


Figure 134 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} afin d'évaluer leur stabilité colloïdale (utilisation des agents de couplage EDC/NHS).

Une autre voie de greffage des polymères est envisagée dans la partie qui suit afin d'améliorer le taux de greffage de chaque polymère à la surface des TiONts. Ceci a pour objectif d'augmenter le nombre de fonctions thiols prêtes à être utilisées pour accrocher l'agent thérapeutique (DTX) afin d'optimiser la quantité de ce dernier à la surface des nanotubes.

II.2. Greffage des PEG_n sur les nanotubes de titanate en milieu organique (HS-PEG_n-COOH ; n = 3000 ; 5000 ou 10 000)

La même étude, que celle décrite précédemment, est réalisée mais cette fois-ci, avec un autre agent de couplage peptidique lors de la synthèse entre les TiONts-APTES et les polymères

HS-PEG_n-COOH (n = 3000, 5000, 10 000). Le réactif utilisé est le benzotriazol-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) afin d'activer la fonction carboxyle se trouvant sur l'une des extrémités du polymère et ce, en milieu organique [306].

II.2.1. Couplage peptidique par le PyBOP

Un nouvel agent de couplage peptidique, le PyBOP, est utilisé pour le greffage des polymères (Figure 135). C'est un dérivé du BOP ((benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate), qui est bien connu lors de la synthèse de peptides. Contrairement au BOP, le PyBOP permet d'éviter la formation d'un sous-produit cancérigène, l'hexaméthylphosphoramide (HMPA) [306]. Il est donc préférable d'utiliser cet agent de couplage peptidique même s'il s'est révélé moins efficace que le BOP. Cependant, il est montré que le rendement de couplage en milieu organique à l'aide du PyBOP est meilleur par rapport à une synthèse peptidique en voie aqueuse avec l'EDC/NHS [307].

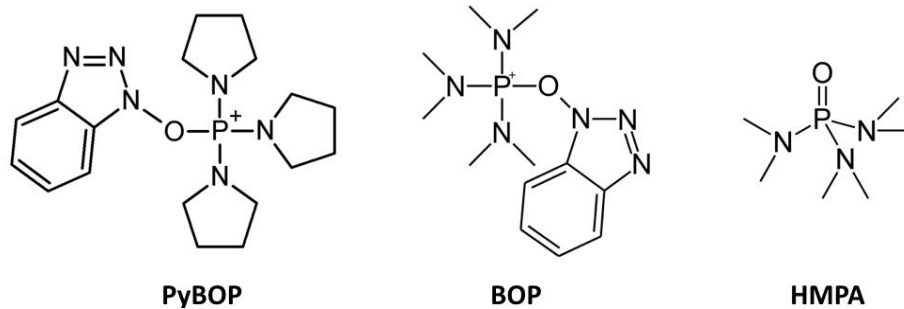


Figure 135 : Formule semi-développée du PyBOP, BOP et HMPA.

II.2.2. Synthèse des TiONts-APTES-PEG_n (n = 3 000, 5 000 ou 10 000) avec le PyBOP

Le protocole de greffage des PEG₃₀₀₀, PEG₅₀₀₀ et PEG₁₀₀₀₀ sur les TiONts est le même pour chaque synthèse. La fonction carboxyle de chaque polymère est activée par le PyBOP pendant 30 min sous agitation magnétique (400 tr/min). Cependant, cette activation nécessite d'être exempte de toute humidité pour optimiser le rendement de couplage. Pour ce faire, la réaction s'est déroulée sous une atmosphère contrôlée de N₂ dans du DMSO extra sec (anhydre, 99,99%, septum/N₂, tamis moléculaire) en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA). Cette base organique forte faiblement nucléophile permet d'optimiser le rendement de couplage en favorisant la formation de l'ester activé (Figure 136). Cette fois-ci, la quantité de PEG_n est équimolaire avec le PyBOP (1:1). En parallèle, les TiONts-APTES (sous forme pulvérulente) sont dispersés dans du DMSO. La suspension est alors ajoutée à la solution d'activation sous N₂ et sous agitation magnétique (400 tr/min). La quantité engagée lors de la synthèse est de 1 PEG_n pour 1 APTES (1:1) se trouvant à la surface des TiONts.

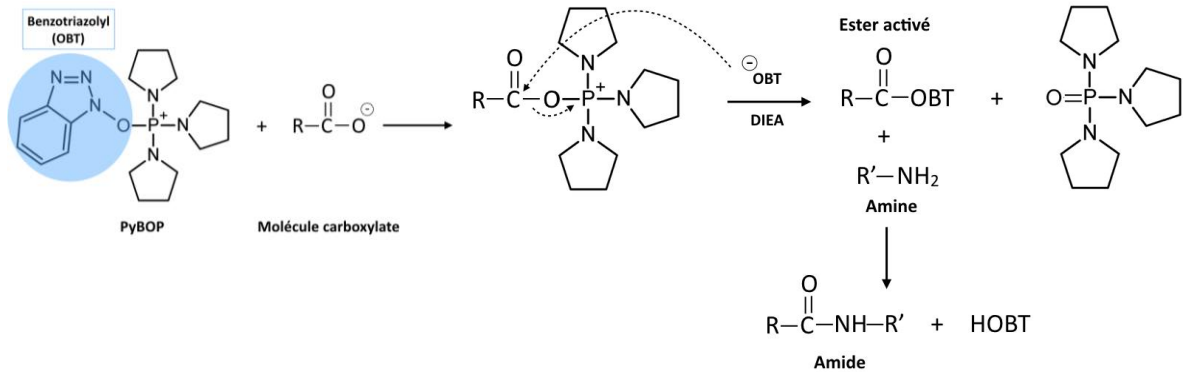


Figure 136 : Mécanisme de formation d'une liaison amide entre une fonction carboxylate et une amine primaire, en milieu organique et en présence du DIEA, par l'utilisation de l'agent de couplage peptidique : PyBOP.

Après une nuit, la suspension est centrifugée trois fois ($20\,000 \times g$; 20 min) pour éliminer principalement le DMSO, puis elle est redispersée dans de l'eau ultrapure. Elle est finalement ultrafiltrée (la membrane est en cellulose régénérée et possède un seuil de coupure de 100 kDa) jusqu'à obtenir une conductivité des filtrats inférieure à $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, avant qu'une partie soit lyophilisée.

II.2.3. Mise en évidence du PEG_n à la surface des nanotubes de titanate

Les différents nanohybrides obtenus par voie organique sont analysés par IR-TF (Figure 137). Les mêmes bandes de vibration sont observées entre les TiONts-PEG_n synthétisés par voie aqueuse ou organique. Cependant, les bandes caractéristiques du polymère et les liaisons formées lors du greffage avec le PyBOP sont plus intenses. En effet, les liaisons amides ($\text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{C}$ (1550 cm^{-1}) et $\text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{C}$ à (1700 cm^{-1}), qui se sont formées entre le NH_2 de l'APTES et le COOH des PEG_n, sont, une nouvelle fois, trouvées avec des bandes de vibration légèrement plus intenses (Figure 131 et Figure 137). Par ailleurs, la liaison $\text{C}-\text{O}_{\text{PEG}}$ est visible à 1100 cm^{-1} avec des intensités de plus en plus élevées au fur et à mesure que le polymère possède un poids moléculaire plus élevé. Il en est de même pour les liaisons caractéristiques des carbones aliphatiques ($\text{CH}/\text{CH}_2/\text{CH}_3$) entre $1550 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ et entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$.

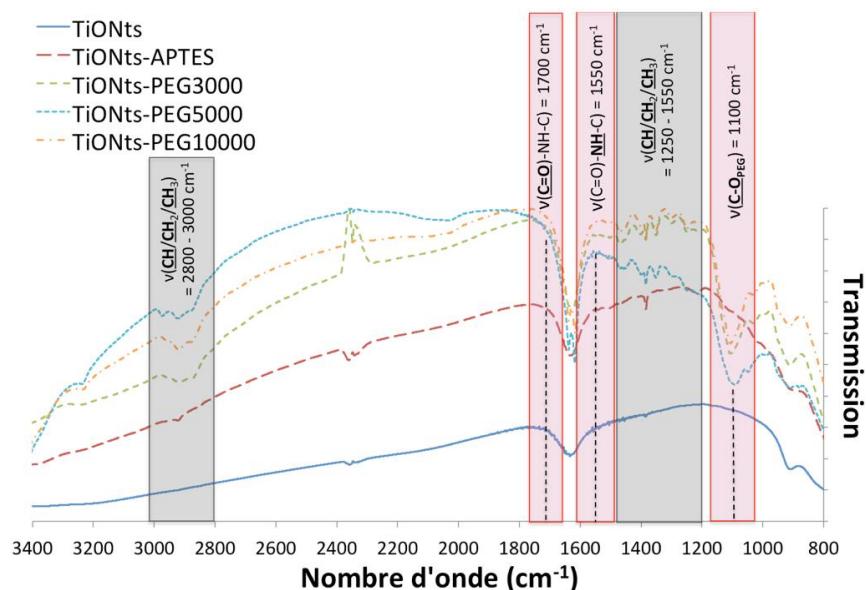


Figure 137 : Spectres IR-TF des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

Des analyses XPS sont réalisées pour évaluer la composition chimique à la surface des TiONts-PEG_n (Tableau 25). Les mêmes éléments chimiques que ceux des TiONts-APTES sont observés. Cependant, l'analyse quantitative révèle la présence des différents PEG_n sur les TiONts-APTES avec une augmentation des taux de carbone et d'oxygène de plus en plus élevés, alors que la longueur de la chaîne PEGylée augmente. En comparant les deux protocoles de greffage (aqueux et organique), on constate que les concentrations atomiques de ces éléments sont supérieures pour l'échantillon TiONts-PEG₃₀₀₀ synthétisés avec le PyBOP par rapport à celui synthétisé avec EDC/NHS (voir Chapitre 2. II.2.1.). De plus, le soufre (provenant des thiols), malgré sa très faible concentration atomique, n'est visible que pour les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les TiONts-PEG₅₀₀₀ obtenus par voie organique (pourcentage atomique du soufre : 0,3% pour les TiONts-PEG₃₀₀₀ et 0,2% pour les TiONts-PEG₅₀₀₀). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a une plus grande quantité de PEG à la surface des TiONts, par rapport aux TiONts-PEG₁₀₀₀₀ (voir paragraphe II.2.4.1.). Une diminution notable des teneurs de certains éléments chimiques tels que Ti_{2p} et Si_{2p} est observée, au fur et à mesure de l'utilisation d'un polymère de poids moléculaire plus important en taille, jusqu'à une disparition complète de l'élément Na. Ceci est à relier à la profondeur d'analyse de l'XPS (quelques nanomètres). En effet, le greffage du PEG_n, lorsqu'il est suffisant, cache partiellement les atomes se trouvant en profondeur.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}	S _{2p}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-	-
TiONts-APTES	11,2	56,8	5,7	21,5	2,3	2,5	-
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,5	2,6	0,3	1,0	0,1	0,1	-
TiONts-PEG₃₀₀₀	24,1	55,5	-	15,9	2,3	1,9	0,3
% atomique (TiONts-PEG₃₀₀₀) / Ti	1,5	3,5	-	1,0	0,2	0,1	0,02
TiONts-PEG₅₀₀₀	25,1	55,2	-	15,2	2,2	2,1	0,2
% atomique (TiONts-PEG₅₀₀₀) / Ti	1,6	3,6	-	1,0	0,2	0,2	0,01
TiONts-PEG₁₀₀₀₀	26,0	55,7	-	14,5	2,3	1,5	-
% atomique (TiONts-PEG₁₀₀₀₀) / Ti	1,8	3,8	-	1,0	0,2	0,1	-

Tableau 25 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

La décomposition des niveaux O_{1s} et C_{1s} des TiONts-PEG_n permet de mettre en avant le greffage du polymère en surface (Figure 138). Le seuil O_{1s} des différents TiONts-PEG_n permet de montrer l'apparition d'une composante à 533,2 eV ((C=O)-OH) liée à la fonction carboxyle du polymère. Par ailleurs, l'augmentation et le léger décalage de la composante à 532,2 eV, par rapport aux TiONts-APTES, prouvent la présence de nouvelles liaisons caractéristiques du greffage (Figure 138a-d(O_{1s})). Les liaisons de cette composante sont attribuées aux (C=O)-OH, (C=O)-NH-C et C-O_{PEG} montrant, une nouvelle fois, la présence du polymère avec la fonction carboxyle mais aussi, la formation de la liaison amide. Concernant le seuil C_{1s} des TiONts-PEG_n, la composante localisée à 286,4 eV (C-O_{PEG}, C-OH et (C=O)-NH-C) et l'apparition d'une composante à 288,2 eV ((C=O)-OH et (C=O)-NH-C) correspondent à la formation de liaisons amides caractérisant le greffage de chaque PEG sur les

TIONts-APTES et aux liaisons caractéristiques des polymères (Figure 138a-d(C_{1s})). De plus, les liaisons C-NH₂ de l'APTES n'ont probablement pas toutes réagi avec la fonction carboxyle du polymère lors de la synthèse. En effet, il est possible de retrouver la contribution de cette liaison à 286,4 eV. Enfin, les proportions des composantes sur les niveaux O_{1s} et C_{1s} diffèrent selon la longueur du polymère. En effet, une diminution notable est observée pour les composantes situées à 530,3 eV (O²⁻) et à 533,2 eV ((C=O)-OH) sur le niveau O_{1s} et à 288,2 eV ((C=O)-OH, (C=O)-NH-C) pour le seuil C_{1s}. Ceci est probablement dû, d'une part, à un effet d'écrantage, lorsque la taille de la chaîne carbonée du polymère augmente, masquant les liaisons en profondeur (oxygène du réseau) mais aussi, d'autre part, à une réduction de la quantité de PEG greffée en raison d'un fort encombrement stérique ((C=O)-OH, (C=O)-NH-C).

Toutes ces analyses XPS mettent en avant chaque PEG_n est greffé à la surface des nanohybrides correspondants.

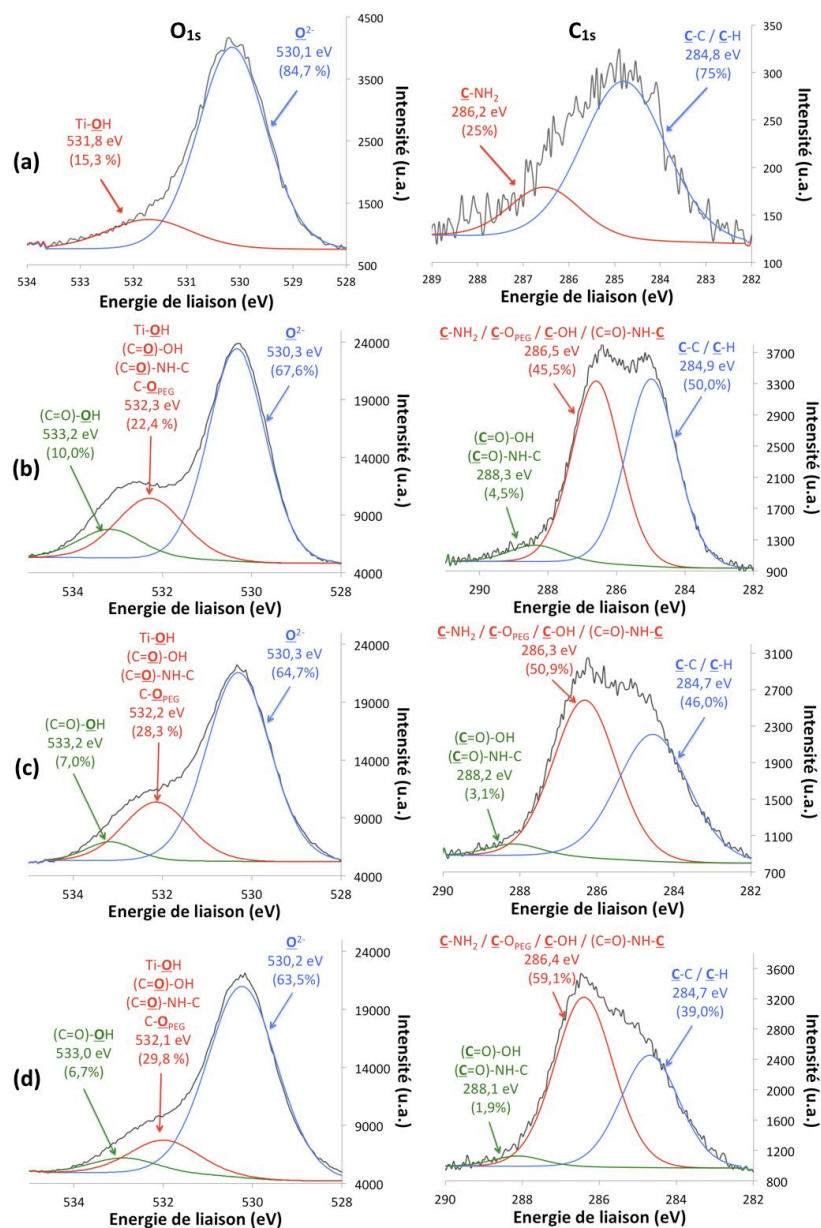


Figure 138 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} et C_{1s} des (a) TiONts-APTES, (b) TiONts-PEG₃₀₀₀, (c) TiONts-PEG₅₀₀₀, (d) TiONts-PEG₁₀₀₀₀ (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

II.2.4. Influence de la longueur de la chaîne carbonée sur les propriétés des TiONts

II.2.4.1. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur le taux de greffage

L'ATG montre une perte de masse plus conséquente après le greffage des PEG_n à la surface des TiONts, en raison de la quantité de matière organique supplémentaire. Cette technique permet de confirmer l'IR-TF et l'XPS en montrant que le greffage des PEG_n est plus efficace par voie organique que par voie aqueuse (Tableau 24/Tableau 26 et Figure 132/Figure 139). Le taux de greffage a alors presque doublé avec l'utilisation du PyBOP (taux de greffage par voie organique : 0,09 PEG₃₀₀₀.nm⁻² ; 0,05 PEG₅₀₀₀.nm⁻² ; 0,03 PEG₁₀₀₀₀.nm⁻² versus 0,05 PEG₃₀₀₀.nm⁻², 0,03 PEG₅₀₀₀.nm⁻², 0,016 PEG₁₀₀₀₀.nm⁻² par voie aqueuse). La quantité de chaque polymère à la surface des TiONts semble être liée à la longueur de la chaîne du polymère notamment pour des raisons d'encombrement stérique comme c'était le cas pour le greffage des PEG_n en milieu aqueux, en présence des agents de couplage EDC/NHS. Par conséquent, cette nouvelle voie de synthèse améliore le rendement de greffage. Il reste alors à évaluer la stabilité colloïdale des TiONts-PEG_n, notamment dans les conditions physiologiques.

Notons par ailleurs que pour le greffage de ces différents PEG_{3000/5000/10000} *via* le PyBOP à la surface des tubes, les surfaces de recouvrement par chaîne sont respectivement de 11, 20 et 33 nm². Ces valeurs sont environ deux fois inférieures par rapport aux surfaces projetées théoriques (πR_G^2) des chaînes de 3, 5 et 10 kg/mol pour lesquelles les valeurs attendues de R_G sont respectivement de 2,5, 3,3 et 4,8 nm (ce qui fait 20, 35 et 72 nm² pour πR_G^2). Les chaînes greffées conduisent donc à une conformation en « brosse » relativement dense.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-PEG ₃₀₀₀	170	17,6	3073	0,090 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	5	490
TiONts-PEG ₅₀₀₀	170	16,3	4847	0,050 (±0,003) PEG ₅₀₀₀	3	270
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀	170	18,8	9515	0,030 (±0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	160

Tableau 26 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} par ATG (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP). (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

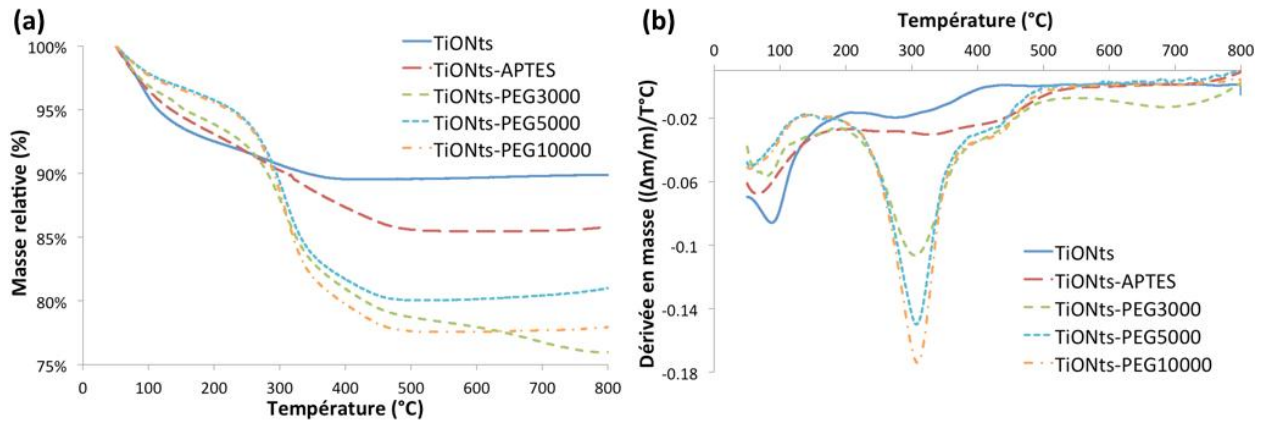


Figure 139 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹ (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

II.2.4.2. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur la stabilité colloïdale

La présence des PEG_n à la surface des TiONts modifiés par l'APTES est prouvée par zétamétrie avec l'observation d'un fort écrantage des charges. Cet écrantage est nettement plus marqué par cette voie de synthèse, en raison du taux de greffage supérieur des PEG_n sur les TiONts-APTES (déjà prouvé par ATG) et lorsque la longueur du PEG augmente, (Figure 133/Figure 140). Ce qui était attendu puisque la longueur de la chaîne carbonée tend à masquer les charges se trouvant en surface des TiONts. Ces résultats corroborent ceux d'ATG en confirmant une conformation en « brosse » des polymères à la surface des tubes. Le potentiel zêta est alors proche de 0 sur toute la gamme de pH. Ainsi, au pH physiologique, le potentiel zêta des TiONts-PEG_n varie entre 0 mV et -5 mV. De plus, le PIE est décalé vers des valeurs de pH encore plus faibles (similaire à celui des TiONts nus) comparé à l'étude des longueurs de chaîne PEGylées en voie aqueuse (PIE_{TiONts-PEG_n} en phase organique = 3,5 *versus* PIE_{TiONts-PEG_n} en phase aqueuse = 5,5 – 6,5).

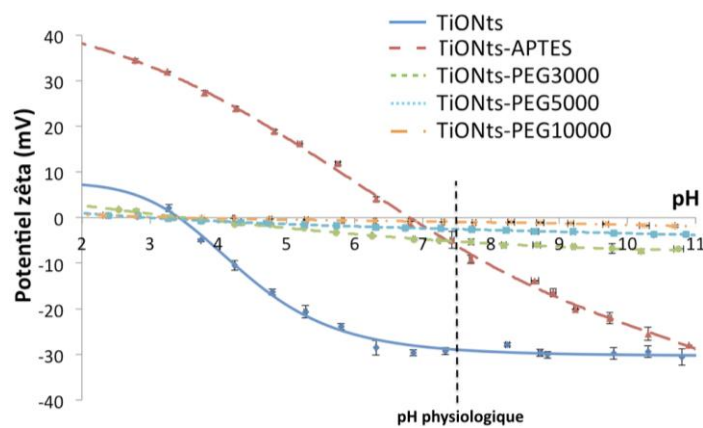


Figure 140 : Évolution des potentiels zêta en fonction du pH dans du NaCl (10⁻² M) des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} avec l'utilisation de l'agent de couplage : PyBOP. (La ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

Les mesures d'absorbance en fonction du temps (150 min ; $\lambda = 600$ nm) des TiONts-PEG_n montrent une meilleure stabilité colloïdale par répulsion stérique dans les conditions physiologiques (PBS 0,1 M ; pH 7,4) par rapport aux TiONts-APTES (Figure 141). Cependant, ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors du couplage peptidique avec l'EDC/NHS (Figure 134). Il est à noter qu'il n'y a toujours pas de différence de stabilité colloïdale entre les trois greffages de polymères sur les TiONts.

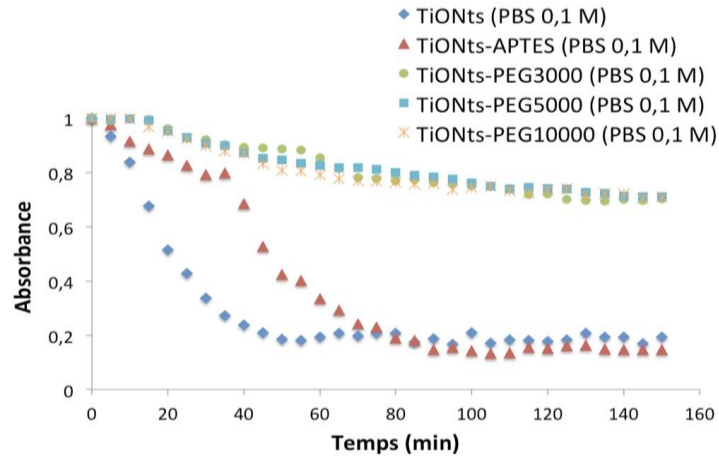


Figure 141 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm pour les TiONts, TiONts-APTES et TiONts-PEG_{3000/5000/10000} afin d'évaluer leur stabilité colloïdale (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

La dispersion des tubes, après le greffage des trois polymères, est également analysée par MET à partir d'une même concentration de suspension que lors des observations précédentes (Figure 142). Sur les images MET, le greffage des PEG_n à la surface des TiONts améliore grandement la dispersion du nanohybride et ce, quel que soit le PEG_n utilisé. Le greffage des PEG_n par voie organique favorise l'individualisation des nanohybrides, par rapport aux nanotubes seuls et aux TiONts-APTES. Malgré des taux de greffage de PEG différents, la longueur du polymère compense le nombre moindre de molécules greffées et conduit à un état de dispersion des nanohybrides équivalents. Cet état de dispersion remarquable permet de démontrer l'efficacité du couplage peptidique avec le PyBOP, sur les taux de greffage et sur la stabilité colloïdale des nanotubes fonctionnalisés en montrant une conformation en « brosse ».

II.2.4.3. Influence de la longueur de la chaîne PEGylée sur la survie cellulaire de cellules PC-3 en présence des nanohybrides TiONts-PEG_n-DTX

L'activation du DTX par le PMPI et le greffage du DTX-PMPI sur les TiONts-PEG_n se sont déroulés dans les mêmes conditions que celles décrites dans le Chapitre 2. III.2.

Les taux de greffage du DTX-PMPI à la surface des TiONts-PEG_n, déterminés par ATG, sont présentés Tableau 27 et Figure 143. La quantité d'agent thérapeutique greffée, dans le cas des TiONts-PEG₃₀₀₀ préparés par voie organique, est plus élevée que dans l'étude du Chapitre 2. (0,32 DTX.nm⁻² versus 0,24 DTX.nm⁻²), notamment en raison d'un nombre de polymères greffés plus important à la surface des TiONts. La quantité de DTX-PMPI est plus conséquente lorsque la taille de chaîne PEGylée est plus faible. En effet, un nombre de chaînes de polymères plus élevé à la surface des nanotubes favorise le greffage du DTX-PMPI. Par ailleurs, le taux de greffage de l'agent thérapeutique modifié est bien supérieur à la quantité de thiols présente à la surface des tubes (Tableau 11/Tableau 27). Pourtant, le DTX-PMPI est bien accroché à la surface des nanotubes puisque son taux de greffage ne varie malgré des lavages répétés par ultrafiltration (100 kDa) et ce, même avec un traitement préalable au bain à ultrasons pendant 10 min. En effet, le pH de greffage du DTX-PMPI sur les nanotubes (pH 7,4) *via* le maléimide du PMPI favorise la formation de liaisons covalentes avec les fonctions thiols des PEG_n mais il n'est pas impossible que le couplage se fasse aussi avec les fonctions NH₂ de l'APTES (perte de

spécificité du maléimide avec les thiols pour un pH > 7,5) (Figure 71) [265]. Par ailleurs, il est à noter que le taux de DTX-PMPI sur les TiONts-PEG₁₀₀₀₀-DTX est le même que celui du PEG₁₀₀₀₀ (0,03 DTX-PMPI.nm⁻² et 0,03 PEG₁₀₀₀₀.nm⁻²), ce qui semble être une conséquence directe de l'écrantage total de la surface organique (et donc des NH₂ résiduels). Ainsi, le DTX-PMPI aurait tendance à s'accrocher principalement sur les fonctions thiols apportées par le polymère.

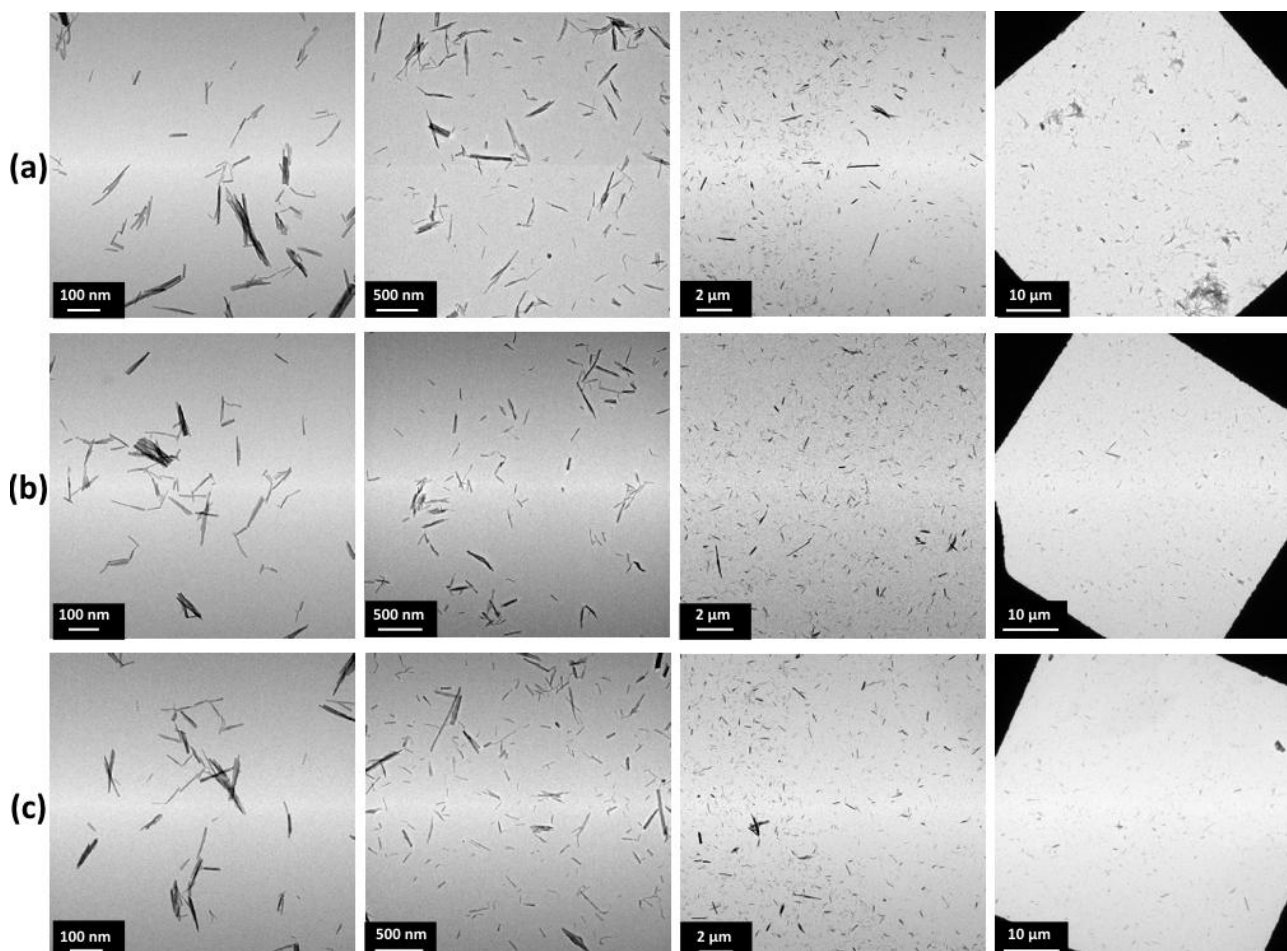


Figure 142 : Clichés MET des (a) TiONts-PEG₃₀₀₀, (b) TiONts-PEG₅₀₀₀, (c) TiONts-PEG₁₀₀₀₀ (utilisation de l'agent de couplage : PyBOP).

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	150	29,4	1049	0,32 (±) DTX-PMPI	2	1 750
TiONts-PEG ₅₀₀₀ -DTX	150	25,3	1049	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀ -DTX	150	19,9	1049	0,030 (±0,002) DTX-PMPI	2	160

Tableau 27 : Estimation des taux de greffage des TiONts-PEG_{3000/5000/10000}-DTX (voie organique) par ATG.

(*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

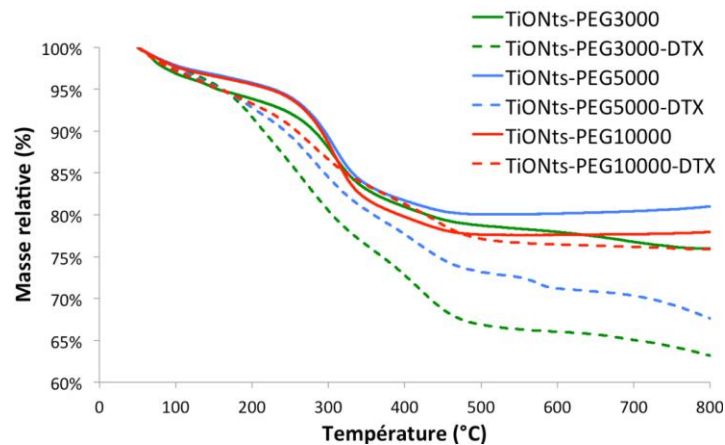


Figure 143 : Courbes ATG des $TiONts-PEG_{3000/5000/10000}$ (PyBOP) avant et après le greffage du DTX-PMPI sous air ($25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Une fois la quantité de DTX déterminée, des tests MTS sur des cellules PC-3 sont réalisés avec le DTX, le DTX-PMPI et les $TiONts-PEG_{3000/5000/10000}-DTX$ dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 2. Les résultats montrent que les $TiONts-PEG_n-DTX$ ont gardé une activité cytotoxique (Figure 144). La cytotoxicité des nanohybrides est plus faible que celle du DTX-PMPI, elle-même plus faible que celle du DTX seul, comme cela avait été observé dans le Chapitre 2. Cependant, ces résultats montrent un effet plateau à fortes doses aux alentours de IC_{50} pour chaque lot étudié. Cet effet plateau peut s'expliquer par un phénomène appelé catastrophe mitotique qui est une forme de mort cellulaire, sans que la cellule ne soit pour autant comptée comme morte par l'essai MTS [308]. C'est un mécanisme qui s'apparente davantage à un système de survie et de protection cellulaire qu'à un type de mort. L'activité cellulaire va alors se réorganiser pour se protéger de cette perturbation en redistribuant d'une façon non équitable les chromosomes entre les noyaux et va compromettre les compétences et les fonctions cellulaires. Ceci peut conduire à une morphologie apoptotique ou à la nécrose peu de temps après le dysfonctionnement de la mitose. Les IC_{50} du DTX et du DTX-PMPI sont décalés vers de plus fortes doses par rapport à l'étude *in vitro* du chapitre 2 : passage de 2,2 nM à 20 nM et passage de 18 nM à 35 nM respectivement (Figure 89). Cependant, l'activité cytotoxique des $TiONts-PEG_{3000}-DTX$ est environ trois fois plus forte que celle déjà observée (IC_{50} : de 100 nM *versus* 360 nM dans le Chapitre 2.). Notons que l' IC_{50} des $TiONts-PEG_{5000}-DTX$ est la même (IC_{50} de 100 nM). Par ailleurs, l' IC_{50} des $TiONts-PEG_{10000}-DTX$ (IC_{50} : 360 nM) est supérieure à celle des $TiONts-PEG_{3000/5000}-DTX$. Par conséquent, la longueur de chaîne PEGylée joue effectivement un rôle important sur l'interaction du DTX avec les cellules cancéreuses de prostate PC-3. Ces résultats montrent que le DTX a une meilleure efficacité lorsqu'il est accroché sur les $TiONts-PEG_{3000/5000}$. L'utilisation des chaînes les plus courtes ($PEG_{3000/5000}$ vs. PEG_{10000}) aurait tendance à favoriser les interactions entre le DTX et les microtubules. En dépit d'une charge de surface (Figure 140) et d'un état de dispersion semblable (Figure 141 et Figure 142), nous ne pouvons exclure un taux d'internalisation cellulaire plus faible pour les $TiONts-PEG_{10000}-DTX$ en comparaison avec les $TiONts-PEG_{3000/5000}-DTX$, ou alors un taux d'internalisation identique mais qui conduit, de fait, à moins de DTX dans les cellules puisque les nanohybrides $TiONts-PEG_{10000}-DTX$ sont moins « chargés » en DTX ($0,03 \text{ DTX}\cdot\text{nm}^{-2}$ vs. $0,24/0,32 \text{ DTX}\cdot\text{nm}^{-2}$).

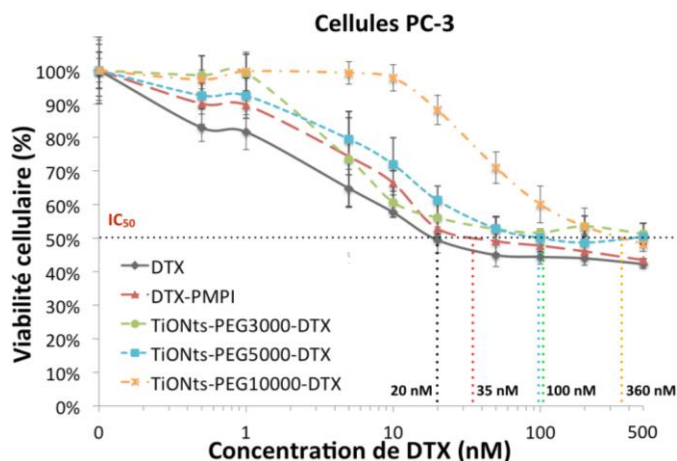


Figure 144 : Courbes de survie des cellules PC-3 en présence de DTX seul, DTX-PMPI et des TiONts-PEG_{3000/5000/10000}-DTX.

II.3. Conclusions sur l'influence de la longueur de chaîne PEGylée et du mode de couplage peptidique à la surface des TiONts

La voie de greffage des différents polymères en phase organique, grâce au PyBOP, a donné de très bons résultats. En effet, les taux de greffage à la surface des TiONts sont bien meilleurs que ceux trouvés avec les agents de couplage en phase aqueuse, EDC/NHS. Le greffage des PEG_n a pu être confirmé par plusieurs techniques de caractérisations (IR-TF, XPS, ATG, potentiel zêta, UV-visible, MET). De plus, la dispersion et la stabilité colloïdale des TiONts-PEG_n sont très prometteuses, même si la synthèse passant par une étape en phase organique nécessite de repasser par l'état de poudre (TiONts-APTES), ce qui peut induire de potentiels problèmes de redispersion. Par ailleurs, en augmentant le nombre de polymère à la surface des tubes, le nombre de DTX-PMPI a, lui aussi, augmenté (0,09 PEG₃₀₀₀.nm⁻², 0,32 DTX.nm⁻² vs. 0,06 PEG₃₀₀₀.nm⁻², 0,24 DTX.nm⁻²). De plus, l'utilisation d'un polymère avec un plus faible poids moléculaire a permis d'améliorer le taux de greffage du DTX-PMPI à la surface des tubes (PEG₃₀₀₀: 0,32 DTX.nm⁻²; PEG₅₀₀₀: 0,24 DTX.nm⁻²; PEG₁₀₀₀₀: 0,03 DTX.nm⁻²). En effet, l'encombrement stérique généré par le PEG sur les nanotubes s'est amplifié au fur et à mesure que le poids moléculaire du polymère augmentait. Les tests MTS ont montré des activités cytotoxiques intéressantes pour chacun des nanohybrides TiONts-PEG_n-DTX avec des IC₅₀ se rapprochant de celles du DTX seul et du DTX-PMPI. De plus, cette étude a démontré que le greffage d'un polymère avec un poids moléculaire élevé à la surface des tubes (le PEG₁₀₀₀₀) a diminué l'activité cytotoxique du DTX (TiONts-PEG₁₀₀₀₀-DTX, IC₅₀: 360 nM) et défavoriserait les interactions de l'agent thérapeutique avec les microtubules en comparaison d'une longueur de chaîne plus courte (PEG_{3000/5000}; IC₅₀: 100 nM) à moins que pas assez de TiONts n'aient été internalisés dans le cas des TiONts-PEG₁₀₀₀₀-DTX (leur taux de greffage en DTX étant beaucoup plus faible, beaucoup plus de tubes doivent être internalisés pour avoir le même effet). Au vu du phénomène appelé catastrophe mitotique, il serait judicieux de procéder à de nouveaux tests *in vitro* sur une lignée cellulaire PC-3 pour avoir des résultats comparables aux tests MTS effectués dans le chapitre 2. De plus, il est important de noter que le lot de docétaxel utilisé pour ce test MTS (IC₅₀ = 20 nM) était le même que celui utilisé pour les tests de cytotoxicité du chapitre 4 (IC₅₀ = 3,5 nM). Ainsi, les IC₅₀ plus élevées obtenues ici proviendraient d'une mauvaise croissance cellulaire. Il est alors indispensable de poursuivre cette étude par de nouveaux tests *in vitro*.

III. Conclusions

Le greffage de différents ligands (alcoxysilanes, catéchols, phosphonates) à la surface des TiONts a été une réussite et les caractéristiques de chaque greffage sont résumées dans le Tableau 28 et le Tableau 29. La surface des TiONts modifiée a gagné en réactivité, ce qui va permettre de greffer des molécules d'intérêt pour la biologie. Ces greffages ont aussi permis d'améliorer la stabilité colloïdale des nanotubes dans les conditions physiologiques. Les molécules utilisées et les conditions de synthèse ont été choisies de façon à envisager une monocouche tout en optimisant le taux de greffage de chaque molécule. La présence de ces molécules à la surface des TiONts et l'apport de nouvelles propriétés ont été confirmés par différentes techniques de caractérisations telles que l'IR-TF, l'XPS, l'ATG, la zêtamétrie et l'UV-visible. Le greffage des alcoxysilanes et des catéchols est moins attrayant en raison des conditions de greffage (solvant, pH, environnement, température) des concentrations engagées, des conditions de stockage des alcoxysilanes et des catéchols mais aussi en raison de stabilité colloïdale moindre des nanohybrides obtenus. Les phosphonates ont par contre démontré qu'ils induisent une stabilité colloïdale très intéressante des TiONts lorsqu'ils sont greffés à leur surface. Bien que leur taux de greffage soit plus faible que celui des alcoxysilanes ou des catéchols, ils ont montré des résultats bien meilleurs que ceux précédemment cités.

La deuxième partie de ce troisième chapitre s'est intéressée au greffage de plusieurs longueurs de chaînes PEGylées à la surface des TiONts, selon deux méthodes de greffage. Celle par voie organique (couplage peptidique avec le PyBOP) est la plus prometteuse avec des taux de greffages deux fois supérieurs à ceux obtenus par le couplage en voie aqueuse. Les caractérisations réalisées par IR-TF, XPS, ATG ont montré l'influence que pouvait avoir la longueur de chaîne carbonée sur le taux de greffage, la stabilité colloïdale et la dispersion des tubes. En effet, l'encombrement stérique généré par le PEG sur les nanotubes s'est amplifié au fur et à mesure que le poids moléculaire du polymère a augmenté. La voie de greffage en milieu organique a alors été choisie pour greffer le DTX afin d'observer l'influence de la longueur du polymère sur le comportement biologique *in vitro*. La quantité d'agent thérapeutique a été bien meilleure à la surface des TiONts lors de l'utilisation d'un polymère de poids moléculaire plus faible (PEG₃₀₀₀ : 0,32 DTX.nm⁻² ; PEG₅₀₀₀ : 0,24 DTX.nm⁻² ; PEG₁₀₀₀₀ : 0,03 DTX.nm⁻²). Nous avons aussi montré que l'activité cytotoxique du nanohybride final augmente lorsque le DTX est accroché sur les tubes en présence d'un PEG avec une plus petite longueur de chaîne carbonée (TiONts-PEG_{3000/5000}-DTX, IC₅₀ : 100 nM ; TiONts-PEG₁₀₀₀₀-DTX, IC₅₀ : 360 nM). Ceci prouve un meilleur accès des TiONts-PEG_{3000/5000}-DTX aux microtubules, suggérant une meilleure internalisation dans les cellules et des interactions plus favorables du DTX avec les microtubules en comparaison d'une longueur de chaîne plus longue.

Au vu des résultats très intéressants, le nouveau protocole de greffage de l'APTES sur les TiONts et l'utilisation du PyBOP pour greffer le polymère ont été retenus pour développer le nouveau nanohybride dans le chapitre suivant. Après avoir nettement amélioré les taux de greffages et la stabilité colloïdale du nanohybride, des nanoparticules d'or (AuNPs) sont greffées à la surface des TiONts-APTES dans le but d'améliorer l'efficacité radiosensibilisante du nanohybride.

Fonctionnalisation des nanotubes de titanate par divers agents stabilisants en vue d'améliorer leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques

Synthèses	Agents de couplage	Rapport molaire	Milieu réactionnel	pH de greffage	Température de greffage (°C)	Temps de réaction	Agitation magnétique (tr/min)	Purifications
Alcoxy-silanes								
TiONts-APTES (ancien protocole)	-	1 OH 10 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	9 - 10	25	24 h	400	* Évaporateur rotatif (250 mbar ; 80°C) * Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
TiONts-APTES (nouveau protocole)	-	1 OH 3 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	5	60	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
TiONts-AHAMTES	-	1 OH 3 AHAMTES	50% H ₂ O 50% EtOH	5	60	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Catéchols								
TiONts-catéchol	-	1 OH 3 catéchols	Aqueux	6	25	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Phosphonates								
TiONts-phosphonate	-	1 OH 5 phosphonates	Aqueux	2	25	16 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
PEG_n (HS-PEG_n-COOH, n = 3000, 5000, 10000) en milieu aqueux								
Activation du PEG _n	EDC/NHS	100 EDC 200 NHS 1 COOH	MES 0,1 M	5	25	30 min	400	-
TiONts-PEG _n	-	3 NH ₂ 1 COOH	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
PEG_n (HS-PEG_n-COOH, n = 3000, 5000, 10000) en milieu organique								
Activation du PEG _n	PyBOP	1 PyBOP 1 COOH DIEA en excès	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	0,5	400	-
TiONts-PEG _n	-	1 NH ₂ 1 COOH	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	24 h	400	* Centrifugation (20 000 g ; 20 min) * Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Activation du DTX par le PMPI	PMPI	1 DTX 4 PMPI	Tampon borate 0,1M	8,5	25	24 h	400	* Dialyse (0,5 - 1 kDa) * Lyophilisation
TiONts-PEG _n -DTX	-	1 PEG _n TCEP en excès 20 DTX-PMPI	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation

Tableau 28 : Procédures expérimentales des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre.

	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	-	3,3	-28	non	10,2 (\pm 1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	6,9	-6	non	2,6 (\pm 0,2) APTES	9	14 230
TiONts-AHAMTES	-	7,4	0	non	2,1 (\pm 0,2) AHAMTES	3	11 500
TiONts-LDOPA	-	3,3	-33	oui	1,2 (\pm 0,2) LDOPA	5	6 570
TiONts-DHCA	-	2,7	-33	oui	1,4 (\pm 0,2) DHCA	4	7 660
TiONts-NDOPA	-	6,3	-10	~ oui	2,8 (\pm 0,2) NDOPA	5	15 320
TiONts-PHA	-	4,2	-25	oui	1,1 (\pm 0,1) PHA	5	6 020
TiONts-ALD	-	2,2	-25	oui	0,60 (\pm 0,05) ALD	3	3 280
TiONts-PEG-NH ₂	-	4,2	-5	oui	0,2 (HO) ₂ -(O)P-PEG-NH ₂	1	1 100
TiONts-PEG ₃₀₀₀	EDC/NHS	6,0	-10	oui	0,050 (\pm 0,004) PEG ₃₀₀₀	3	270
TiONts-PEG ₅₀₀₀	EDC/NHS	6,5	-5	oui	0,029 (\pm 0,002) PEG ₅₀₀₀	3	160
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀	EDC/NHS	5,5	-15	oui	0,016 (\pm 0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	90
TiONts-PEG ₃₀₀₀	PyBOP	3,5	-5	oui	0,090 (\pm 0,005) PEG ₃₀₀₀	5	490
TiONts-PEG ₅₀₀₀	PyBOP	3,5	-3	oui	0,050 (\pm 0,003) PEG ₅₀₀₀	3	270
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀	PyBOP	3,5	-1	oui	0,030 (\pm 0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	160
TiONts-PEG ₃₀₀₀ -DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,32 (\pm 0,01) DTX-PMPI	2	1 750
TiONts-PEG ₅₀₀₀ -DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,24 (\pm 0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG ₁₀₀₀₀ -DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,030 (\pm 0,002) DTX-PMPI	2	160

Tableau 29 : Caractéristiques des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

**Chapitre 4. Couplage des
nanotubes de titanate avec des
nanoparticules d'or pour améliorer
l'effet radiosensibilisant en
présence de docétaxel**

Forts des résultats obtenus lors des chapitres précédents, notre volonté est d'améliorer le nanomédicament à base de TiONts, en augmentant son effet radiosensibilisant. Les nanoparticules d'or (AuNPs) ont montré un intérêt grandissant comme agents radiosensibilisants pour la thérapie anticancéreuse [19]. Les AuNPs ont la capacité de combiner la thérapie et l'imagerie par absorption des rayons X en raison de leur numéro atomique élevé ($Z = 79$) (voir Chapitre 1. II.2.) [19, 309]. Par ailleurs, les AuNPs présentent une faible toxicité et sont particulièrement bien tolérées par l'organisme humain [19, 164, 168]. Leur présence dans les sites malades permet d'accroître l'efficacité des doses de radiations. Des ligands sont déjà utilisés pour stabiliser les AuNPs tels que le DTDTPA (l'acide dithiolate diéthylènetriaminopentaacétique) mais aussi pour chélater des radioéléments pour l'imagerie nucléaire comme l'indium (voir Chapitre 1. II.2.5.) [163, 166, 183]. Le DTDTPA possède deux fonctions thiols à chaque extrémité de la molécule, ce qui lui permet d'avoir une forte affinité avec la surface des AuNPs mais aussi de créer des multicouches organiques par la formation de ponts disulfures entre deux molécules de DTDTPA. De plus, la présence de plusieurs groupes carboxyles permet d'améliorer significativement la stabilité colloïdale des AuNPs et la complexation de radioéléments [163].

Les AuNPs-DTDTPA, utilisées lors de ce chapitre, sont synthétisées et fournies par le professeur S. Roux et son équipe du laboratoire UTINAM à Besançon, dans le cadre du projet NanoRadioPro¹⁸. Ce chapitre est alors consacré à la combinaison de la plateforme multifonctionnelle à base de TiONts, avec les AuNPs-DTDTPA, pour améliorer l'efficacité radiothérapeutique du nanohybride en présence de DTX et parfaire la stabilisation colloïdale. Cette association attrayante et polyvalente confère plusieurs avantages comme le maintien intratumoral *via* les TiONts et un effet synergique des radiations thérapeutiques (DTX et AuNPs) tout en étant détectable par rayons X (AuNPs) et par imagerie nucléaire (DTDTPA-¹¹¹In). La première partie de ce chapitre traite de la procédure expérimentale et des caractérisations concernant le greffage des AuNPs-DTDTPA à la surface des TiONts-APTES (TiONts-AuNPs). En vue des injections biologiques prévues, les TiONts-AuNPs sont ensuite fonctionnalisés par le même poly(éthylène glycol) que celui utilisé dans le Chapitre 2. et Chapitre 3. (HS-PEG₃₀₀₀-COOH). Enfin, la dernière partie est dédiée à l'évaluation de l'efficacité de ce nouveau nanohybride *in vitro* et *in vivo* sur des tumeurs de prostate. Les tests *in vitro* permettent d'estimer l'efficacité thérapeutique des nanohybrides sur la lignée cancéreuse de prostate humaine (PC-3). Quant à l'étude *in vivo*, cette étude pré-clinique est en cours sur un grand nombre de souris Swiss nude mâles, porteuses de tumeurs de prostate xéno-greffées, pour évaluer l'effet de la radiothérapie et pour suivre la distribution du nanohybride dans l'organisme, après injection IT. Pour rappel, l'intérêt de ces nanohybrides est de concentrer les agents chimiothérapeutiques et radiosensibilisants au niveau de la tumeur.

¹⁸ Le projet NanoRadioPro « Nanohybrides à base de nanotubes de titanates et de nanoparticules d'or pour la Radiosensibilisation de tumeurs Prostatiques » est financé par le Cancéropôle du Grand-EST *via* l'action « Soutien à l'émergence de projets » 2015/2017 (91 k€ de fonctionnement). Ce projet, porté par le professeur N. Millot à l'université de Bourgogne (UMR 6303 UBFC/CNRS, Département Nanosciences, ICB, Dijon), est en étroite collaboration avec l'équipe du professeur S. Roux à l'Université de Franche-Comté (UMR 6213 CNRS, Institut UTINAM, Besançon) et avec le département de Radiothérapie du Centre Georges-François Leclerc (Département de Radiothérapie) à Dijon, Prof. G. Chéhange et Dr. C. Mirjolet.

I. Greffage des nanoparticules d'or sur les nanotubes de titanate

Les AuNPs-DTDTPA peuvent être couplées aux TiONts-APTES par couplage peptidique. Le protocole de synthèse des TiONts-APTES utilisé est le même que celui du chapitre 3 (voir Chapitre 2. I.2.1.) afin de favoriser la monocouche d'alcoxisilanes. Le couplage peptidique, entre l'un des groupes carboxyles du DTDTPA présent sur les AuNPs-DTDTPA et une fonction amine en surface des TiONts-APTES, est réalisé à l'aide des agents de couplage EDC/NHS en voie aqueuse, comme il a déjà été décrit au cours de ce manuscrit. Cette voie est préférée pour rester en suspension afin d'éviter le phénomène d'agglomération des nanohybrides et de les déstabiliser en les séchant par lyophilisation.

I.1. Greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES *via* les agents de couplage peptidique : EDC/NHS

I.1.1. Détermination préliminaire du nombre de DTDTPA à la surface des AuNPs

D'après l'analyse ATG réalisée sur les AuNPs-DTDTPA (Tableau 30 et Figure 145), la perte de masse relative au DTDTPA est d'environ 50%. Le taux de greffage du DTDTPA sur les AuNPs (5,7 DTDTPA.nm⁻², calculé à l'aide de l'Équation 3 et de la S_{BET} des AuNPs-DTDTPA : 104 m².g⁻¹) indique la présence d'environ 120 ligands par nanoparticule d'or à l'aide de l'Équation 6 (le diamètre des AuNPs est mesuré sur des clichés STEM-HAADF de grandissement adapté à l'aide du logiciel Image J, Ø_{AuNPs} = 2,6 nm, exemples d'images STEM-HAADF à faible grandissement en Figure 147). De plus, 5 µmol d'AuNPs (masse molaire de l'or = 197 g.mol⁻¹) correspondent environ à 1 mg d'AuNPs et à 1 mg de DTDTPA (soit 2 µmol de DTDTPA par AuNP). Le nombre de ligands de DTDTPA à la surface des AuNPs estimé par ATG corrobore la quantité publiée par notre équipe partenaire (120 à 150 DTDTPA/AuNP) [163, 183].

$$N_{(DTDTPA/AuNP)} = S_{(géo\ AuNPs)} \times N_x$$

Avec : N_(DTDTPA/AuNP) : Nombre de molécules de DTDTPA par AuNP
 S_(géo AuNPs) : Surface géométrique des AuNPs considérées comme sphériques (nm²). Le diamètre des AuNPs est de 2,6 nm.
 N_x : Nombre de molécules de DTDTPA greffées sur les AuNPs par nm², calculé à partir de l'équation 3

Équation 6 : Relation pour calculer le nombre de molécules de DTDTPA par AuNP.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻²	Nombre de molécules greffées par AuNP ^(*)
AuNPs-DTDTPA	105	50,2	511	5,7 DTDTPA	120

Tableau 30 : Estimation du taux de DTDTPA à la surface des AuNPs par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanoparticule d'or par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des AuNPs.

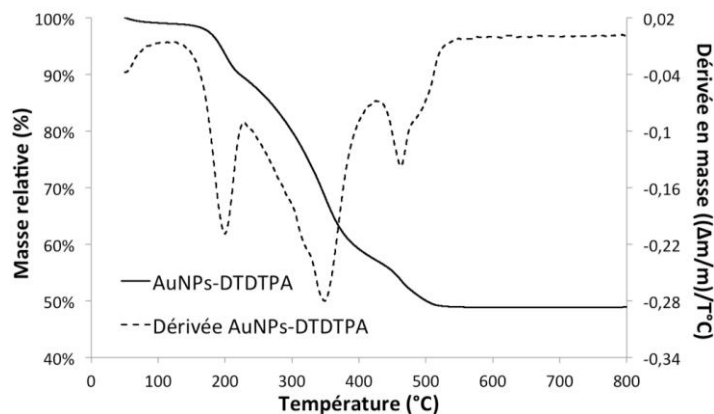


Figure 145 : Courbes ATG et DTG des AuNPs-DTDTPA sous air ($25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

I.1.2. Protocole de greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES

Un volume de $1,25 \text{ mL}$ d'une suspension mère en AuNPs-DTDTPA à $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ est prélevé représentant $31,6 \mu\text{mol}$ de AuNPs soit $37,1 \mu\text{mol}$ de fonctions COOH présentes (1 DTDTPA contient 3 fonctions COOH). Ce volume prélevé est complété avec de l'eau ultrapure jusqu'à un volume total de 15 mL . Le pH, initialement de $5,5$, est ajusté à 5 avec du HCl ($0,1 \text{ M}$) avant d'ajouter en large excès l'EDC et le NHS ($1 \text{ COOH} : 100 \text{ EDC} : 200 \text{ NHS}$). La réaction d'activation des fonctions carboxyles est maintenue pendant 90 min sous agitation magnétique (400 tr/min). En parallèle, les TiONts-APTES (contenant $63,2 \mu\text{mol}$ d'APTES à la surface des tubes) sont dispersés dans 40 mL de PBS ($0,1 \text{ M}$; pH $7,4$). Ensuite, la suspension d'activation de AuNPs-DTDTPA est ajoutée lentement dans celle des TiONts-APTES (TiONts-AuNPs) après un traitement au bain à ultrasons pour optimiser la dispersion des nanotubes (Figure 146). De manière à garder une partie des NH_2 libres pour envisager la fonctionnalisation d'un futur agent stabilisant stérique, le rapport molaire est fixé à $0,5$ AuNPs (soit $0,6 \text{ COOH}$) pour 1 APTES à la surface des tubes.

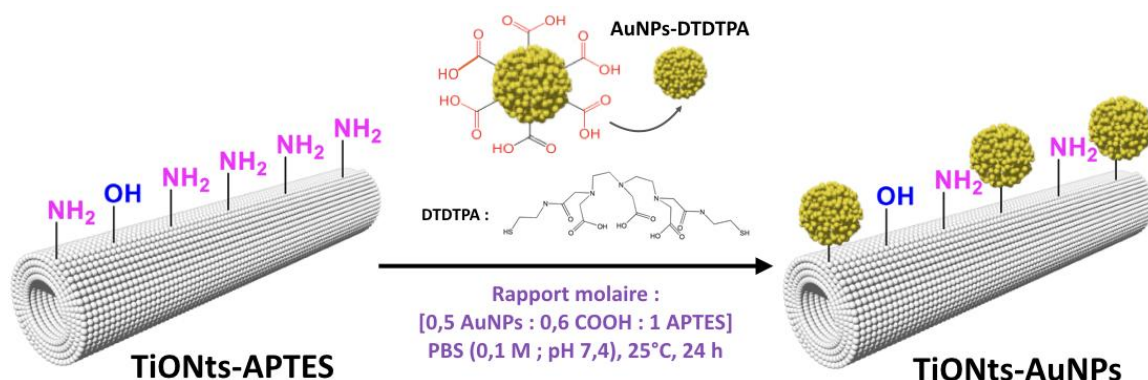


Figure 146 : Illustration du greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES.

Après 24 h de réaction sous agitation magnétique (400 tr/min), les TiONts-AuNPs sont ultrafiltrés sur une membrane en polyéthersulfone avec un seuil de coupure de 500 kDa (la taille de pores est estimée à 65 nm) afin d'éliminer efficacement les AuNPs-DTDTPA non greffées. Plusieurs lavages sont effectués jusqu'à obtenir une conductivité des eaux de lavage inférieure à $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Par ailleurs, des analyses par spectroscopie UV-visible sont réalisées sur les eaux de lavages après chaque ultrafiltration car les AuNPs-DTDTPA ont une bande d'absorbance vers $250 - 350 \text{ nm}$ (voir Chapitre 1. II.2.1.). Par conséquent, cette technique permet de contrôler l'avancement de la purification des

TiONts-AuNPs en éliminant les AuNPs-DTDTPA non greffées. Enfin, une partie de la suspension est lyophilisée pour les caractérisations sur poudre.

I.2. Mise en évidence des AuNPs-DTDTPA à la surface des nanotubes de titanate

Les clichés STEM-HAADF des TiONts-AuNPs mettent en évidence la présence des nanoparticules d'or à la surface des TiONts et nulle part ailleurs sur la grille (Figure 147). Ceci indique une bonne purification des AuNPs-DTDTPA non greffées. Les AuNPs-DTDTPA ne semblent pas former d'agglomérats entre elles et sont relativement bien réparties sur l'ensemble de la surface des TiONts. Ces images montrent aussi que les AuNPs ont un diamètre moyen de 2,6 nm (après un comptage réalisé sur 100 AuNPs).

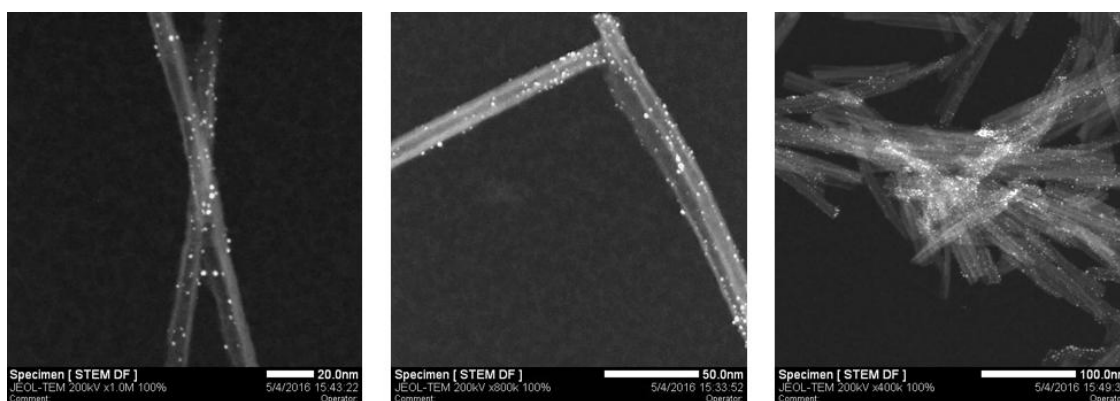


Figure 147 : Clichés STEM-HAADF des TiONts-AuNPs.

L'analyse par spectroscopie infrarouge montre l'apparition de nouvelles bandes de vibration correspondant au DTDTPA présent sur les AuNPs (Figure 148). Les bandes caractéristiques des amides formées lors du greffage entre les fonctions COOH du DTDTPA et les fonctions NH₂ des TiONts-APTES sont visibles à 1050 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹ et à 3100 cm⁻¹ pour les vibrations attribuées aux liaisons (C=O)-**N-H** mais aussi à 1720 cm⁻¹ pour les liaisons (**C=O**)-N-H. Quant aux bandes situées à 1720 cm⁻¹ et à 3250 cm⁻¹, elles peuvent correspondre aux liaisons (**C=O**)-OH et (C=O)-**OH** du DTDTPA respectivement. Par ailleurs, la légère augmentation de l'intensité des chaînes carbonées aliphatiques situées entre 1450 - 1300 cm⁻¹ et entre 3000 - 2800 cm⁻¹ est due à la quantité de matière organique supplémentaire lors du greffage des AuNPs-DTDTPA à la surface des tubes.

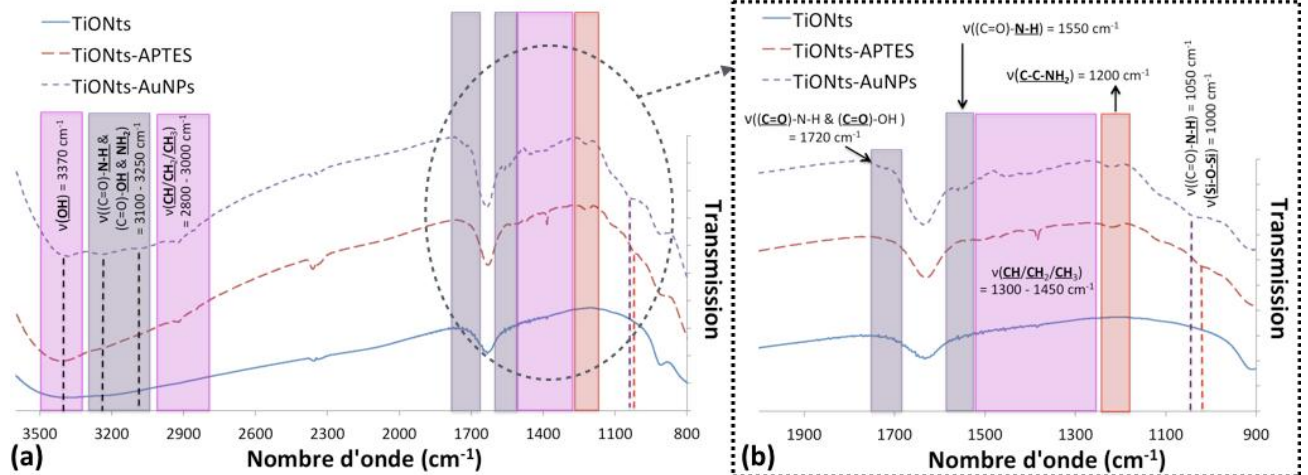


Figure 148 : Spectres infrarouges des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs entre (a) 3600 - 800 cm^{-1} et (b) 2000 - 900 cm^{-1} .

La composition atomique en surface des TiONts-AuNPs est estimée *via* des analyses XPS (Tableau 31). De l'or est bien trouvé ce qui prouve la présence des AuNPs, en plus d'autres atomes correspondant notamment aux Si et N de l'APTES ou encore aux éléments chimiques des TiONts nus (Figure 149). Cependant, les atomes de soufre du DTDTPA n'ont pu être détectés mais il est cependant possible d'observer une augmentation des concentrations atomiques du carbone et de l'oxygène pour les TiONts-AuNPs, tendant à prouver la présence du DTDTPA sur le nanohybride préparé.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}	Au _{4f}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-	-
TiONts-APTES	11,2	56,8	5,7	21,5	2,3	2,5	-
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,5	2,6	0,3	1,0	0,1	0,1	-
TiONts-AuNPs	18,5	54,1	1,4	19,2	3,1	2,5	1,2
% atomique (TiONts-AuNPs) / Ti	1,0	2,8	0,1	1,0	0,2	0,1	0,1

Tableau 31 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs.

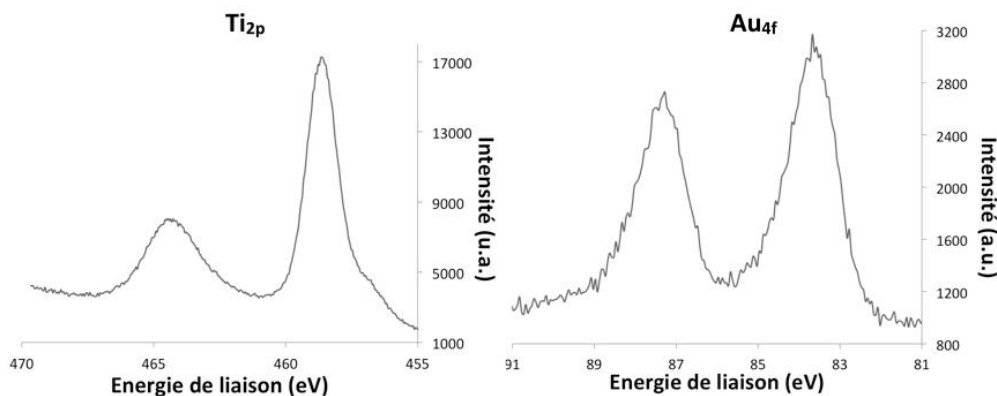


Figure 149 : Spectres XPS des niveaux Ti_{2p} et Au_{4f} des TiONts-AuNPs.

Tout comme l'analyse par spectroscopie infrarouge, la décomposition des niveaux O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} par XPS, met en évidence les liaisons caractéristiques du greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts (formation des liaisons amides secondaires) *via* le couplage peptidique ainsi que les fonctions carboxyles

présentes sur le DTDTPA (Figure 150). En effet, deux nouvelles composantes font leur apparition et sont attribuées à ces deux types de liaisons ((**C=O**)-NH-C et (**C=O**)-OH) dont l'une se situe à 532,8 eV (7%) pour le niveau O_{1s} et l'autre à 288,1 eV (11,2%) pour le niveau C_{1s} . Par ailleurs, d'autres composantes peuvent aussi correspondre aux fonctions carboxyles ((**O=C**)-OH) sur les TiONts-AuNPs comme celles situées à 531 eV (36,6%) pour le niveau O_{1s} et à 285,9 eV (41,9%) pour le niveau C_{1s} . Ces fonctions sont responsables de l'augmentation de ces composantes en comparaison avec celles observées à ces mêmes positions pour les TiONts-APTES : 15,3% (O_{1s}) et 25% (C_{1s}), respectivement. Quant au niveau N_{1s} des TiONts-AuNPs, la proportion de la contribution localisée à 399,8 eV est cette fois-ci plus importante par rapport à celle des TiONts-APTES (passage de 40,7% à 77,6%). Cette augmentation provient des liaisons amides secondaires ((C=O)-**NH**-C) ainsi que de la contribution des liaisons C-**NH**₂ qui sont favorisées au détriment des C-**NH**₃⁺ (22,4% pour les TiONts-AuNPs).

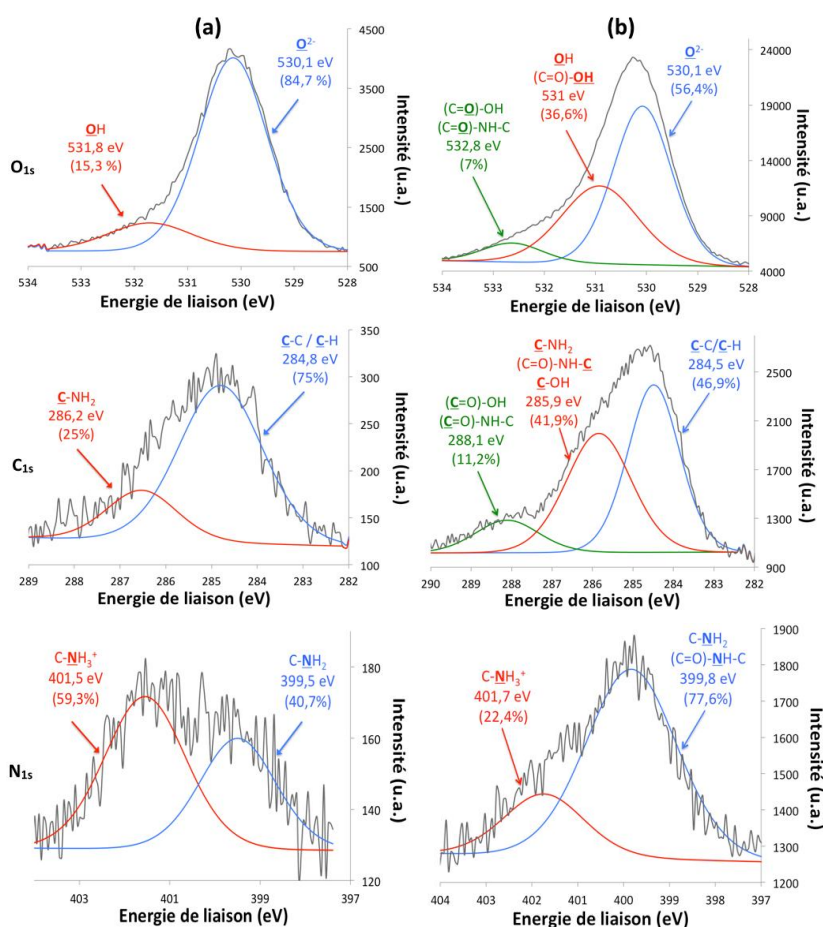


Figure 150 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} et N_{1s} des (a) TiONts-APTES et (b) TiONts-AuNPs.

1.3. Étude de la stabilité colloïdale des TiONts-APTES fonctionnalisés par les AuNPs-DTDTPA

La réduction du nombre de fonctions NH₂ après le greffage des AuNPs-DTDTPA et la présence du DTDTPA avec les fonctions COO⁻ sont responsables du décalage du PIE des TiONts-AuNPs par rapport aux TiONts-APTES (Figure 151). En effet, le PIE des TiONts-AuNPs est de 5,1 alors qu'il était de 6,9 pour les TiONts-APTES. Les fonctions carboxylates améliorent significativement le potentiel zêta, en valeur

absolue au pH physiologique : il passe de -6 mV à -20 mV, favorisant la répulsion électrostatique des nanohybrides.

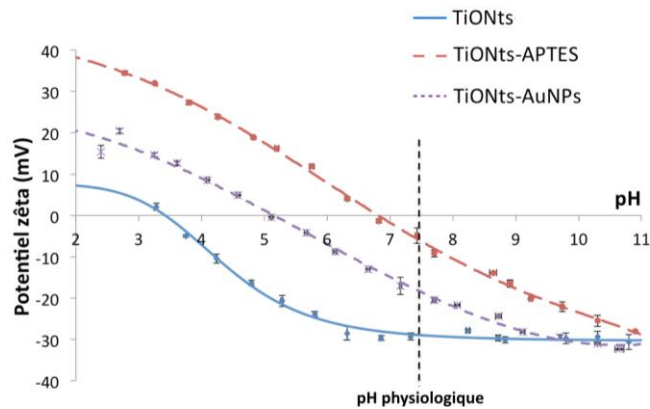


Figure 151 : Évolution des potentiels zêta en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

L'analyse par turbidimétrie (Figure 152) montre une très bonne stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques (0,1 M ; pH 7,4) des TiONts-AuNPs par rapport aux TiONts-APTES. L'absorbance mesurée des TiONts fonctionnalisés par les AuNPs-DTDTPA n'a pas changé significativement après 150 min d'analyse. Ce greffage a donc nettement amélioré la stabilité colloïdale des nanotubes. Par ailleurs, le greffage des AuNPs-DTDTPA sur la surface des TiONts semble conduire à un état de dispersion similaire sur les clichés STEM-HAADF en comparant à l'état de dispersion des TiONts-APTES (Figure 153 et Figure 64)

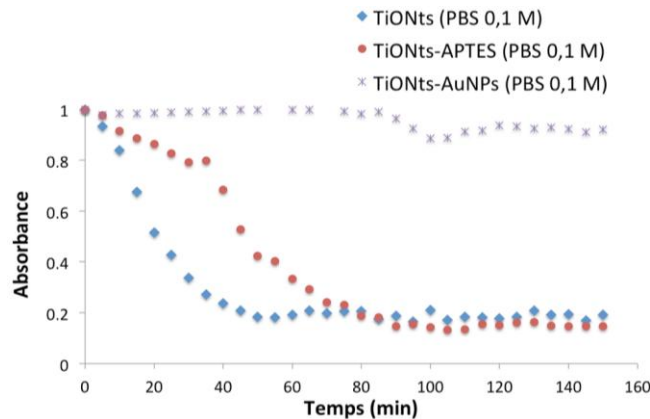


Figure 152 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm afin d'évaluer la stabilité colloïdale des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs.

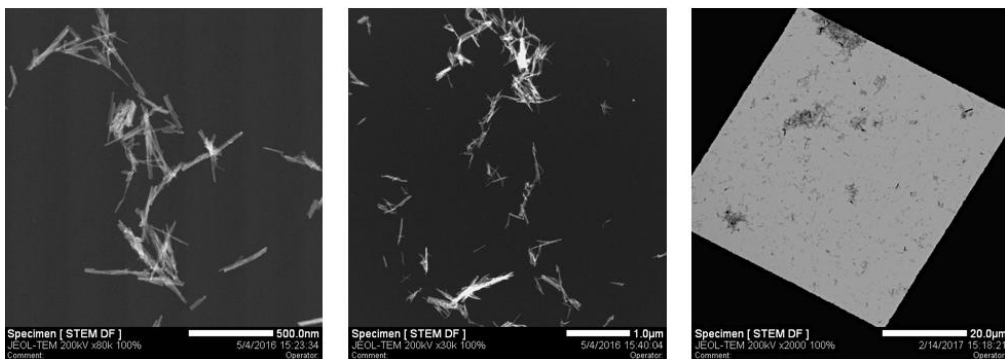


Figure 153 : Images STEM-HAADF montrant l'état de dispersion des TiONts-AuNPs.

I.4. Estimation du taux de greffage des nanoparticules d'or à la surface des TiONts

Lors de l'analyse ATG (Tableau 32 et Figure 154), la perte de masse plus conséquente observée pour les TiONts-AuNPs démontre que le couplage peptidique sur les TiONts semble avoir fonctionné. Cette perte de masse est due à la quantité de DTDTPA présente sur les TiONts. Le taux de greffage calculé à l'aide de l'Équation 7 est de 0,40 DTDTPA.nm⁻² de TiONts, correspondant à une moyenne de 20 AuNPs par TiONt.

$$N_{(\text{AuNPs}/\text{TiONt})} = \left(\frac{N_y}{N_{\text{DTDTPA}/\text{AuNP}}} \right) \times S_{\text{géo TiONts}}$$

Avec : $N_{\text{AuNPs}/\text{TiONt}}$: Nombre de AuNPs par TiONt
 N_y : Nombre de molécules de DTDTPA présentes sur les TiONts par nm² (0,40 DTDTPA.nm⁻²), calculé à partir de l'équation 3
 $N_{(\text{DTDTPA}/\text{AuNP})}$: Nombre de molécules de DTDTPA par AuNP, calculé par l'équation 6
 $S_{\text{géo TiONts}}$: Surface géométrique extérieure des TiONts (nm²)

Équation 7 : Relation pour calculer le nombre de nanoparticules d'or par TiONt.

Le nombre de nanoparticules d'or à la surface des TiONts, calculé par cette équation, est plus faible que le comptage réalisé sur les clichés STEM-HAADF (Figure 147). En effet, le comptage réalisé sur une centaine de nanotubes permet de dénombrer une moyenne de 40 AuNPs par TiONt. Une analyse ICP (Inductively Coupled Plasma) est alors effectuée sur les TiONts-AuNPs afin de lever cette ambiguïté et d'avoir une idée plus précise sur la quantité de AuNPs à la surface des TiONts. Les TiONts-AuNPs ont préalablement été dissouts, sous agitation à 40°C, dans l'eau régale. L'ICP a tendance à corroborer les observations STEM en obtenant une concentration de 31,7 mg Ti/L et de 21,6 mg Au/L, ce qui conduirait à un nombre de AuNPs par TiONt estimé à 34 AuNPs/TiONt *via* l'ICP (le calcul est détaillé en Annexe 4). L'ATG peut, par les hypothèses de calcul effectuées, minimiser la quantité de AuNPs greffées et que nous ne pouvons exclure, qu'une partie des molécules greffées au préalable ce soit décrochées, ce qui n'est pas non plus pris en compte dans les hypothèses de calcul.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) APTES	9	14 230
TiONts-AuNPs	150	12,4	511	0,40 (±0,05) DTDTPA	7	2 200

Tableau 32 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des nanotubes.

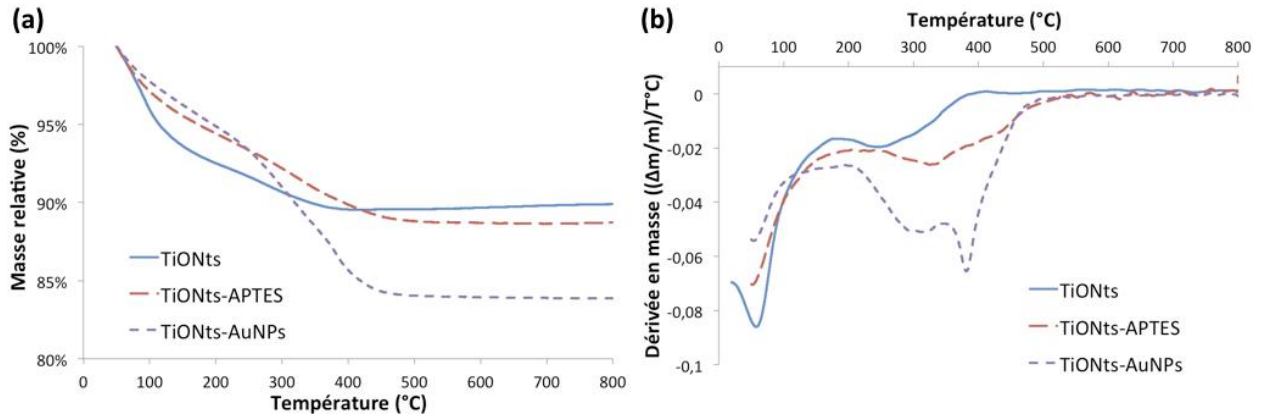


Figure 154 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES et TiONts-AuNPs sous air ($25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

I.5. Conclusions sur le greffage des AuNPs-DTDTPA sur les TiONts-APTES

La modification de surface des nanotubes de titanate par l'APTES a permis de les coupler avec les nanoparticules d'or, ces dernières étant elles-mêmes modifiées par le DTDTPA, ceci afin d'élaborer un nouvel agent théranostique. La synthèse s'effectue dans une suspension aqueuse en présence d'agents de couplage EDC/NHS pour optimiser l'assemblage des deux types de nanoparticules et pour limiter l'agglomération à la fois des AuNPs et des TiONts. Cette association inédite est une réussite et elle est prouvée par les différentes techniques de caractérisations présentées dans cette partie (IR, XPS, TEM, ATG, UV-vis, zêta). Parmi celles-ci, les images STEM montrent visuellement que les AuNPs observées sont retrouvées uniquement à la surface des TiONts et nulle part ailleurs sur la grille (Figure 147). De plus, les conditions opératoires de ce greffage permettent de répartir de façon homogène les nanoparticules d'or en n'étant pas toutes regroupées au même endroit, à la surface des tubes. Les AuNPs-DTDTPA procurent en outre une stabilité colloïdale remarquable aux nanotubes, dans les conditions physiologiques. Le rapport molaire entre les COOH du DTDTPA et les NH_2 de l'APTES est choisi de façon à envisager le greffage du poly(éthylène) glycol (HS-PEG₃₀₀₀-COOH) avec les amines libres n'ayant pas réagi lors de ce couplage, ceci afin d'augmenter leur biocompatibilité, leur furtivité et leur stabilité colloïdale.

II. Greffage du HS-PEG₃₀₀₀-COOH à la surface des TiONts-AuNPs

Le poly(éthylène) glycol (HS-PEG₃₀₀₀-COOH), déjà utilisé au cours des chapitres précédents, est greffé sur les TiONts-AuNPs *via* un couplage peptidique en milieu organique (PyBOP). En effet, ce milieu a montré un meilleur rendement de greffage par rapport au milieu aqueux (EDC/NHS) (voir Chapitre 3. II.1. et II.2.). Cette étape de fonctionnalisation a pour but d'améliorer la biocompatibilité, la dispersion

et la stabilité colloïdale du nanohybride en milieu physiologique : si celle-ci apporte de la répulsion stérique, elle permet également d'avoir des fonctions thiols en surface des nanotubes pour greffer ensuite le DTX-PMPI. Le polymère retenu est le PEG₃₀₀₀ ($M = 3073 \text{ g.mol}^{-1}$). En effet, il a été montré dans le chapitre précédent qu'un poids moléculaire plus important (PEG₁₀₀₀₀) induit une baisse de l'activité cytotoxique des TiONts-PEG-DTX (Chapitre 3. II.2.4.3.). De plus, ce choix permettra de comparer cette nouvelle génération de nanomédicament à celle étudiée dans le Chapitre 2.

II.1. Synthèse des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ via le PyBOP

Le protocole de fonctionnalisation des TiONts-AuNPs par le PEG₃₀₀₀ est similaire à celui utilisé dans le chapitre 3. paragraphe II.2., en présence du PyBOP. La fonction carboxyle du polymère est activée par cet agent de couplage peptidique en phase organique pendant 30 min. Cette activation nécessite une nouvelle fois d'être exempte de toute humidité pour optimiser le rendement de couplage. Ainsi, elle se déroule sous azote et sous agitation magnétique (400 tr/min) dans du DMSO extra sec (anhydre, 99,99%) qui contient un mélange équimolaire de PEG₃₀₀₀ et de PyBOP en présence de DIEA en excès (Figure 136). En parallèle, la poudre de TiONts-AuNPs est dispersée dans le DMSO sous un traitement au bain à ultrasons pendant 10 min. La suspension de TiONts-AuNPs est finalement introduite dans la solution de PEG₃₀₀₀, préalablement activés par le PyBOP, sous N₂ et sous agitation magnétique (400 tr/min). Les groupes carboxyles des PEG₃₀₀₀ réagissent alors avec les NH₂ libres de l'APTES, situés sur les TiONts-AuNPs (avec les amines non utilisées pour le greffage des AuNPs-DTDTPA) (Figure 155). Les quantités mises en jeu respectent un rapport molaire de 1 COOH (PEG₃₀₀₀) pour 1 NH₂ (initialement présentes sur les TiONts-APTES), même dans le cas où les nanoparticules d'or sont présentes, ceci dans le but d'assurer une fonctionnalisation optimale. En effet, le nombre de fonctions amines déjà utilisées par les AuNPs-DTDTPA est très faible eu égard à toutes les fonctions présentes. Ainsi, la quantité de PEG₃₀₀₀ engagée est légèrement en excès vis-à-vis des fonctions amines non fonctionnalisées par les AuNPs-DTDTPA.

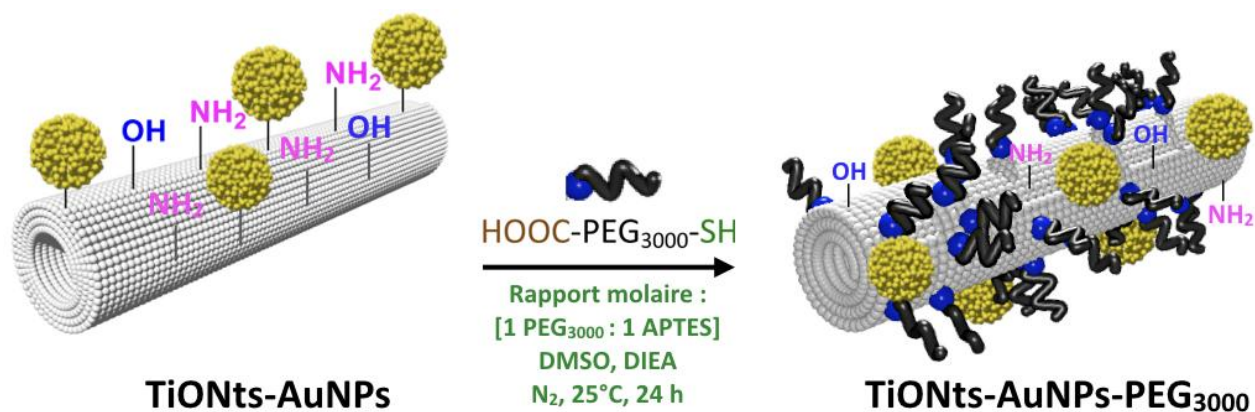


Figure 155 : Illustration du greffage des HOOC-PEG₃₀₀₀-SH sur les fonctions NH₂ libres de l'APTES situées sur les TiONts-AuNPs (non utilisées pour le greffage des AuNPs-DTDTPA) en phase organique via le PyBOP.

Après 24 h, la suspension de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est centrifugée trois fois (20 000 × g ; 20 min) pour éliminer principalement le DMSO puis elle est redispersée dans de l'eau ultrapure. Finalement, elle est ultrafiltrée (500 kDa) jusqu'à obtenir une conductivité inférieure à 10 μS.cm⁻¹ avant qu'une partie soit lyophilisée pour les caractérisations sur poudre.

II.2. Confirmation de la présence du PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts-AuNPs

Les spectres IR, présentés en Figure 156, prouvent que les nanoparticules d'or modifiées en surface demeurent présentes à la surface des TiONts, avec la persistance des liaisons attribuées aux **(C=O)-N-H** et **(C=O)-OH**. Par ailleurs, les bandes de vibration des fonctions amides secondaires des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ sont localisées aux mêmes positions que celles observées pour les TiONts-AuNPs, c'est-à-dire à 1050 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹, 1720 cm⁻¹ et 3100 cm⁻¹. Il est en de même avec les bandes des fonctions carboxyles qui sont situées à 1720 cm⁻¹ ainsi qu'à 3250 cm⁻¹ (bandes de vibration représentées en violet). La forte bande d'absorption à 1100 cm⁻¹ (bande verte) caractéristique de la liaison **C-O**_{PEG}, dont est essentiellement constituée le poly(éthylène) glycol, prouve la présence du PEG₃₀₀₀ sur les nanotubes fonctionnalisés par les AuNPs-DTDTA. Par ailleurs, la légère augmentation de l'intensité des vibrations à 1550 cm⁻¹ et à 1720 cm⁻¹, pour le spectre des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀, montre que de nouvelles liaisons amides se sont formées *via* le couplage peptidique entre la fonction COOH du PEG₃₀₀₀ et la fonction NH₂ de l'APTES. Enfin, les liaisons correspondant aux chaînes carbonées aliphatiques situées entre 1450 - 1300 cm⁻¹ et entre 3000 - 2800 cm⁻¹ sont beaucoup plus intenses en raison de la longueur des chaînes carbonées du polymère ayant été greffées à la surface des tubes.

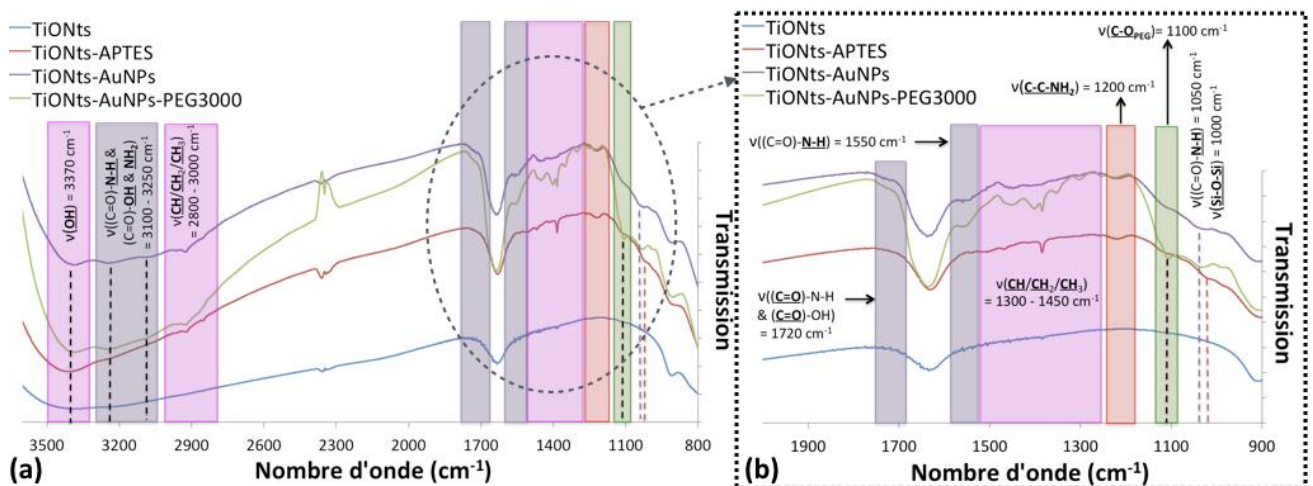


Figure 156 : Spectres infrarouges des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ entre (a) 3600 - 800 cm⁻¹ et (b) 2000 - 900 cm⁻¹.

La Figure 157 présente les clichés STEM des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀, ils révèlent, là aussi, que le greffage du polymère sur la surface des nanotubes en phase organique n'a heureusement pas conduit au décrochage des nanoparticules d'or. De plus, le nombre de AuNPs liées au nanohybride est similaire à celui trouvé avant le greffage du PEG, ceci *via* un comptage réalisé sur plus de 100 tubes (43 AuNPs/TiONT-PEG₃₀₀₀ *versus* 40 AuNPs/TiONT-APTES). L'analyse des concentrations atomiques réalisée par XPS corrobore les images STEM puisque le pourcentage atomique de Au_{4f} par rapport au titane est du même ordre de grandeur que celui trouvé pour les TiONts-AuNPs (Tableau 33 : rapport Au/Ti = 0,1 dans les deux cas). Cependant, il est possible de remarquer que les images STEM sont moins nettes que celles observées sur la Figure 147. Ceci est dû à la présence d'un taux de carbone important, provenant du carbone de pollution ou du polymère, ce qui dégrade la qualité des images. Un

traitement au plasma cleaner¹⁹ est alors réalisé pendant 20 min afin d'éliminer les contaminants pouvant se trouver à la surface des grilles MET, à l'aide d'un flux d'oxygène. C'est bel et bien la présence du polymère à la surface des nanohybrides qui est responsable de cette qualité médiocre. D'ailleurs, il est possible de visualiser la démarcation du faisceau d'électrons lors de la mise au point du MET sur la Figure 157b.

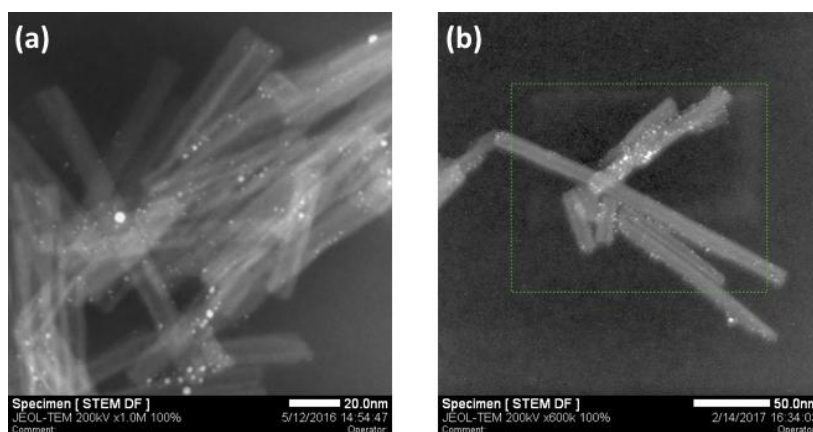


Figure 157 : Clichés STEM-HAADF des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀.

La composition atomique en surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est estimée *via* les analyses XPS (Tableau 33). La concentration des atomes correspondant au silicium et à l'azote de l'APTES n'a pas varié en comparaison de l'analyse XPS réalisée sur les TiONts-AuNPs. En revanche, la diminution de la teneur des atomes liés aux nanotubes (titane et sodium) et la forte hausse des taux de carbone et d'oxygène prouve une fois de plus le greffage du polymère à la surface du nanohybride.

Concentration atomique (%)	C _{1s}	O _{1s}	Na _{KLL}	Ti _{2p}	N _{1s}	Si _{2p}	Au _{4f}
TiONts	7,3	58,7	13,5	20,5	-	-	-
% atomique (TiONts) / Ti	0,3	2,9	0,7	1,0	-	-	-
TiONts-APTES	11,2	56,8	5,7	21,5	2,3	2,5	-
% atomique (TiONts-APTES) / Ti	0,5	2,6	0,3	1,0	0,1	0,1	-
TiONts-AuNPs	18,5	54,1	1,4	19,2	3,1	2,5	1,2
% atomique (TiONts-AuNPs) / Ti	1,0	2,8	0,1	1,0	0,2	0,1	0,1
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	23,8	52,1	0,5	17,5	2,9	2,0	1,2
% atomique (TiONts-AuNPs PEG ₃₀₀₀) / Ti	1,4	3,0	≈ 0	1,0	0,2	0,1	0,1

Tableau 33 : Analyses XPS des concentrations atomiques en surface des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀.

La décomposition des seuils O_{1s}, C_{1s} et N_{1s} indique certaines évolutions des composantes associées à l'accroche du PEG₃₀₀₀ sur les fonctions amines de l'APTES (Figure 158). Ainsi, le niveau O_{1s} montre une augmentation de la composante localisée à 532,4 eV (passage de 7% pour le nanohybride TiONts-AuNPs à 14,3% pour les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀). Cette composante est attribuée aux liaisons (C=O)-NH-C et (C=O)-OH indiquant un taux de couplage peptidique et de fonctions carboxyles plus

¹⁹ Le plasma cleaner est un système plasma dédié au nettoyage des surfaces afin d'éliminer toutes contaminations, notamment dues au carbone. Ici le plasma est réalisé à l'aide d'un flux à oxygène.

important. Concernant le seuil C_{1s} , la composante liée aux $\underline{C}-C/\underline{C}-H$ 284,6 eV est plus intense en raison de la présence des chaînes PEGylées du polymère (passage de 46,9% à 53,1%). Cependant, cette même décomposition permet d'observer une diminution notable de la composante située à 286,1 eV (37,9% pour l'échantillon TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ *versus* 50% pour les TiONts-PEG₃₀₀₀, voir Chapitre 3. II.2.3.). La quantité de PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts-AuNPs pourrait alors être moindre en raison des fonctions amines déjà consommées lors de l'accroche des AuNPs-DTDTPA. Quant à l'attribution des liaisons $\underline{C}-O_{PEG}$ du polymère, elles peuvent être localisées à 530,8 eV (O_{1s}) et à 286,1 eV (C_{1s}). Enfin, le niveau N_{1s} ne montre aucune différence notable après le greffage du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-AuNPs. En effet, les fonctions amides secondaires formées par couplage peptidique se trouvent à la même position que les amines ayant été consommées (399,8 eV).

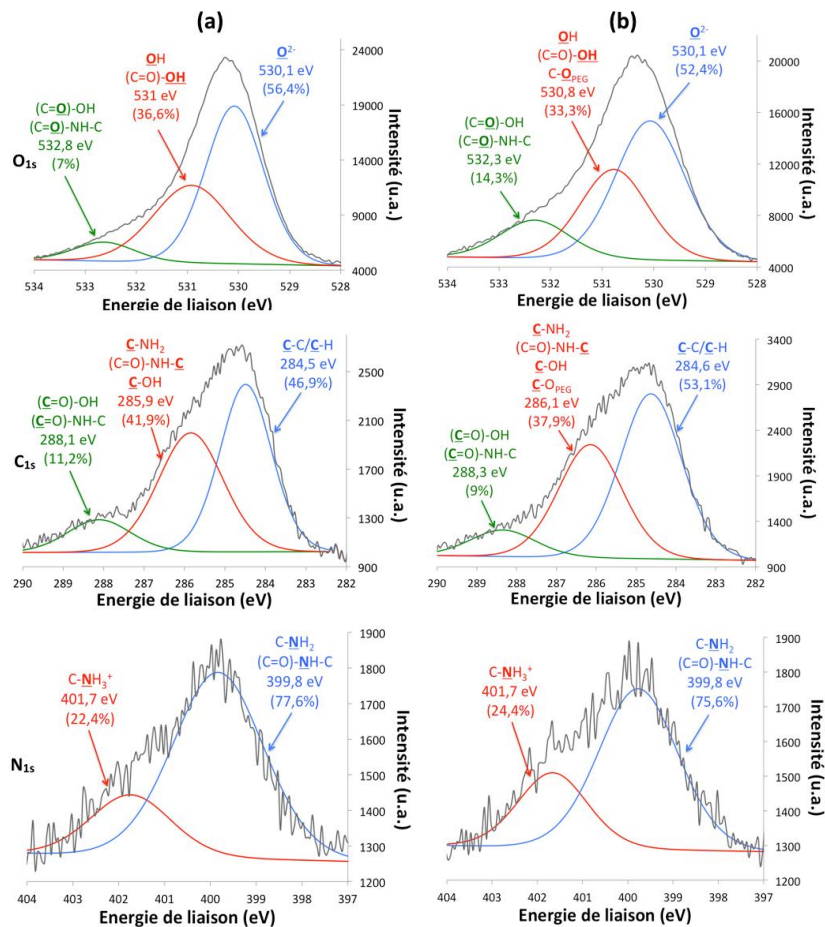


Figure 158 : Analyses XPS : décomposition des niveaux O_{1s} , C_{1s} et N_{1s} des (a) TiONts-AuNPs et (b) TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀.

II.3. Détermination de la quantité de PEG₃₀₀₀ greffé à la surface des TiONts-AuNPs

L'analyse ATG (Tableau 34 et Figure 159) conforte les résultats apportés par la décomposition du niveau C_{1s} des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ obtenu par XPS (Figure 158). En effet, la quantité de PEG₃₀₀₀ déterminée à la surface des TiONts-AuNPs est trois fois inférieure à celle obtenue dans le cas des TiONts-PEG₃₀₀₀ synthétisés en phase organique (sans la présence de nanoparticule d'or) (voir Chapitre

3. II.2.4.1.). Ces résultats conduisent à un taux de greffage de $0,04 \text{ PEG}_{3000} \cdot \text{nm}^{-2}$ pour les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (Tableau 34) contre $0,09 \text{ PEG}_{3000} \cdot \text{nm}^{-2}$ pour les TiONts-PEG₃₀₀₀ (Tableau 26). La réduction du nombre de fonctions amines disponibles à la surface des TiONts-AuNPs après le greffage des AuNPs-DTTPA induit une quantité de PEG₃₀₀₀ greffées moins importante sur la surface du nanohybride. Par ailleurs, les AuNPs-DTTPA peuvent gêner l'approche des chaînes de PEG et conduire à cette moindre quantité de polymère greffé. Le taux de couverture du PEG₃₀₀₀ plus faible en présence des AuNPs conduit à une aire par chaîne de 25 nm^2 (rappel : le rayon de giration d'un PEG₃₀₀₀ est environ de $2,5 \text{ nm}$ ce qui correspond à une surface de recouvrement de 20 nm^2) ce qui indiquerait un régime de greffons PEG dilués, dit aussi « champignon ». Dans ce calcul, la surface des tubes déjà occupée par les AuNPs a été négligée. Or, comme vu au cours du chapitre 3, le greffage du PEG_n *via* la PyBOP conduit préférentiellement à une conformation en « brosse » à la surface des tubes (Chapitre 3. II.2.4.1.). Ainsi, le PEG serait finalement également dans cette conformation avec la présence des AuNPs.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-AuNPs	150	12,4	511	0,40 (±0,05) DTTPA	7	2 200
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	150	16,1	3073	0,040 (±0,003) PEG ₃₀₀₀	4	220

Tableau 34 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des nanotubes.

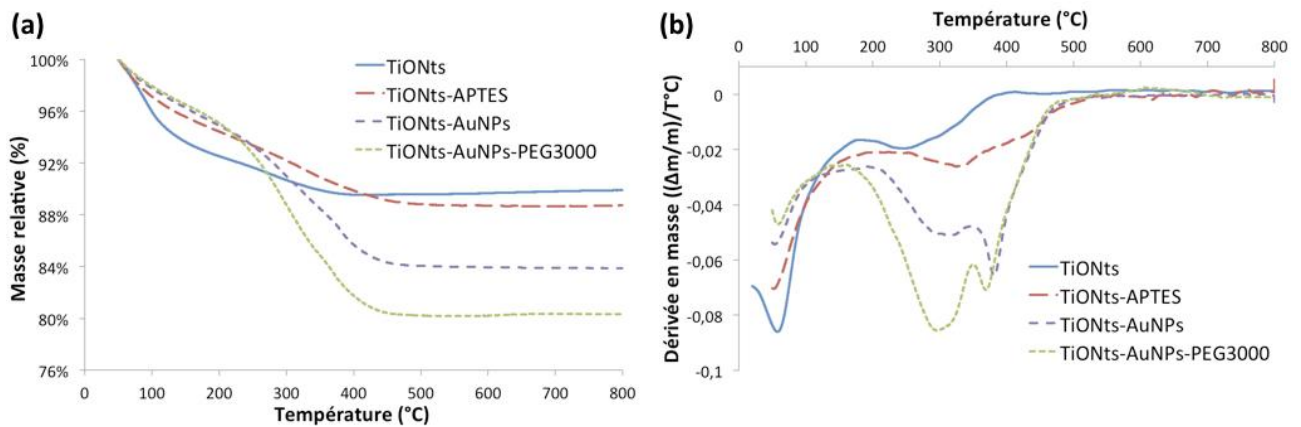


Figure 159 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ sous air ($25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) avec une rampe de $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

II.4. Influence du greffage des PEG₃₀₀₀ sur la dispersion et la stabilité colloïdale des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀

L'état de dispersion des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est évalué à travers les images STEM réalisées sur la grille MET (Figure 160). Même si le taux de greffage du PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts-AuNPs est faible, la présence de ce polymère semble limiter l'état d'agglomération des nanohybrides en comparant leur dispersion avec les clichés MET des TiONts-AuNPs (Figure 153) ou encore avec ceux des

TiONts-APTES modifiés uniquement par le PEG₃₀₀₀ (Figure 142). En effet, le greffage du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-AuNPs semble favoriser l'individualisation des nanohybrides sur l'ensemble de la grille MET.

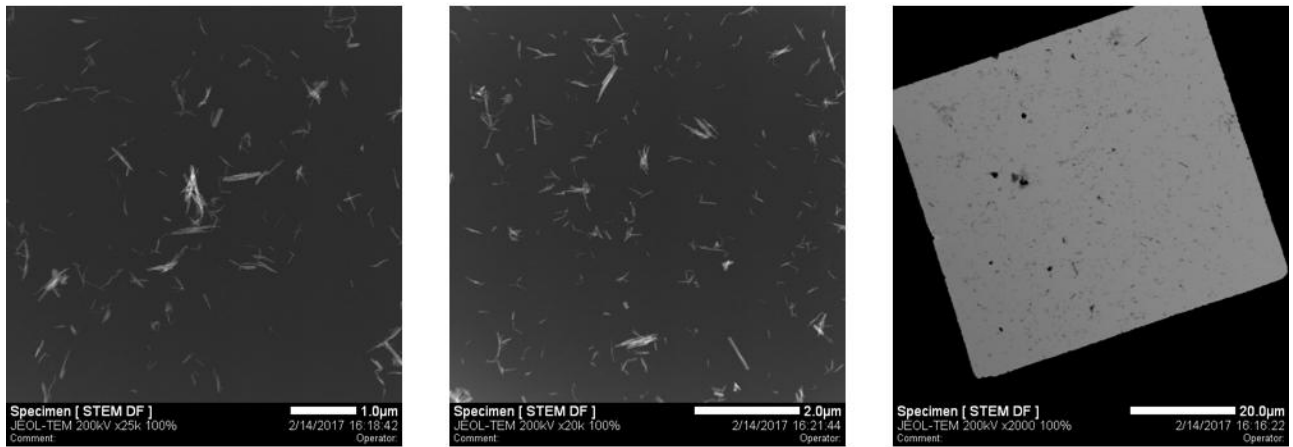


Figure 160 : Aperçu de l'état de dispersion des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ en STEM-HAADF.

L'analyse zétamétrique montre que le point isoélectrique des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ ne varie pas après le greffage du HS-PEG₃₀₀₀-COOH (PIE = 5,1) (Figure 161). Cependant, la présence du PEG₃₀₀₀ à la surface des TiONts modifiés par les nanoparticules d'or écran les charges de surface. Cet écrantage des charges est comparable à celui observé pour les TiONts-PEG₃₀₀₀ synthétisés en phase organique (Figure 140) même si les taux de greffage sont bien différents entre ces deux nanohybrides. Pour finir, la valeur du potentiel zêta des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est aux alentours de -2 mV au pH 7,4. Par conséquent, c'est principalement l'effet stérique qui gouverne la stabilité colloïdale au pH physiologique.

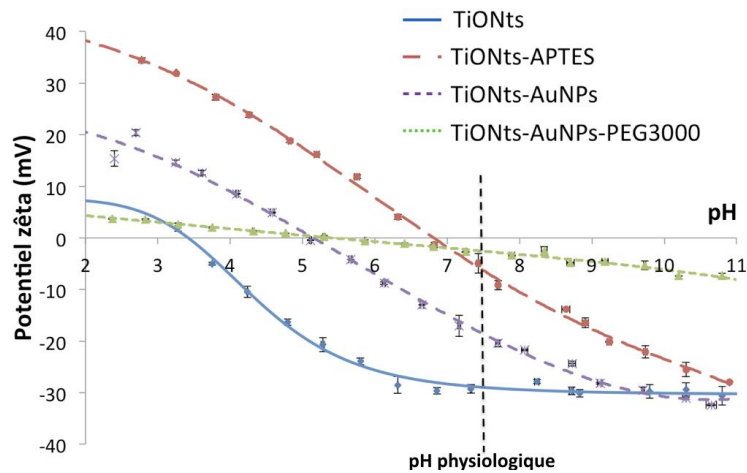


Figure 161 : Évolution des potentiels zêta en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

La stabilité colloïdale des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est alors observée en suivant leur absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 162). L'accroche du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-AuNPs vient légèrement diminuer cette stabilité colloïdale par rapport aux TiONts-AuNPs mais l'absorbance reste tout de même bien supérieure à celles des nanotubes de titanate nus et des TiONts-APTES. Une fois de plus, la quantité de polymère à la surface du nanohybride ne semble pas jouer un rôle prépondérant sur la stabilité colloïdale dans le temps et dans les conditions physiologiques. Par ailleurs, les absorbances en fonction du temps des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ sont très

proches de celles des TiONts-PEG₃₀₀₀ (sans la présence de nanoparticules d'or) en phase organique (Figure 141). Par conséquent, le nanohybride présente une stabilité colloïdale suffisante dans le temps en vue des études biologiques *in vivo*.

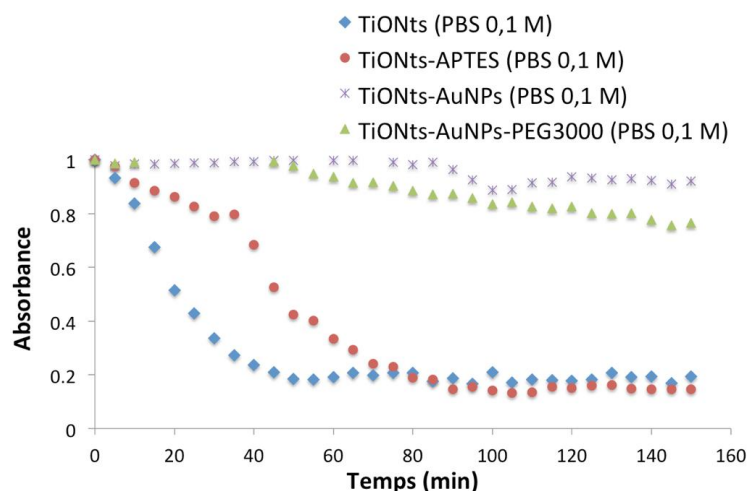


Figure 162 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm afin d'évaluer la stabilité colloïdale des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀.

II.5. Conclusions sur le greffage d'un PEG hétérofonctionnel à la surface des TiONts-AuNPs

Les TiONts-AuNPs ont été fonctionnalisés par le HS-PEG₃₀₀₀-COOH pour améliorer leur biocompatibilité, leur furtivité et pour permettre la fonctionnalisation ultérieure avec le docétaxel. Les techniques d'analyses ont permis de prouver le greffage covalent de ce polymère à la surface des TiONts-AuNPs. Les résultats obtenus sur le taux de greffage du PEG₃₀₀₀ à la surface des nanotubes (0,04 PEG₃₀₀₀.nm⁻²) peuvent s'expliquer par la quantité d'amines déjà consommées par les AuNPs-DTDTPA et par la gêne stérique occasionnée par le DTDTPA. Ce faible taux peut porter préjudice aux futurs greffages puisque le nombre de thiols à la surface des nanohybrides est plus restreint qu'en l'absence d'AuNPs. Concernant la stabilité colloïdale des nanotubes, le greffage du PEG₃₀₀₀ a conduit à un fort écrantage des charges en raison de la longueur des chaînes carbonées. Le potentiel zêta est ainsi proche de zéro à pH 7,4 dans du NaCl à 10⁻² M. Même si cette fonctionnalisation n'a pas permis d'avoir une stabilité colloïdale aussi bonne que dans le cas des TiONts-AuNPs, elle reste tout de même bien supérieure au cas des TiONts nus et des TiONts-APTES dans le PBS (0,1 M ; pH 7,4). De plus, les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ semblent avoir une meilleure dispersion en comparaison de celle des TiONts-AuNPs après avoir observé l'ensemble de la grille MET. Ces résultats sont très prometteurs pour les tests biologiques et permettent en outre d'avoir une fonction d'intérêt à la surface du nanovecteur (ici, le groupement thiol) en vue de greffer le DTX-PMPI.

III. Fonctionnalisation des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ par le docétaxel à des fins thérapeutiques

Cette partie se consacre au greffage du docétaxel à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ce nanohybride final et de la comparer à celle du nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX développé dans le Chapitre 2. Cette étude consiste alors à montrer l'influence des AuNPs-DTDTPA sur les traitements anticancéreux en les maintenant sur le site tumoral, grâce aux TiONts. Pour ce faire, le greffage du DTX à la surface des nanotubes s'est effectué dans les mêmes conditions (rappelées ci-après) que celles utilisées pour les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (sans nanoparticules d'or).

III.1. Conditions de greffage du DTX sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀

Le DTX nécessite une fois de plus d'être modifié par le PMPI afin de l'accrocher sur les fonctions thiols présentes sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀. Le docétaxel est solubilisé dans le DMSO puis cette solution est ajoutée dans du tampon borate (0,1 M ; pH 8,5) contenant le PMPI. Le rapport molaire est fixé à 1 DTX pour 4 PMPI. La solution est placée au bain à ultrasons pendant 5 min afin de bien l'homogénéiser. Après 24 h de réaction sous agitation magnétique (400 tr/min) à température ambiante, la solution de DTX-PMPI est dialysée (0,5 - 1 kDa) pendant 3 jours pour éliminer le PMPI en excès, avant d'être ajoutée dans la suspension de nanohybride.

Les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ sont agités magnétiquement (400 tr/min) en présence du TCEP en excès pendant 30 min dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4). Le TCEP permet de rompre les éventuels ponts disulfures entre les PEG₃₀₀₀ mais aussi ceux du DTDTPA. Cette étape libère les fonctions thiols afin qu'elles puissent réagir avec la fonction maléimide du DTX-PMPI. Cependant, la quantité de TCEP engagée est 50 fois plus faible en comparaison de celle utilisée lors du greffage du DTX-PMPI dans les chapitres précédents. La quantité de TCEP est choisie de façon à limiter la rupture totale des ponts disulfures formés entre les DTDTPA mais aussi celle de l'accroche du DTDTPA sur les AuNPs. Ensuite, le DTX-PMPI est ajouté à la suspension de nanotubes après avoir homogénéisé l'ensemble dans un bain à ultrasons pendant 5 min. La quantité de DTX-PMPI est introduite dans les mêmes proportions que celles utilisées pour élaborer les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (sans AuNPs-DTDTPA) par rapport à la quantité de PEG₃₀₀₀ présente à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (1 PEG₃₀₀₀ : 20 DTX-PMPI) (Figure 163). Après 24 heures de réaction sous agitation magnétique (400 tr/min) à 25°C, la suspension est purifiée par ultrafiltration (500 kDa) pour éliminer le DTX-PMPI et le DTX qui n'a pas été activé par le PMPI et qui n'est donc pas couplé aux TiONts de ce fait, ainsi que les éventuelles traces de PMPI restantes qui n'auraient pas été éliminées par dialyse.

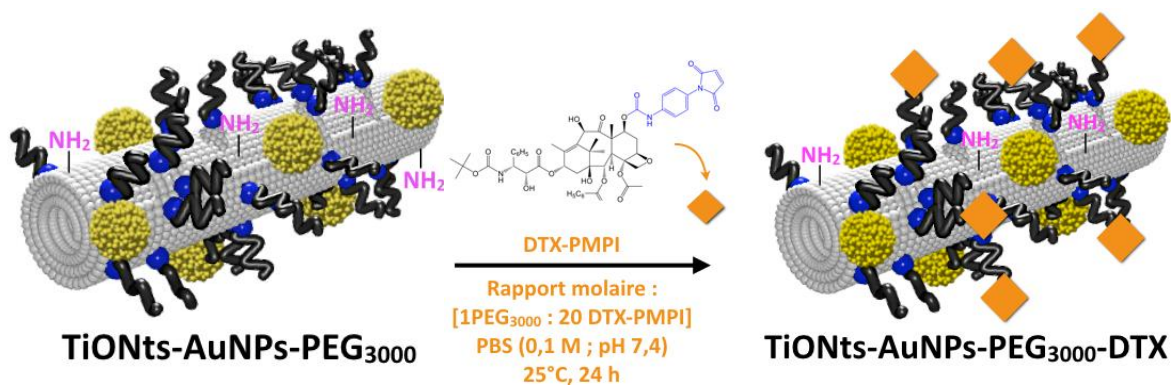


Figure 163 : Illustration du greffage du DTX-PMPI sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀.

Il est à noter que ce nanohybride est seulement caractérisé par ATG, zêtamétrie et spectroscopie UV-vis en raison du nombre important de fonctionnalisations à sa surface, rendant très difficile l'interprétation de certains résultats comme ceux d'infrarouge ou d'XPS.

III.2. Estimation de la quantité d'agent thérapeutique sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX

L'analyse thermogravimétrique est réalisée sous air avec une rampe de 5°C.min⁻¹ afin d'estimer le taux de DTX-PMPI présent à la surface des nanotubes (Tableau 35 et Figure 164). Cette technique de caractérisation montre que la perte de masse du nanohybride final est plus importante que celle des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ révélant la présence de l'agent thérapeutique à la surface des tubes. Le taux de greffage du DTX-PMPI est alors estimé à 0,30 DTX-PMPI.nm⁻². Même si le nombre de PEG₃₀₀₀ est moins important sur la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX, le taux de DTX-PMPI est proche de celui obtenu sur les TiONts modifiés par le PEG (sans la présence de nanoparticules d'or) possédant cette même longueur de chaîne carbonée (pour rappel : le taux de greffage était de 0,32 DTX-PMPI.nm⁻² sur les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX, Tableau 27/Figure 143). En effet, les fonctions thiols apportées par le DTDTPA peuvent aussi réagir avec la fonction maléimide du DTX-PMPI induisant un taux de greffage plus élevé. De plus, il n'est pas exclu que le DTX-PMPI s'accroche/s'adsorbe sur les fonctions amines de l'APTES non fonctionnalisées par les AuNPs-DTDTPA (le pH de greffage est de 7,4, voir Chapitre 2. III.), sur les chaînes de PEG₃₀₀₀ et/ou dans la cavité des tubes. Cette quantité de DTX améliorée par nanotube (1 700 *versus* 1 300 pour la première campagne *vivo* de 2014) pourrait accroître l'effet thérapeutique du nanohybride sur les cellules tumorales, avec en plus la présence des AuNPs. Cependant, il n'est pas exclu qu'une partie du DTX-PMPI soit adsorbée sur la surface du nanovecteur malgré des lavages répétés par ultrafiltration et soit susceptible de se décrocher *in vivo*.

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt(*)
TiONts	190	2,6	18	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	175	6,3	58	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-AuNPs	150	12,4	511	0,40 (±0,05) DTDTPA	7	2 200
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	150	16,1	3073	0,040 (±0,003) PEG ₃₀₀₀	4	220
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX	150	27,4	1049	0,30 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 700

Tableau 35 : Estimation des taux de greffage des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX par ATG. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des nanotubes.

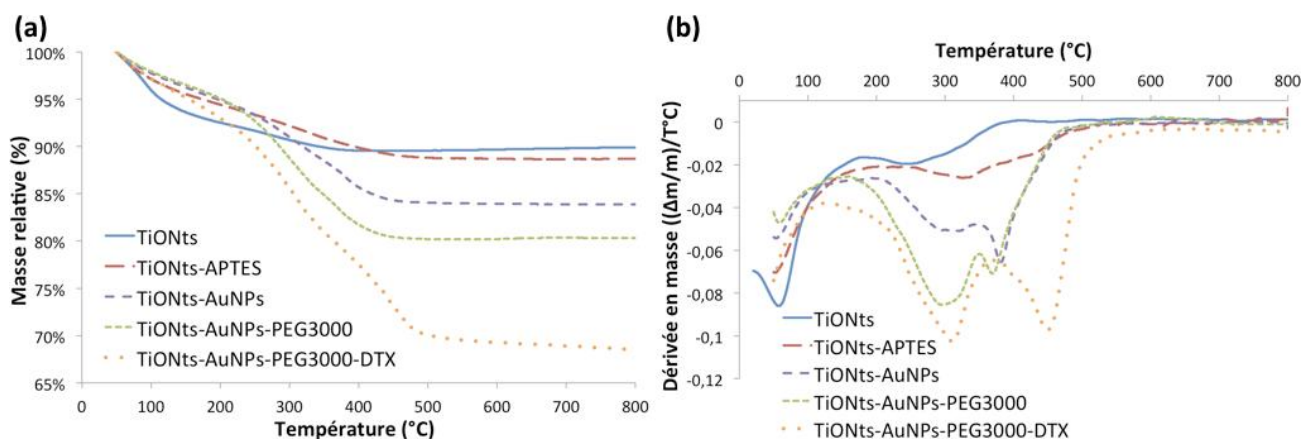


Figure 164 : Courbes (a) ATG et (b) DTG des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX sous air (25 mL.min⁻¹) avec une rampe de 5°C.min⁻¹.

III.3. Étude de la stabilité colloïdale des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX

Le suivi électrocinétique du nanohybride final montre une évolution du potentiel zêta en fonction du pH similaire à celle du nanohybride sans le greffage du DTX-PMPI (Figure 165). Néanmoins, l'écrantage de charges perceptible sur ces deux courbes est moins marqué pour le nanohybride final avec un potentiel zêta passant de -2 mV à -7 mV au pH physiologique. De plus, la valeur du point isoélectrique des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX semble être très légèrement décalée vers une valeur de pH plus faible (PIE_{nanohybride final} = 4,9 *versus* 5,1 pour l'étape de synthèse précédente).

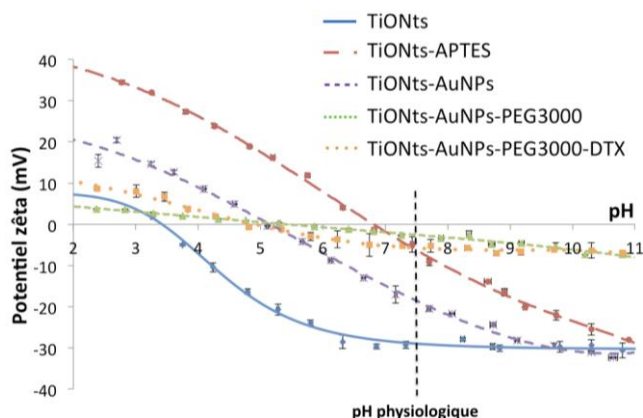


Figure 165 : Évolution du potentiel zêta en fonction du pH dans du NaCl (10^{-2} M) des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (la ligne verticale en pointillé représente le pH physiologique).

Tout comme l'analyse zêta, le greffage du DTX-PMPI à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ n'induit pas de différence significative sur la stabilité colloïdale du nanohybride, analysée en fonction du temps par spectroscopie UV-visible, dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) (Figure 166a). Ainsi, cette suspension, dans les conditions physiologiques, présente une stabilité colloïdale suffisante dans le temps pour injecter le nanohybride *in vivo* après avoir radiomarqué le DTDTPA par l'¹¹¹In. Par ailleurs, la Figure 166b montre que la suspension contenant le nanohybride final est toujours stable après 24 h dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4). De plus, la couleur marron de cette suspension prouve la présence des nanoparticules d'or sur les nanotubes de titanate (Figure 166b et Figure 80b).

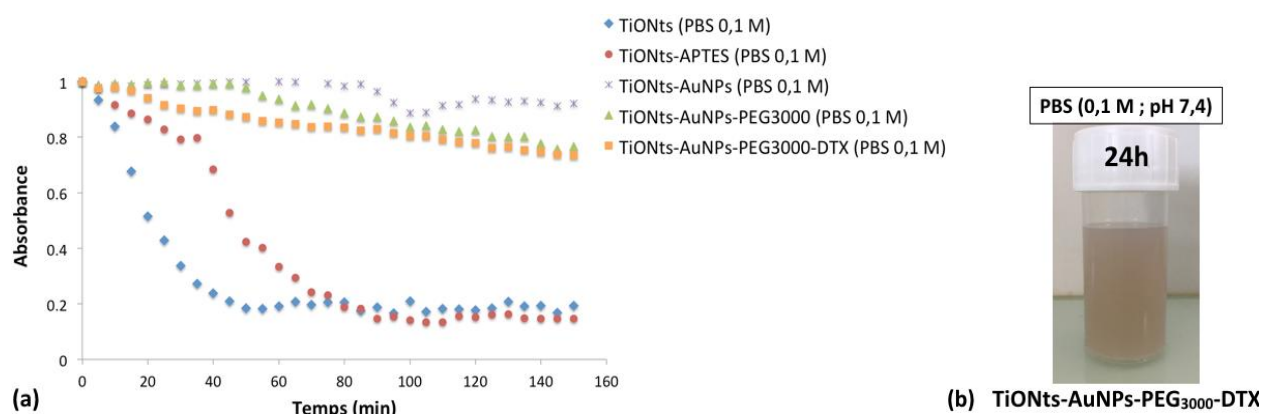


Figure 166 : Courbes d'absorbance en fonction du temps dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) à $\lambda = 600$ nm afin d'évaluer la stabilité colloïdale des TiONts, TiONts-APTES, TiONts-AuNPs, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. (b) Photographie d'une suspension de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) après 24 h.

III.4. Conclusions sur le greffage du DTX à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀

Les techniques de caractérisations n'ont pas permis de mettre en évidence le greffage covalent du DTX-PMPI. Néanmoins, l'analyse ATG a confirmé leur présence avec une perte de masse plus importante après cette fonctionnalisation. Le taux de DTX-PMPI a alors pu être estimé par le calcul : il est de l'ordre de $0,3$ DTX-PMPI.nm⁻². Une nouvelle fois, le nombre de DTX-PMPI est supérieur au nombre de thiols présents sur le nanohybride, indiquant qu'une partie est probablement accrochée *via* les

liaisons covalentes formées entre le groupement maléimide du PMPI avec les amines de l'APTES libres et avec les fonctions thiols du DTDTPA en plus de la fonction thiol du PEG₃₀₀₀. Il se peut aussi que le DTX-PMPI s'adsorbe sur les chaînes carbonées du polymère ou dans la cavité des TiONts. Enfin, ce nouveau nanohybride présente une stabilité colloïdale suffisante dans le temps et dans les conditions physiologiques pour envisager de l'injecter *in vivo*. Il est alors nécessaire d'évaluer son potentiel thérapeutique *via* des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* afin de le comparer avec la première génération de nanohybride développée (Chapitre 2. V.).

IV. Tests de cytotoxicité des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX sur des cellules PC-3

La cytotoxicité du DTX, des AuNPs-DTDTPA, des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX est évaluée sur les cellules PC-3 par la méthode déjà décrite Chapitre 2. V.1.). Brièvement, une gamme croissante de DTX (0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM et 500 nM) est utilisée pour évaluer la molécule libre et les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. Pour une concentration fixée en DTX, la quantité engagée des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (sans DTX) (courbe verte) correspond à la quantité de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ présents sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (courbe orange). Quant à la quantité engagée des AuNPs-DTDTPA (courbe bleu), elle correspond à la quantité de nanoparticules d'or modifiées présentes sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX.

Les résultats MTS sur la lignée cellulaire PC-3 montrent que les AuNPs-DTDTPA et les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ ne présentent pas de cytotoxicité sur la gamme étudiée à savoir de $4,1 \cdot 10^{-3}$ à $4,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et $3 \cdot 10^{-3}$ à $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'AuNPs-DTDTPA (à savoir que 100 nM de DTX correspond à une quantité de 0,2 μg de nanohybride par puits soit $1,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, rapport établi par ATG) (Figure 167). La cytotoxicité attendue du DTX seul est observée (courbe noire) avec une IC_{50} de 3,1 nM. Cette valeur est en accord, à la fois avec celle trouvée pour le DTX dans le chapitre 2 (IC_{50} : 2,2 nM) et avec la littérature [270]. Néanmoins, l' IC_{50} du DTX diffère de celle obtenue dans le chapitre 3 (IC_{50} : 20 nM) alors que le lot de DTX utilisé est le même (Figure 144). Ceci pourrait alors confirmer l'hypothèse d'un problème survenu lors de la culture cellulaire PC-3 pour ces expériences en fonction de la longueur de la chaîne de PEG. L'efficacité plus importante du nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (IC_{50} = 82 nM) par rapport au nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (dit de génération 1, chapitre 2) (IC_{50} = 360 nM), atteste d'un meilleur accès du DTX aux microtubules. Ces dernières étant dans la cellule, cela semble traduire une meilleure internalisation des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX dans les cellules, par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX de génération 1. Ces nanohybrides étant mieux dispersés, plus stables en suspension, avec de surcroît un potentiel zêta à pH 7,4 moins négatif (-7 mV vs. -20 mV), tout ceci n'est pas surprenant et devrait favoriser l'internalisation cellulaire (Chapitre 1. I.3.4. et III.). Finalement ces résultats très concluants car même si la cytotoxicité du nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX est plus faible que le DTX seul, le DTX garde une activité cytotoxique lorsqu'il est greffé sur le nanohybride (IC_{50} = 82 nM).

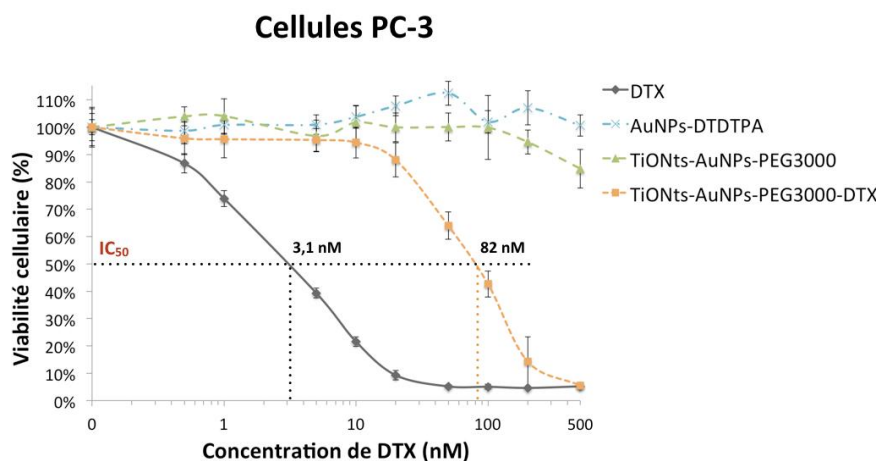


Figure 167 : Courbes de survie des cellules PC-3 après incubation du DTX seul, des AuNPs-DTDTPA, des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX.

V. Présentation des études pré-cliniques après injection intratumorale dans des tumeurs PC-3 des nanohybrides TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX

Des tests pré-cliniques sont en cours depuis le 5 septembre 2017 sur des souris Swiss nude mâles, porteuses de tumeurs de prostate humaine xénotransplantées sur leurs flancs, après injection IT notamment du nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. Dans un premier temps, des tests de biodistribution sont réalisés pour suivre le nanohybride préalablement radiomarqué par l'¹¹¹In grâce au DTDTPA. Puis, ces études vont permettre d'évaluer l'effet radiosensibilisant de ce nouveau nanohybride dans l'espoir d'observer un retard de croissance tumorale par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (chapitre 2). Ainsi, cette partie présente les conditions expérimentales déjà réalisées sur l'étude de biodistribution et sur l'étude de l'évolution de la croissance de tumeur de prostate. Des résultats sont à venir prochainement.

V.1. Présentation de l'étude de biodistribution des nanohybrides radiomarqués par l'¹¹¹In et premières images SPECT/CT

Une fois que les tumeurs ont atteint un volume allant de 200 à 300 mm³, les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX sont injectés en intratumoral (IT) sur 9 souris Swiss nude mâles. 50 µL de nanohybride contenant une activité de 1,4 MBq (la masse injectée est de 11,6 µg de nanohybride) (Annexe 8) sont injectés à plusieurs endroits dans la tumeur. L'étude de biodistribution *in vivo* après injection est réalisée en utilisant l'imagerie nucléaire SPECT/CT (NanoSPECT/CT®, small animal imaging tomographic gamma-camera, Bioscan Inc). Afin de s'assurer que les nanohybrides restent localisés au niveau du site d'injection, c'est-à-dire dans la tumeur, 3 animaux sont imagés à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 7 jours *via* SPECT/CT. Pour tous les animaux, le comptage-gamma des organes (permettant une

détection très sensible des éléments radioactifs) est réalisé à long terme après injection et après sacrifice (3 souris : comptage-gamma à 7 jours ; 3 souris : comptage-gamma à 15 jours ; 3 souris : comptage-gamma à 30 jours) afin d'évaluer avec une sensibilité plus importante le maintien, ou non, des nano-objets au niveau du site tumoral. De plus, après la durée nécessaire pour observer une décroissance suffisante de la radioactivité (typiquement un à deux mois après radiomarquage) des analyses par microscopie électronique en transmission (MET) et ICP (spectrométrie par torche à plasma, réalisée après dissolution des organes) seront réalisées sur des cellules sanguines, des coupes d'organes sains (foie, rein) et de tumeurs, ceci récupéré sur 4 animaux par groupe. Les observations par MET seront réalisées grâce au matériel de la plateforme d'imagerie cellulaire CellimaP de l'Université de Bourgogne dirigée par le Dr A. Bouchot²⁰ ; elles permettront une analyse détaillée de la localisation intracellulaire des nanohybrides au niveau intratumoral. L'analyse par ICP permettra une détermination quantitative de la biodistribution des éléments Au et Ti.

Les premières images SPECT/CT montrent que les nanohybrides radiomarqués par l'¹¹¹In sont toujours retenus dans la tumeur sept jours après injection IT (Figure 168). De plus, de 24 h jusqu'à 7 jours, la quantité de nanohybride restante dans la tumeur ne semble pas décroître et prouve la capacité de notre nanohybride à maintenir le DTX et les nanoparticules d'or au sein de la tumeur. Cependant, 1 h après injection, l'activité de l'indium est principalement détectée dans la vessie jusqu'à l'élimination complète de l'activité *via* les urines au bout de 24 h. Le fort taux de radioactivité retrouvé dans la vessie serait probablement dû au décrochage de l'In de son complexant (DTDTPA) ou au décrochage d'une partie du DTDTPA/In du nanohybride. Ces hypothèses restent à confirmer.

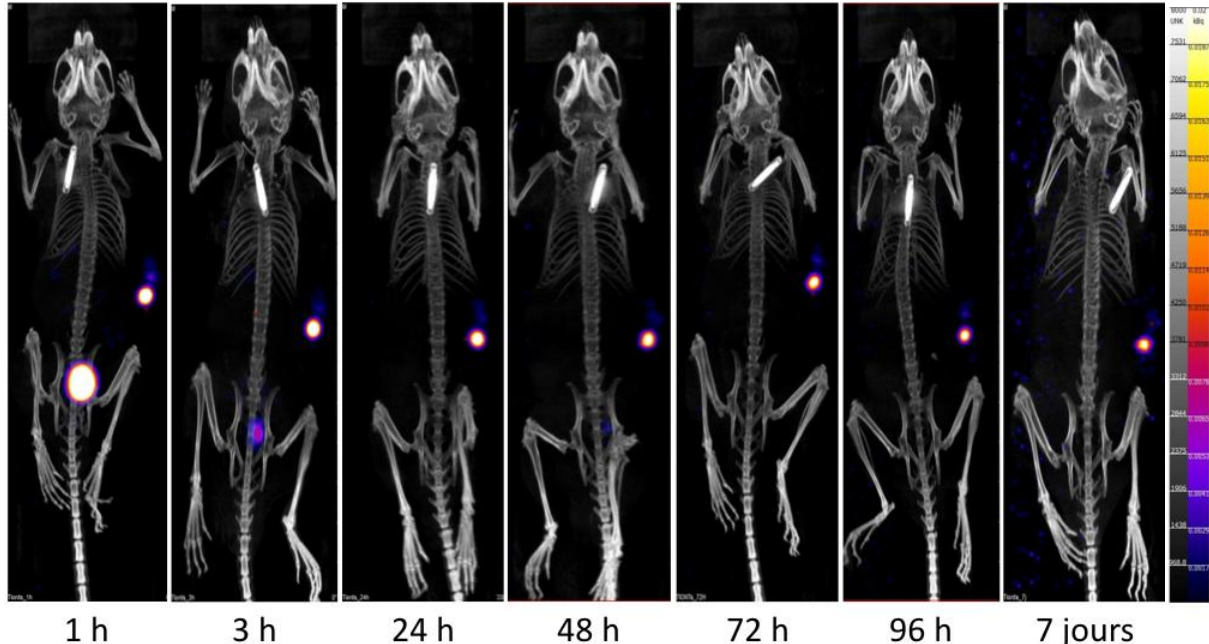


Figure 168 : Imagerie nucléaire SPECT/CT réalisée sur des souris Swiss nude mâle après injection IT des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX-¹¹¹In à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et à 7 jours (exprimée en fonction de l'activité de ¹¹¹In injectée (1,4 MBq) et en prenant compte de la diminution de l'activité de ¹¹¹In après l'injection).

²⁰ Davantage d'informations à cette adresse : <http://ifr100.u-bourgogne.fr/plateaux-techniques-et-plateformes-technologiques/plateforme-dimagerie-cellulaire-cellimap.html>

V.2. Présentation de l'étude de l'évolution de la croissance tumorale de prostate sans et avec un traitement radiothérapeutique

Des cellules de tumeurs de prostate humaines (PC-3) sont injectées en sous-cutané au niveau des flancs de souris Swiss nude mâles. Lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral moyen de 200 à 300 mm³, les souris sont aléatoirement réparties selon leur volume de tumeur individuel dans 8 groupes (AuNPs-DTDTPA, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX; sans ou avec RT) composés chacun de neuf souris en utilisant le logiciel Vivo manager® (Biosystemes, France). Afin d'évaluer l'effet bénéfique du nanohybride combiné à la radiothérapie (RT), 50 µL de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (contenant 24,9 µM de DTX greffé sur 10 µg de TiONts) sont injectés dans les tumeurs. La masse de TiONts injectée est la même que lors de la première campagne vivo, ceci afin de pouvoir juger de la meilleure efficacité, ou non, du nouveau nanohybride. Le volume injecté (50 µL) pour les groupes des AuNPs-DTDTPA et des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (sans et avec RT) contient les mêmes concentrations respectives en AuNPs-DTDTPA et en TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ que celles présentes sur le nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. Après 24 h d'incubation, les tumeurs sont irradiées durant trois jours consécutifs avec une dose quotidienne de 4 Gy (deux faisceaux opposés, photons de 220 kV, 13 mA) en utilisant un irradiateur petit animal de radiothérapie 3D guidée par l'image SARRP (X-STRAHL, UK). La planification des faisceaux et le calcul de la dose ont été réalisés avec le logiciel Muriplan (X-STRAHL). Les souris Swiss nude mâles sont préalablement anesthésiées (isoflurane, Vetflurane, Virbac, Danemark délivré par système MINERVE, Esternay, France) avant d'être irradiées. Le comportement et l'état de santé des souris sont surveillés deux fois par semaine et le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à une reprise de croissance tumorale (et ce jusqu'à un volume maximum de 2000 mm³). L'efficacité de chaque traitement sera évaluée par le paramètre "retard de croissance tumorale" qui est le temps nécessaire après traitement pour atteindre un volume tumoral de 1000 mm³. Les comparaisons des efficacités de chaque type de traitement seront analysées par un test statistique non paramétrique de Mann Whitney. Les étapes avant l'irradiation sont représentées dans la Figure 169. Des coupes des tumeurs ou des dissolutions de celles-ci seront réalisées puis analysées, respectivement au MET et par ICP, à l'issue de la durée la plus longue, afin de vérifier le maintien (ou non) des nanotubes et des nanoparticules d'or au sein de la tumeur et leurs localisations précises (intracellulaire, stroma...).

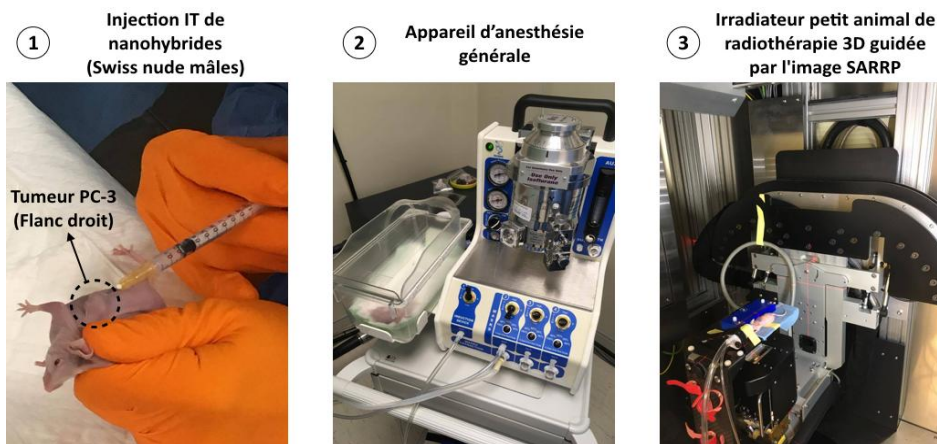


Figure 169 : Photographie des différentes étapes avant l'irradiation des tumeurs PC-3 sur des souris Swiss nude mâles. 4 groupes subissent la radiothérapie : AuNPs-DTDTPA + RT, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX + RT, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ + RT et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX + RT. Toutes les expériences sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne (France).

VI. Conclusions

Les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX ont été préparé par une synthèse étape par étape permettant de caractériser finement chaque étape de greffage. Plusieurs techniques d'analyse ont permis de prouver cette association inédite (les AuNPs couplées avec les TiONts) et les caractéristiques de chaque greffage présenté dans cette étude sont recensées dans le Tableau 36 et le Tableau 37.

Synthèses	Agents de couplage	Rapport molaire	Milieu réactionnel	pH de greffage	Température de greffage (°C)	Temps de réaction	Agitation magnétique (tr/min)	Purifications
TiONts-APTES	-	1 OH 3 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	5	60	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Activation des AuNPs-DTDTPA	EDC/NHS	100 EDC 200 NHS 1 COOH	Aqueux	5	25	90 min	400	-
TiONts-AuNPs	-	1 NH ₂ 0,6 COOH	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (500 kDa) * Lyophilisation
Activation du PEG ₃₀₀₀	PyBOP	1 PyBOP 1 COOH DIEA en excès	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	30 min	400	-
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	-	1 NH ₂ 1 COOH	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	24 h	400	* Centrifugation (20 000 g ; 20 min) * Ultrafiltration (500 kDa) * Lyophilisation
Activation du DTX par le PMPI	PMPI	1 DTX 4 PMPI	Tampon borate 0,1M	8,5	25	24 h	400	* Dialyse (0,5 - 1 kDa) * Lyophilisation
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX	-	1 PEG ₃₀₀₀ TCEP en excès 20 DTX-PMPI	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (500 kDa) * Lyophilisation

Tableau 36 : Procédures expérimentales des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre.

	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	-	3,3	-28	non	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	6,9	-6	non	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-AuNPs	EDC/NHS	5,1	-20	oui	0,40 (±0,05) DTDTPA	7	2 200
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	PyBOP	5,1	-2	oui	0,040 (±0,003) PEG ₃₀₀₀	4	220
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX	PMPI	4,9	-7	oui	0,30 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 700

Tableau 37 : Caractéristiques des différents greffages réalisés sur les TiONts au cours de ce chapitre. (*) Estimation du nombre de molécules par nanotube par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes.

Le greffage des nanoparticules d'or fonctionnalisées par le DTDTPA, à la surface des TiONts-APTES, a été une réussite *via* un couplage peptidique en milieu aqueux (EDC/NHS). Cette voie de greffage a permis de limiter l'agglomération à la fois des AuNPs et des TiONts. En effet, les clichés STEM ont montré que les AuNPs-DTDTPA ne forment pas d'agglomérats entre elles et sont bien réparties sur l'ensemble de la surface des TiONts. De plus, les AuNPs observées ont été retrouvées uniquement sur les TiONts et nulle part ailleurs sur la grille. Par ailleurs, d'autres techniques de caractérisations ont permis de prouver la réussite de l'assemblage telles que l'IR-TF, l'XPS, la zétamétrie, l'UV-visible ou

encore l'ATG. La quantité de AuNPs-DTDTPA a été estimée *via* un comptage MET sur les nanotubes mais aussi par l'ATG. Ces deux techniques ont montré des résultats différents. En effet, la perte de masse relative au DTDTPA greffé sur les AuNPs a conduit à un taux de greffage de $0,4 \text{ DTDTPA.nm}^{-2}$ sur les TiONts-AuNPs, ce qui équivaut à une quantité moyenne de 20 nanoparticules d'or par nanotube de titanate. Tandis que visuellement, une moyenne de 40 AuNPs a été observée sur les TiONts par analyse des images STEM. L'ICP a alors permis de trancher en dosant les TiONts-AuNPs ($31,7 \text{ mg Ti/L}$ et $21,4 \text{ mg Au/L}$) et a permis de corroborer l'analyse STEM avec une estimation de l'ordre de 34 AuNPs/TiONT . De plus, les AuNPs-DTDTPA ont procuré une stabilité colloïdale remarquable au nanohybride dans les conditions physiologiques de manière à améliorer potentiellement le comportement *in vitro* et *in vivo* des nanotubes. Le rapport molaire entre les COOH du DTDTPA et les NH₂ de l'APTES est choisi de façon à anticiper le greffage ultérieur du poly(éthylène) glycol (HS-PEG₃₀₀₀-COOH) avec les amines libres restantes.

Les résultats obtenus sur le taux de greffage du PEG₃₀₀₀ en milieu organique à la surface des nanotubes ($0,04 \text{ PEG}_{3000}.\text{nm}^{-2}$) ont montré une quantité plus faible de polymère en comparaison à cette même méthode de greffage réalisée sans AuNPs ($0,09 \text{ PEG}_{3000}.\text{nm}^{-2}$) (Chapitre 3. II.2.). Cette baisse est expliquée par la quantité de fonctions NH₂ des TiONts-APTES déjà consommées *via* les AuNPs-DTDTPA et par la gêne stérique occasionnée par le DTDTPA. Cependant, l'absorbance en fonction du temps des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ dans le PBS ($0,1 \text{ M}$; $\text{pH } 7,4$) a montré que ce nanohybride était aussi stable que les TiONts-PEG₃₀₀₀ (voie de greffage en milieu organique). Même si le greffage du PEG₃₀₀₀ sur les TiONts-AuNPs n'a pas permis d'avoir une stabilité colloïdale en fonction du temps, aussi bonne qu'avec les TiONts-AuNPs, elle reste tout de même très bonne et nettement supérieure à celle des TiONts nus et des TiONts-APTES. Par ailleurs, au pH physiologique ($7,4$), les charges de surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ sont fortement masquées par la présence du polymère en raison de la longueur des chaînes carbonées greffées à la surface des tubes ($\approx 0 \text{ mV}$). Le greffage de ce PEG hétérobifonctionnel a permis en outre d'avoir une fonction d'intérêt à la surface du nanovecteur (ici, le groupement thiol) en vue de greffer le DTX-PMPI.

Les techniques de caractérisations utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence le greffage covalent du DTX-PMPI. Les nombreuses fonctionnalisations à la surface du nanohybride ont en effet rendu très difficile l'interprétation de certaines techniques d'analyse comme l'infrarouge ou l'XPS (résultats non présentés). En revanche, l'analyse ATG a confirmé la présence du DTX, avec une perte de masse plus importante pour cette étape ultime de greffage. Même si le nombre de thiols des PEG₃₀₀₀ est relativement faible à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀, en comparaison des TiONts-PEG₃₀₀₀ (sans AuNPs-DTDTPA), le taux de DTX-PMPI greffé est similaire pour ces deux fonctionnalisations ($0,3 \text{ DTX-PMPI.nm}^{-2}$). Une nouvelle fois, le nombre de DTX-PMPI est supérieur au nombre de thiols présents sur le nanohybride indiquant qu'une partie n'est pas accrochée *via* les liaisons covalentes entre le groupement maléimide du PMPI et la fonction thiol du PEG₃₀₀₀. En effet, comme vu au cours de ce manuscrit, la réaction de couplage de la fonction maléimide peut avoir lieu aussi bien avec des thiols ($\text{pH} < 7,5$) qu'avec des amines (perte de spécificité maléimide-thiol pour des $\text{pH} > 7,5$) puisque le pH de greffage du DTX-PMPI à la surface des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ est de $7,4$. Ce pH pourrait avoir augmenté au cours de la réaction pourtant tamponnée favorisant ainsi le greffage des maléimides également avec les très nombreuses fonctions amines présentes, en plus de celui avec les fonctions thiols ($14\,230 \text{ NH}_2/\text{TiONT}$ *versus*. $220 \text{ SH}/\text{TiONT}$ apportés par le greffage des PEG₃₀₀₀ ainsi que $9\,600 \text{ SH}/\text{TiONT}$ apportés par le DTDTPA greffé sur les AuNPs). Enfin, ce nouveau nanohybride présente une stabilité

colloïdale suffisante dans le temps et dans les conditions physiologiques pour envisager de l'injecter *in vivo*.

Dans un premier temps, l'activité cytotoxique du DTX présent sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX a été évaluée sur des cellules PC-3 *via* des tests MTS. Même si la cytotoxicité du nanohybride est plus faible que celle du DTX seul ($IC_{50} = 82 \text{ nM}$ *versus* $3,1 \text{ nM}$), celle-ci est élevée et bien supérieure à celle du nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX de génération 1 ($IC_{50}=360 \text{ nM}$). Ceci prouve un meilleur accès des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX aux microtubules, suggérant une meilleure internalisation. Cette meilleure internalisation n'est, en soit, pas surprenante puisque ce nouveau nanohybride est mieux dispersé, plus stable en suspension dans les conditions physiologiques et présente moins de charges négatives en surface (Chapitre 1. I.3.4. et III.). Des études *in vivo* sont actuellement réalisées et le manuscrit sera complété lorsque les résultats auront été traités. Ces tests biologiques, décrits dans le paragraphe V. et dans l'Annexe 7, vont permettre d'évaluer l'effet radiosensibilisant de ce nouveau nanohybride après injection IT sur des souris Swiss nude mâles porteuses de tumeurs de prostate humaine xénotransplantées sur leurs flancs, dans l'espoir d'observer un retard de croissance tumorale par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (Chapitre 2.). Des tests de biodistribution sont aussi réalisés pour suivre le nanohybride préalablement radiomarké par l'¹¹¹In grâce au DTDTPA, les premiers résultats obtenus montrent que les nanohybrides radiomarkés par l'¹¹¹In sont toujours retenus dans la tumeur sept jours après injection IT.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion

L'objectif de cette thèse était de développer une plateforme multifonctionnelle, à base de nanotubes de titanate, pour apporter une nouvelle solution thérapeutique au cancer de la prostate, la voie d'administration retenue étant l'injection intratumorale. Il a alors été nécessaire de synthétiser des nanotubes de titanate pré-fonctionnalisés par différents ligands organiques, pour améliorer leur stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. D'autres étapes de fonctionnalisations furent également nécessaires pour rendre ces nanotubes détectables par imagerie nucléaire SPECT/CT et pour délivrer, grâce à eux, des agents chimiothérapeutiques et radiosensibilisants pour le traitement du cancer.

Tout d'abord, les TiONts ont été obtenus par synthèse hydrothermale en milieu basique pour avoir la morphologie désirée et des dimensions contrôlées. L'analyse MET a permis de montrer que les TiONts avaient une structure enroulée en spirale et une cavité interne accessible. Les dimensions obtenues ont alors été de $(170 \pm 50 \text{ nm})$ pour la longueur, $(10 \pm 1 \text{ nm})$ pour le diamètre extérieur et $(4 \pm 1 \text{ nm})$ pour la cavité interne. Plusieurs synthèses ont été réalisées et finalement trois, jugées optimales, ont été mélangées pour conduire à deux lots aux caractéristiques similaires, utilisés pour tous ces travaux de thèse (2 400 mg par lot). Les TiONts sans modification de surface ont montré qu'ils n'étaient pas stables dans les conditions physiologiques (PBS 0,1 M ; pH 7,4) et ont tendance à s'agglomérer rapidement. Ces nanomatériaux nécessitent alors d'être pré-fonctionnalisés, en utilisant les fonctions hydroxyles présentes à leur surface (estimées à $(10,6 \pm 1,5) \text{ OH.nm}^{-2}$), pour augmenter leur stabilité colloïdale en suspension et pour permettre leur utilisation à des fins biologiques.

Une première pré-fonctionnalisation a été réalisée avec un agent siloxanique, l'APTES, possédant à l'une de ses extrémités une fonction siloxane très réactive avec les hydroxyles de surface des TiONts et à l'autre extrémité, une fonction NH_2 . Cette dernière a permis de réaliser un couplage peptidique avec la fonction COOH d'un dérivé du poly(éthylène) glycol ($\text{HS-PEG}_{3000}\text{-COOH}$, PEG_{3000}). Le greffage du PEG_{3000} à la surface des TiONts-APTES s'est déroulé dans une suspension aqueuse *via* les agents de couplage EDC/NHS. La présence de l'APTES puis du PEG a été mise en évidence par différentes techniques d'analyses (IR-TF, XPS, zêtamétrie) et les taux de recouvrement ont été estimés par ATG, ils sont de l'ordre de $5,3 \text{ APTES.nm}^{-2}$ et de $0,06 \text{ PEG}_{3000}\text{.nm}^{-2}$ à la surface des tubes. La quantité importante d'APTES à la surface des TiONts est notamment due à la formation d'une multicouche d'alcoxysilanes. L'analyse zêtamétrique et les mesures d'absorbance en fonction du temps ont montré que le greffage de l'APTES à la surface des tubes n'a pas permis d'améliorer significativement la stabilité colloïdale du nanohybride dans les conditions physiologiques tandis que les TiONts- PEG_{3000} ont été suffisamment stables dans le temps pour envisager les expériences biologiques prévues. Ce polymère hétérobifonctionnel a été choisi car il présente un groupement thiol à son extrémité libre, afin de coupler un agent thérapeutique : le docétaxel, DTX, qui est largement utilisé pour inhiber les tumeurs de prostate, ceci grâce à un agent de couplage, le PMPI, *via* des liaisons thioéthers. Par ailleurs, les fonctions amines de l'APTES n'ayant pas été fonctionnalisées par le polymère, ont permis de greffer un agent chélatant (le DOTA) pour suivre la biodistribution des nanotubes par SPECT/CT après l'avoir radiomarqué avec de ^{111}In .

La stratégie utilisée pour greffer l'agent thérapeutique et l'agent chélatant sur la surface des TiONts s'est avérée concluante. L'activation du DTX par le PMPI a été mise en évidence par différentes techniques de caractérisations (IR-TF, RMN ^1H et XPS). Le taux de DTX-PMPI déterminé par ATG est bien

supérieur à la quantité de thiols présents à la surface des TiONts ($0,24 \text{ DTX.nm}^{-2}$ pour seulement $0,06 \text{ PEG}_{3000}.\text{nm}^{-2}$). Cependant, il n'est pas impossible que le DTX modifié soit également greffé *via* des liaisons covalentes avec les fonctions amines résiduelles de l'APTES, ce qui expliquerait ce taux de greffage élevé du DTX et justifierait la bonne stabilité de l'accroche, malgré des lavages répétés. Une adsorption forte du DTX entre les chaînes de PEG ou à l'intérieur de la cavité des tubes ne peut cependant pas être totalement exclue. Concernant l'agent chélatant, le DOTA a été accroché sur les amines restantes de l'APTES. Les taux de greffage déterminés sont de l'ordre de $2,1 \text{ DOTA.nm}^{-2}$. Le nanohybride multifonctionnel obtenu présente une stabilité colloïdale suffisante dans les conditions physiologiques pour pouvoir réaliser les études *in vitro* et *in vivo*.

Afin de valider biologiquement ce nanohybride multifonctionnel (dit de "génération 1" dans le cadre de cette thèse) il a été nécessaire de l'évaluer sur des modèles appropriés. Dans un premier temps, des tests *in vitro* ont été effectués sur les TiONts-APTES, brique élémentaire de base de la constitution du nanohybride multifonctionnel. Les résultats ont démontré que les TiONts-APTES ne présentaient pas de toxicité et de génotoxicité sur les lignées cellulaires BV2 et HepG2. D'autres essais biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés sur le nanohybride final. Le DTX a gardé son activité cytotoxique lorsqu'il est greffé sur le nanohybride, sur les deux lignées cancéreuses de prostate étudiées (cellules 22Rv1 et PC-3), même s'il était moins actif que le DTX non greffé. De plus, l'administration intratumorale du nanohybride, dans les tumeurs de prostate PC-3 xénogreffées sur le flanc de souris, a permis de le garder à plus de 70% de la quantité totale injectée, sept jours après son injection en IT, ce qui a permis d'améliorer son efficacité radiothérapeutique, sans qu'il puisse diffuser dans l'organisme et en permettant ainsi d'éviter potentiellement les effets secondaires du taxane. En effet, le traitement en présence du nanohybride sans et avec radiothérapie a été significativement plus efficace que le DTX seul, ceci en comparant les différentes évolutions des volumes tumoraux durant plus de trois mois.

Par la suite, plusieurs autres molécules ont été testées pour pré-fonctionnaliser les TiONts nus, toujours dans l'optique d'améliorer leur stabilité colloïdale et d'avoir des groupements réactifs en surface pour les greffages ultérieurs. Ces nouveaux ligands ont été capables de rendre la surface des TiONts plus réactive en créant cette fois-ci une monocouche autour des nanotubes, tout en améliorant la stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques. Leur présence à la surface des TiONts a été démontrée, avec des liens covalents entre le titane et ces ligands, par les techniques de caractérisation mises en œuvre (IR-TF et XPS). Ainsi, le protocole de greffage de l'APTES a été revu et modifié en conséquence pour former une monocouche siloxanique. Un autre alcoxysilane, l'AHAMTES, a été utilisé car il lui est théoriquement impossible de former plusieurs couches et de se décrocher en milieu aqueux. D'autres ligands tels que des catéchols ou des phosphonates ont aussi été accrochés sur les TiONts nus. Concernant les catéchols, le DHCA et la LDOPA peuvent se transformer en quinone en milieu acide et en présence d'oxygène, limitant leur greffage. Quant à la forme leukochrome, elle s'obtient particulièrement dans des milieux basiques, après une cyclisation intramoléculaire des quinones, ce qui conduit à éliminer les fonctions réactives pour de futurs greffages. Le pH retenu de 6 semble alors le plus adapté pour éviter tous ces phénomènes mais au détriment d'un taux de greffage important, en raison d'une plus faible déprotonation des hydroxyles du catéchol ($1,2 \text{ LDOPA.nm}^{-2}$ et $1,4 \text{ DHCA.nm}^{-2}$). Ainsi, pour limiter ces réactions d'oxydation, l'utilisation de la molécule NDOPA a permis de montrer que la présence de la fonction NO_2 sur le cycle aromatique du catéchol permettait de réduire les transformations de cette molécule. D'ailleurs, le taux de greffage de la NDOPA sur les TiONts, déterminé par ATG, a été bien meilleur car le pH de synthèse se rapproche fortement du pKa des deux OH par rapport aux cas de la LDOPA et du DHCA ($2,8 \text{ NDOPA.nm}^{-2}$). Ces résultats ont été confirmés par une

augmentation significative de la contribution de la liaison Ti-O-catéchol (en XPS et IR). Cependant, le greffage des alcoxysilanes et de la NDOPA n'a pas permis d'améliorer significativement la stabilité colloïdale dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4). Quant aux phosphonates, ils ont montré qu'ils conduisaient à une dispersion remarquable et à une stabilité colloïdale très intéressante lorsqu'ils étaient combinés avec les TiONts et ceci malgré le fait que leurs taux de greffage soient plus faibles que ceux des alcoxysilanes ou des catéchols (1,1 PHA.nm⁻² ; 0,6 ALD.nm⁻² ; 0,2 (HO)₂-(O)P-PEG-NH₂.nm⁻²). Cependant, c'est bel et bien les TiONts-APTES synthétisés par le nouveau protocole qui ont été retenus pour l'étude du greffage de polymères de tailles différentes (HS-PEG_n-COOH, n = 3 000, 5 000 et 10 000) et lors du développement d'un nouveau nanohybride (dit de génération 2) combinant à la fois les TiONts et des nanoparticules d'or, elles-mêmes modifiées, par le DTDTPA.

Les TiONts-APTES (nouveau protocole) ont donc été fonctionnalisés par plusieurs longueurs de chaînes PEGylées, selon deux méthodes de greffage *via* des agents de couplage peptidique : EDC/NHS (en milieu aqueux) et PyBOP (en milieu organique). Le greffage par voie organique (PyBOP) s'est révélé le plus prometteur, avec des taux de greffages deux fois supérieurs par rapport à l'utilisation de l'EDC/NHS en voie aqueuse (0,09 PEG₃₀₀₀.nm⁻², 0,05 PEG₅₀₀₀.nm⁻², 0,03 PEG₁₀₀₀₀.nm⁻² en phase organique *versus* 0,05 PEG₃₀₀₀.nm⁻², 0,03 PEG₅₀₀₀.nm⁻², 0,02 PEG₁₀₀₀₀.nm⁻² en phase aqueuse). Les caractérisations, réalisées par IR, XPS, ATG, zétamétrie et UV-vis ont montré l'influence que pouvait avoir la longueur de chaîne carbonée sur le taux de greffage, la stabilité colloïdale et la dispersion. En effet, l'encombrement stérique généré par le PEG sur les nanotubes s'est amplifié au fur et à mesure que le poids moléculaire du polymère augmentait. Ainsi, l'utilisation d'un polymère avec une plus grande longueur de chaîne carbonée conduit à un taux de greffage plus faible tout en masquant les charges à la surface des tubes. Ensuite, le greffage du DTX-PMPI a été réalisé sur chacun des polymères hétérobifonctionnels se trouvant à la surface du nanohybride, *via* la voie organique. En augmentant le nombre de polymère à la surface des tubes, le nombre de DTX-PMPI a, lui aussi, augmenté. Par ailleurs, l'activité cytotoxique des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX s'est révélée plus importante sur les cellules PC-3, par rapport au vecteur de génération 1, sans doute en raison d'une meilleure dispersion des TiONts dans le milieu de culture et donc à un meilleur accès du DTX (TiONts moins agglomérés) aux cellules (IC₅₀ : 100 nM, 0,32 DTX.nm⁻² *versus* IC₅₀ : 360 nM, 0,24 DTX.nm⁻² pour la génération 1). Cependant, cette activité cytotoxique du DTX décroît dans le cas du PEG₁₀₀₀₀ (IC₅₀ = 360 nM,) en comparaison des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (IC₅₀ = 100 nM). En effet, l'accroche du DTX sur un polymère avec une chaîne carbonée plus courte aurait tendance à favoriser l'interaction de l'agent thérapeutique avec les microtubules.

Forts des résultats précédents, la modification de surface des nanotubes de titanate par l'APTES a permis de les coupler avec des nanoparticules d'or (AuNPs), elles-mêmes modifiées par le DTDTPA, afin d'élaborer un nouveau nanohybride théranostique. Le greffage des AuNPs a pour objectif d'accroître l'effet radiosensibilisant dans les sites tumoraux, après injection intratumorale. Cette association inédite, réalisée par les agents de couplage EDC/NHS, a été une réussite et a été prouvée par différentes techniques de caractérisations : ATG, zétamétrie, STEM, XPS, spectroscopies UV-vis et IR-TF. Parmi celles-ci, les images STEM ont montré visuellement que les AuNPs sont observées uniquement à la surface des TiONts et nulle part ailleurs sur la grille, prouvant que le greffage et la purification ont été optimaux. Les nanoparticules d'or modifiées par le DTDTPA ont apporté une stabilité colloïdale remarquable au nanohybride, dans les conditions physiologiques, de manière à améliorer potentiellement le comportement *in vivo* du nanohybride.

Il a été de nouveau nécessaire de greffer un polymère hétérobifonctionnel (HS-PEG₃₀₀₀-COOH) pour améliorer la biocompatibilité du nanohybride *via* le couplage peptidique, en voie organique, à l'aide du PyBOP. Les techniques d'analyses ont permis de conclure quant au greffage covalent de ce polymère à la surface des TiONts-AuNPs. Le taux de greffage des PEG₃₀₀₀ à la surface des nanotubes a été plus faible par rapport à ce qui avait été obtenu par ce même type de couplage mais sans AuNP (TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ : 0,04 PEG₃₀₀₀.nm⁻² vs. TiONts-PEG₃₀₀₀ : 0,09 PEG₃₀₀₀.nm⁻²). Ces résultats étaient attendus puisqu'une partie des amines de l'APTES ont déjà été fonctionnalisées par les AuNPs-DTDTPA. Même si cette fonctionnalisation n'a pas permis d'avoir une stabilité colloïdale aussi bonne qu'avec les TiONts-AuNPs, elle reste tout de même supérieure au cas des TiONts nus et des TiONts-APTES dans le PBS (0,1 M ; pH 7,4) et est suffisante pour envisager des essais biologiques.

Les techniques de caractérisation n'ont pas permis de mettre en évidence le greffage covalent du DTX-PMPI. Cependant, le taux de greffage du DTX-PMPI, déterminé par l'ATG, a été similaire aux précédents et ce, malgré un taux de polymère faible. En effet, le taux de greffage du DTX-PMPI à la surface des TiONts modifiés par le PEG₃₀₀₀ avec et sans nanoparticules d'or a été de 0,3 DTX-PMPI.nm⁻², contre 0,09/0,03 PEG₃₀₀₀.nm⁻². Cette quantité élevée est notamment due à un nombre de fonctions thiols plus important apporté par le DTDTPA mais sans doute également au greffage du DTX-PMPI sur des amines résiduelles ou en raison d'une adsorption forte de cette molécule, sur/dans les tubes ou entre les chaînes de PEG. Des tests *in vitro* sur des cellules PC-3 ont été effectués. Même si la cytotoxicité du nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX a été plus faible que celle du DTX seul, le DTX a gardé une activité cytotoxique intéressante lorsqu'il est greffé sur le nanohybride. Les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les AuNPs-DTDTPA, ne sont pas toxiques. Enfin, ce nouveau nanohybride a présenté une stabilité colloïdale suffisante dans le temps et dans les conditions physiologiques pour radiomarquer le DTDTPA par l'¹¹¹In et réaliser les études *in vivo*. Les études sont en cours.

Ces TiONts fonctionnalisés apparaissent comme un nouvel outil polyvalent dans le domaine médical pour lutter contre le cancer et particulièrement le cancer de la prostate.

Perspectives

Depuis le 5 septembre 2017, une étude pré-clinique *in vivo* sur les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX est en cours pour évaluer l'effet radiosensibilisant de ce nouveau nanohybride. L'étude de la croissance de tumeurs de prostate xénotreffées sur des souris Swiss nude mâles permettra de montrer si la présence des nanoparticules d'or a un effet significatif sur le traitement radiothérapeutique, lorsqu'il est combiné avec le DTX. Pour ce faire, différents échantillons sont en train d'être testés après injection intratumorale (IT) : TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX, AuNPs-DTDTPA, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ et TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. La moitié des souris correspondant à ces différents lots a été irradiée durant trois jours consécutifs avec une dose quotidienne de 4 Gy. En parallèle, des études de biodistribution sont aussi en cours après le radiomarquage du nanohybride par l'¹¹¹In. Ces études ont pour but d'observer un éventuel retard de croissance tumorale supplémentaire pour les TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX par rapport aux TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX. L'objectif est aussi d'évaluer si le nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX de seconde génération (Chapitre 4.) conduira à un effet plus intéressant que son homologue de première génération (Chapitre 2.), le taux de DTX à la surface des TiONts ayant été amélioré et la stabilité colloïdale des nanotubes également.

Par ailleurs, il serait judicieux de trouver une méthode afin de doser précisément les AuNPs présentes à la surface des TiONts. En effet, les résultats obtenus entre l'ATG, l'ICP ou encore le MET ont montré des disparités. De plus, il est aussi nécessaire de doser le DTX-PMPI greffé sur le polymère, à la surface des TiONts et de faire la part des choses entre les différentes autres possibilités de greffage/adsorption du DTX-PMPI : sur les amines résiduelles en surface des tubes, sur les chaînes carbonées des polymères, dans la cavité des tubes *etc.* Une partie du DTX-PMPI pourrait être inefficace selon sa localisation et son accessibilité.

D'autre part, à chaque étape de l'élaboration de ce nanohybride complexe, le greffage de chaque composé organique peut encore être optimisé, pour avoir finalement une quantité de DTX la plus élevée possible sur le nanohybride et une activité cytotoxique plus importante.

Les TiONts-APTES ont été choisis comme base de la nanoplateforme développée car ils ont fait l'objet de nombreuses études au sein de l'équipe BH2N, où s'est déroulée cette thèse. Les études biologiques mises en œuvre en parallèle de ma thèse ont montré que les TiONts-APTES sont intéressants car ils n'induisent pas de cytotoxicité, ni de génotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires. Néanmoins, il serait très intéressant de changer de stratégie et de développer un nouveau nanohybride TiONts modifiés par des mono- ou bisphosphonates. En effet, les résultats obtenus pour ces greffages sont très prometteurs avec notamment une stabilité colloïdale bien meilleure qu'avec les TiONts-APTES. Il s'agirait alors de réaliser les mêmes démarches que celles utilisées au cours de ces travaux de thèse, en améliorant la nanoplateforme *via* des phosphonates tel que l'alendronate ou le poly(éthylène) glycol hétérobifonctionnel de type phosphonate ((HO)₂-(O)P-PEG-NH₂), possédant tous deux une fonction amine à l'une des extrémités. Il serait alors nécessaire d'évaluer biologiquement ce nanohybride, comme ce fut le cas avec les TiONts-APTES et de greffer à leur surface du DTX ou une autre molécule d'intérêt.

Finalement, la cavité interne des TiONts n'a pas été exploitée lors de ces travaux de thèse. En effet, la morphologie des TiONts les rend particulièrement atypiques. Il serait alors judicieux

d'immobiliser des molécules biologiquement intéressantes dans cette cavité, pour mieux les protéger face aux conditions biologiques et pour les relarguer dans la zone souhaitée, en fonction de l'environnement (pH, température, stimulus) [36]. Pour y arriver, l'utilisation d'une chimie clic peut s'avérer utile pour lier la drogue aux TiONts puis la libérer rapidement sous l'effet d'un rayonnement par exemple, d'où le nom de click-unclick [310]. Cette perspective pourra alors mettre en lumière tout le potentiel des TiONts.

Forts de tous ces résultats, nous avons montré que les TiONts peuvent être utilisés comme des nanovecteurs polyvalents, de nouvelles applications peuvent être envisagées avec l'utilisation, par exemple, de la chimie clic pour greffer différentes molécules biologiques comme des anticorps, des protéines ou des ARN. Sur le volet des nouvelles applications, l'objectif de départ était d'utiliser les TiONts comme un nouveau nanovecteur capable de circuler dans l'organisme pour agir spécifiquement dans les zones ciblées. Cette approche pourrait être envisagée pour le ciblage actif en utilisant des antigènes spécifiques de prostate dans le cas d'injection systémique ou encore être utilisée dans le cas de cancers diffus et lorsqu'il est difficile d'atteindre les tumeurs. L'idée sera aussi de revenir sur une des premières applications étudiées par notre équipe, à savoir de traiter les glioblastomes. Dans ce contexte, les TiONts devront franchir les barrières biologiques (exemple : hémato-encéphalique) restreignant l'accès à ces cellules cibles par voie intraveineuse.

Concernant la chimie clic, le couplage entre des azotures et des alcynes fait partie des réactions chimiques dites bio-orthogonales, elles sont jugées comme biocompatibles et d'une grande sélectivité. Dans notre cas, le greffage du docétaxel ou des macrocycles peut être envisagé par chimie clic afin d'améliorer leur concentration à la surface du nanohybride [311].

Concernant maintenant le greffage de molécules biologiques (anticorps, protéines, ARN *etc.*), l'objectif pourrait être d'améliorer le ciblage et se lier spécifiquement aux récepteurs ciblés, c'est le cas de l'exemple déjà mentionné concernant le greffage d'antigènes spécifiques de prostate sur les TiONts. Ces molécules ont pour objectif de modifier les comportements biologiques des nanomatériaux [190]. Ces greffages permettraient alors de traiter des maladies spécifiques.

Annexes

Annexe 1 Valorisation de ce travail

Publications

N°	Titre	Auteurs	Revue
P1	The enhancement of radiotherapy efficacy with docetaxel-titanate nanotubes as a new nanohybrid for localized high-risk prostate cancer	C. Mirjolet, J. Boudon, <u>A. Loiseau</u> , S. Chevrier, T. Gautier, R. Boidot, J. Paris, N. Millot, G. Créhange	Eur. J. Cancer, 50, 67-67 (2014). Acte de colloque référencé dans W.o.K
P2	Preclinical development of a docetaxel nanocarrier to enhance prostate cancer radiosensitivity	G. Créhange, J. Boudon, R. Boidot, S. Chevrier, C. Dalban, <u>A. Loiseau</u> , B. Collin, A. Oudot, T. Gauthier, N. Millot, C. Mirjolet	J. Clin. Oncol., 33, (2015). Acte de colloque référencé dans W.o.K.
P3	Dispersion of titanate nanotubes for nanomedicine: comparison of PEI and PEG nanohybrids	A.L. Papa, J. Boudon, V. Bellat, F. Sallem, <u>A. Loiseau</u> , R. Chassagnon, V. Bérard, N. Millot	Dalton Trans. 44, 739-746 (2015)
P4	Taxane-grafted metal-oxide nanoparticles as a new theranostic tool against cancer: The promising example of docetaxel-functionalized titanate nanotubes on prostate tumors	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, N. Millot	Adv Healthc Mat (Mai 2017) DOI: 10.1002/adhm.201700245
P5	Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model	C. Mirjolet, J. Boudon, <u>A. Loiseau</u> , S. Chevrier, R. Boidot, A. Oudot, B. Collin, N. Millot, G. Créhange	Int. J. Nanomedicine, 12, 6357-6364 (2017)
P6	Interactions between titanate nanotubes and microglial cells	S. Sruthi, <u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, P.V. Mohanan, G. Lizard, N. Millot	<i>A soumettre en octobre 2017</i>
P7	Hazard identification of emergent nanomaterials: Innovative bioassays to evaluate cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress on a human hepatoma cell line	Y. Saibi, V. Bellat, I. Séverin, J. Boudon, G. Thomas, <u>A. Loiseau</u> , M.C. Chagnon, N. Millot	<i>A soumettre courant 2018</i>
p8	Coupling between gold nanoparticles and titanate nanotubes to enhance prostate cancer radiosensitivity with docetaxel	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, S. Roux, N. Millot	<i>A soumettre courant 2018</i>
p9	Dispersion and colloidal stability of phosphonate-modified titanate nanotubes for nanomedicine	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, E. Guénin, L. Motte, N. Millot	<i>A soumettre courant 2018</i>

Communications orales (présentées par la personne dont le nom est souligné)

N°	Titre	Auteurs	Congrès
O1	Docetaxel-Titanate Nanotubes Nanohybrids for Dual Therapy with a View to Prostate Cancer Treatment	<u>J. Boudon</u> , C. Mirjolet, T. Gautier, A. Loiseau, J. Paris, G. Créhange, N. Millot	Nano 2014, 13-18 juillet 2014, Moscou (Russie)
O2	In vivo SPECT-CT imaging of theranostic titanate nanotubes-docetaxel nanohybrids into human prostate tumors and in vitro studies on prostate cancer cell lines	J. Boudon, C. Mirjolet, A. Loiseau, T. Gautier, J. Paris, G. Créhange, <u>N. Millot</u>	Matériaux 2014, 24-28 novembre 2014, Montpellier (France)
O3	A step-by-step elaboration of a preclinical theranostic platform from titanate nanotubes against prostate cancer	J. Boudon, C. Mirjolet, A. Loiseau, T. Gautier, J. Paris, G. Créhange, <u>N. Millot</u>	Matériaux 2014, 24-28 novembre 2014, Montpellier (Keynote) (France)
O4	A titanate-docetaxel nanohybrid monitored by SPECT-CT for the treatment of prostate cancer	<u>J. Boudon</u> , C. Mirjolet, A. Loiseau, T. Gautier, G. Créhange, B. Collin, A. Oudot, N. Millot	BioNanoMed, 8-10 avril 2015, Graz (Autriche)
O5	Preclinical development of a titanate-docetaxel nanohybrid for the treatment of prostate cancer	J. Boudon, C. Mirjolet, A. Loiseau, G. Créhange, <u>N. Millot</u>	MRS Fall Meeting, 29 novembre-4 décembre 2015, Boston (USA)
O6	A nanohybrid consisting of titanate nanotubes and docetaxel for the treatment of prostate cancer in preclinical developments	<u>J. Boudon</u> , C. Mirjolet, A. Loiseau, G. Créhange, N. Millot	European Nanomedicine Meeting, 8-9 décembre 2015, Grenoble (France)
O7	Development of nanohybrids based on titanate nanotubes to vectorize docetaxel or combine gold nanoparticles for the treatment of prostate cancer	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, B. Collin, A. Oudot, S. Roux, N. Millot	BioNanoMed 2016, 06-08 avril 2016, Krems (Autriche)
O8	Development of titanate nanotubes to vectorize docetaxel or combined with Au nanoparticles for the treatment of prostate cancer	A. Loiseau, J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, B. Collin, A. Oudot, S. Roux, <u>N. Millot</u>	EMRS, 2-5 mai 2016, Lille (Conférence invitée) (France)
O9	Titanate nanotubes as new preclinical theranostic platform against prostate cancer: vectorization and immobilization of docetaxel or gold nanoparticles	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, S. Roux, N. Millot	ICONAN, 28-30 septembre 2016, Paris (France)
O10	Des nanotubes de titanate pour vectoriser et immobiliser des agents radiosensibilisants afin de lutter contre le cancer	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, N. Millot	SCF Grand Est 8, 11-12 mai 2017, Mulhouse (France)

Communications par affiche (présentées par la personne dont le nom est souligné)

N°	Titre	Auteurs	Congrès
A1	Docetaxel-titanate nanotubes nanohybrids for dual therapy with a view to prostate cancer treatment	<u>C. Mirjolet</u> , J. Boudon, A. Loiseau, S. Chevrier, T. Gautier, R. Boidot, J. Paris, N. Millot and G. Créhange	26 th EORTC-NCI-AACR Symposium, 18-21 novembre 2014, Barcelone (Espagne)
A2	Docetaxel-titanate nanotubes nanocarrier to improve radiotherapy efficacy for a human prostate cancer model	<u>C. Mirjolet</u> , J. Boudon, R. Boidot, S. Chevrier, C. Dalban, A. Loiseau, B. Collin, A. Oudot, T. Gautier, N. Millot and G. Créhange	SFNano, 9-12 décembre 2014, Nancy (France)
A3	Pre-clinical development of a docetaxel nanocarrier to enhance prostate cancer radiosensitivity	<u>G. Créhange</u> , J. Boudon, R. Boidot, S. Chevrier, C. Dalban, A. Loiseau, B. Collin, A. Oudot, T. Gautier, N. Millot, C. Mirjolet	2015 Genitourinary Cancers Symposium 26-28 février 2015, Orlando (USA)
A4	Fonctionnalisation de nanotubes de titanate par le docétaxel pour le traitement contre le cancer de la prostate :suivi par imagerie SPECT/CT	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, B. Collin, A. Oudot, N. Millot	Groupe Français de la Céramique (GFC), mars 2015, Dijon (France), (Prix du Poster)
A5	Pre-clinical development of a Docetaxel nanocarrier to enhance prostate cancer radiosensitivity	C. Mirjolet, J. Boudon, R. Boidot, S. Chevrier, C. Dalban, <u>A. Loiseau</u> , B. Collin, A. Oudot, T. Gautier, N. Millot, G. Créhange	Oncotrans, 25-26 juin 2015 Dijon (France)
A6	Short time synthesis of titanate nanotubes by hydrothermal treatment	<u>F. Sallem</u> , A. Loiseau, A. Megriche, M. El Maaoui, N. Millot	International Solid State Chemistry Conference, 21-23 décembre 2015, Zarzis (Tunisie)
A7	Functionalization of titanate nanotubes for biomedical application	<u>F. Sallem</u> , A. Loiseau, A. Megriche, M. El Maaoui, N. Millot	EMRS 2016, Lille, 2-5 mai 2016 (France)
A8	Comparative study on the cellular interaction of titanate nanotubes and zinc oxide nanoparticles with glial cells	<u>S. Sruthi</u> , A. Loiseau, J. Boudon, G. Lizard, P.V. Mohanan, N. Millot	EMRS 2016, Lille, 2-5 mai 2016 (France)
A9	Greffage de nanoparticules d'or et de docétaxel sur les nanotubes de titanate contre le cancer de la prostate	<u>A. Loiseau</u> , J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, S. Roux, N. Millot	ICONAN, 28-30 septembre 2016, Paris (France)
A10	Des nanotubes de titanate pour vectoriser et immobiliser des agents radiosensibilisants afin de lutter contre le cancer	<u>A. Loiseau</u>	Journée de l'Ecole Doctorale 2016, 21-22 mai 2016, Besançon (France) (Prix du poster)

Publications majeures (voir ci-après)

- ✓ Taxane-grafted metal-oxide nanoparticles as a new theranostic tool against cancer: The promising example of docetaxel-functionalized titanate nanotubes on prostate tumors, **A. Loiseau**, J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange, N. Millot, *Adv Healthc Mat*, (2017), [doi: 10.1002/adhm.201700245](https://doi.org/10.1002/adhm.201700245).
- ✓ Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model, C. Mirjolet, J. Boudon, **A. Loiseau**, S. Chevrier, R. Boidot, A. Oudot, B. Collin, N. Millot, G. Créhange, *Int. J. Nanomedicine*, (2017), [doi: 10.2147/IJN.S139167](https://doi.org/10.2147/IJN.S139167).

Enseignements

Moniteur à l'École d'Ingénieurs en Matériaux Développement Durable et Infotronique (ESIREM) à Dijon (192 heures de TP) :

- ✓ Chimie des solutions (GEIPI 1^{ère} année : classes préparatoires intégrées)
- ✓ Thermodynamique/électrochimique (3^{ème} année)
- ✓ Céramique (4^{ème} année)
- ✓ Encadrement d'un Projet de Fin d'Études (5^{ème} année) « Stabilité des nanotubes de titanate par greffage de polymères et de nanoparticules d'or pour le domaine biomédical » du 13/10/16 au 31/01/17.

Annexe 2 Récapitulatif des procédures expérimentales et des caractéristiques des différents greffages réalisés sur les TiONts

➤ Procédures expérimentales des différents greffages réalisés sur les TiONts

Synthèses	Agents de couplage	Rapport molaire	Milieu réactionnel	pH de greffage	Température de greffage (°C)	Temps de réaction	Agitation magnétique (tr/min)	Purifications
Alcoxysilanes								
TiONts-APTES (ancien protocole)	-	1 OH 10 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	9 - 10	25	24 h	400	* Évaporateur rotatif (250 mbar ; 80°C) * Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
TiONts-APTES (nouveau protocole)	-	1 OH 3 APTES	50% H ₂ O 50% EtOH	5	60	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
TiONts-AHAMTES	-	1 OH 3 AHAMTES	50% H ₂ O 50% EtOH	5	60	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Catéchols								
TiONts-catéchol	-	1 OH 3 catéchols	Aqueux	6	25	5 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
Phosphonates								
TiONts-phosphonate	-	1 OH 5 phosphonates	Aqueux	2	25	16 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
AuNPs-DTDTPA								
Activation des AuNPs-DTDTPA	EDC/NHS	100 EDC 200 NHS 1 COOH	Aqueux	5	25	90 min	400	-
TiONts-AuNPs	-	1 NH ₂ 0,6 COOH	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (500 kDa) * Lyophilisation
PEG_n (HS-PEG_n-COOH, n = 3000, 5000, 10000) en milieu aqueux								
Activation du PEG _n	EDC/NHS	100 EDC 200 NHS 1 COOH	MES 0,1 M	5	25	30 min	400	-
TiONts-PEG _n	-	3 NH ₂ 1 COOH	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 kDa) * Lyophilisation
PEG_n (HS-PEG_n-COOH, n = 3000, 5000, 10000) en milieu organique								
Activation du PEG _n	PyBOP	1 PyBOP 1 COOH DIEA en excès	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	30 min	400	-
TiONts-(AuNPs)-PEG _n	-	1 NH ₂ 1 COOH	DMSO extra sec (99,99%) + N ₂	-	25	24 h	400	* Centrifugation (20 000 g ; 20 min) * Ultrafiltration (100 - 500 kDa) * Lyophilisation
DTX-PMPI								
Activation du DTX par le PMPI	PMPI	1 DTX 4 PMPI	Tampon borate 0,1M	8,5	25	24 h	400	* Dialyse (0,5 - 1 kDa) * Lyophilisation
TiONts-(AuNPs)-PEG _n -DTX	-	1 PEG _n TCEP en excès 20 DTX-PMPI	PBS 0,1 M	7,4	25	24 h	400	* Ultrafiltration (100 - 500 kDa) * Lyophilisation

➤ Caractéristiques des différents greffages réalisés sur les TiONts**Chapitre 2**

	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	-	3,3	-28	non	10,6 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	8,5	+10	non	5,3 (±0,5) APTES	7	29 000
TiONts-PEG₃₀₀₀	EDC/NHS	5,7	-10	~ oui	0,060 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	6	330
TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX	PMPI	4,2	-20	oui	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA	NHS	5,3	-20	oui	2,1 DOTA	1	11 200
TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc	EDC/NHS	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,060 (±0,003) PEG ₃₀₀₀ -Boc	2	330
TiONts-PEG₃₀₀₀-Boc + DTX-PMPI	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,13 (±0,01) DTX-PMPI	2	710

Chapitre 3

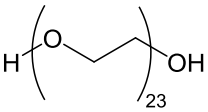
	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt ^(*)
TiONts	-	3,3	-28	non	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	6,9	-6	non	2,6 (±0,2) APTES	9	14 230
TiONts-AHAMTES	-	7,4	0	non	2,1 (±0,2) AHAMTES	3	11 500
TiONts-LDOPA	-	3,3	-33	oui	1,2 (±0,2) LDOPA	5	6 570
TiONts-DHCA	-	2,7	-33	oui	1,4 (±0,2) DHCA	4	7 660
TiONts-NDOPA	-	6,3	-10	~ oui	2,8 (±0,2) NDOPA	5	15 320
TiONts-PHA	-	4,2	-25	oui	1,1 (±0,1) PHA	5	6 020
TiONts-ALD	-	2,2	-25	oui	0,60 (±0,05) ALD	3	3 280
TiONts-PEG-NH₂	-	4,2	-5	oui	0,2 (HO) ₂ -(O)P-PEG-NH ₂	1	1 100
TiONts-PEG₃₀₀₀	EDC/NHS	6,0	-10	oui	0,050 (±0,004) PEG ₃₀₀₀	3	270
TiONts-PEG₅₀₀₀	EDC/NHS	6,5	-5	oui	0,029 (±0,002) PEG ₅₀₀₀	3	160
TiONts-PEG₁₀₀₀₀	EDC/NHS	5,5	-15	oui	0,016 (±0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	90
TiONts-PEG₃₀₀₀	PyBOP	3,5	-5	oui	0,090 (±0,005) PEG ₃₀₀₀	5	490
TiONts-PEG₅₀₀₀	PyBOP	3,5	-3	oui	0,050 (±0,003) PEG ₅₀₀₀	3	270
TiONts-PEG₁₀₀₀₀	PyBOP	3,5	-1	oui	0,030 (±0,002) PEG ₁₀₀₀₀	3	160
TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,32 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 750
TiONts-PEG₅₀₀₀-DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,24 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 310
TiONts-PEG₁₀₀₀₀-DTX	PMPI	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,030 (±0,002) DTX-PMPI	2	160

Chapitre 4

	Agents de couplage	PIE	ζ à pH 7,4 (mV)	Stabilité colloïdale à pH 7,4	Molécule.nm ⁻² (moyenne)	Reproductibilité (n)	Nombre de molécules greffées par TiONt
TiONts	-	3,3	-28	non	10,2 (±1,5) OH	10	-
TiONts-APTES	-	6,9	-6	non	2,6 (±0,2) NH ₂	9	14 230
TiONts-AuNPs	EDC/NHS	5,1	-20	oui	0,40 (±0,05) DTDTPA	7	2 200
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀	PyBOP	5,1	-2	oui	0,040 (±0,003) PEG ₃₀₀₀	4	220
TiONts-AuNPs-PEG ₃₀₀₀ -DTX	PMPI	4,9	-7	oui	0,30 (±0,01) DTX-PMPI	2	1 700

Remarques :

- Dans le cas d'un poly(éthylène) glycol avec un poids moléculaire de n = 1000, nous obtenons les caractéristiques suivantes :

Nom	Formule semi-développée	Degré de polymérisation	Formule brute	Poids moléculaire	Longueur étendue
PEG ₁₀₀₀		23	C ₄₆ H ₉₄ O ₂₄	1031,23 g.mol ⁻¹	8,2 nm

- Dans notre étude, la notation des PEG_n utilisés est défini ci-après.

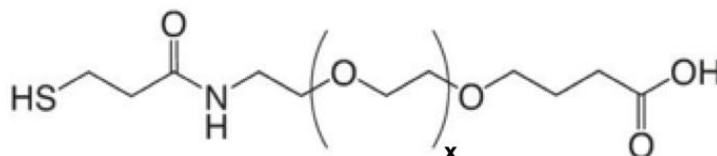
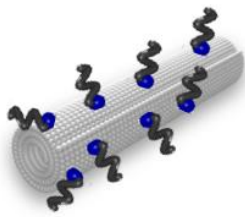


Figure : Molécule du poly(éthylène) glycol, HS-PEG_n-COOH, où n définit le poids moléculaire et x le degré de polymérisation.

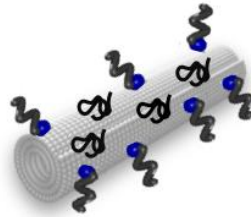
Nom	Poids moléculaire	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Degré de polymérisation	Taille estimée (nm)
PEG _n	n	-	x	-
PEG ₃₀₀₀	3 000	3073	65	23,3
PEG ₅₀₀₀	5 000	4847	105	37,6
PEG ₁₀₀₀₀	10 000	9515	210	75,2

➤ Conformation des différents PEG utilisés à la surface des TiONts

	Rayon de giration théorique (RG en nm)	Surface projetée théorique πRG^2 (S_p théo en nm ²)	Molécule.nm ⁻² (ATG)	Surface projetée expérimentale (S_p en nm ²)	Type de conformation
(HO) ₂ -(O)P-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	2	13	0,2 PEG ₂₀₀₀	5	Conformation en « brosse »
PEG ₃₀₀₀ (EDC/NHS)	2,5	20	0,05 PEG ₃₀₀₀	20	Transition entre le régime « champignon » et le régime « brosse »
PEG ₅₀₀₀ (EDC/NHS)	3,3	35	0,029 PEG ₅₀₀₀	35	
PEG ₁₀₀₀₀ (EDC/NHS)	4,8	72	0,016 PEG ₁₀₀₀₀	62	
PEG ₃₀₀₀ (PyBOP)	2,5	20	0,09 PEG ₃₀₀₀	11	Conformation en « brosse »
PEG ₅₀₀₀ (PyBOP)	3,3	35	0,05 PEG ₃₀₀₀	20	
PEG ₁₀₀₀₀ (PyBOP)	4,8	72	0,03 PEG ₃₀₀₀	33	
PEG ₃₀₀₀ en présence de AuNPs (PyBOP)	2,5	20	0,04 PEG ₃₀₀₀	25	Conformation en « champignon » en ne prenant pas en compte les AuNPs. Dans notre cas, conformation en « brosse » avec les AuNPs



Conformation en « brosse »



Transition entre le régime en « brosse » et le régime en « champignon »



Conformation en « champignon »

Annexe 3 Tableau récapitulatif des techniques expérimentales avec les spécificités et les conditions de préparation des échantillons

Techniques	Appareils	Caractéristiques
Synthèse TiONts	Réacteur commercial Anton Parr, modèle : 4567	<ul style="list-style-type: none"> - $m_{\text{TiO}_2 \text{ rutile}} = 1 \text{ g}$; $[232] = 10 \text{ M}$ - Traitement préalable à la canne ultrasons : 375 W ; (30 min (2 s de pulse + 2 s d'arrêt)) - $V = 250 \text{ mL}$ - $T = 155^\circ\text{C}$ ($T_{\text{max}} = 350^\circ\text{C}$) - $P = 2,5 \text{ bar}$ ($P_{\text{max}} = 200 \text{ bar}$) - Temps de réaction : 36 h - Agitation mécanique : 120 tr/min
BET	Micromeritics Tristar II	<ul style="list-style-type: none"> - Molécule sonde : N_2 - Désorption : 100°C pendant 24 h - $P = 0,05 \text{ mbar}$ - Masse échantillon : 50 – 70 mg
IR-TF	Bruker Equinox 55	<ul style="list-style-type: none"> - 2 mg de poudre sont mélangés avec 198 mg de KBr - Résolution : 2 cm^{-1} - Gamme : 4000 à 400 cm^{-1}
Zétamétrie	Malvern Zetasizer ZSP	<ul style="list-style-type: none"> - Indice de réfraction (TiO_2) : 2,61 - 5 mg d'échantillon dispersé dans 12 mL - Gamme de pH : 2 - 11 - Milieu salin : ($\text{NaCl } 10^{-2} \text{ M}$) Titration : 0,1 M de HCl, 0,1 M ou 0,01 M de NaOH - Logiciel : Zetasizer Software (7.11)
ATG	TGA Discovery – TA instrument	<ul style="list-style-type: none"> - Débit : air reconstitué à $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ - Rampe : $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ - Gamme de température : 50 à 800°C - Masse échantillon : 1 mg
XPS	PHI 5000 Versaprobe	<ul style="list-style-type: none"> - $\text{EK}\alpha (\text{Al}) = 1486,6 \text{ eV}$ - Diamètre du spot : 200 μm - Logiciel : Casa XPS et Multipak - Calibration sur le pic Ti_{2p} (458,7 eV) - Dépôt de poudre sur une feuille d'indium
UV-visible	Shimadzu UV - 2550	<ul style="list-style-type: none"> - Cuvette en quartz - Gamme : 260 – 800 nm - Logiciel : UV-Probe 2.34 (suspension)
MET	JEOL JEM – 2100F	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution : 0,19 nm - 200 kV - Concentration échantillon : $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ - Volume : 50% H_2O / 50% EtOH - Dépôt de 600 μL sur la grille MET

Raman	InVia Renichaw	<ul style="list-style-type: none"> - Laser : 532 nm - Enregistrement : 1 s x 100
ICP	ThermoScientific cAP 6000 series ICP Spectrometer	<ul style="list-style-type: none"> - Masse échantillon : 2 mg dissous dans de l'eau régale à 40°C - Volume : 1 HNO₃ pour 3 HCl
RMN ¹ H	Bruker Avance III Nanobay	<ul style="list-style-type: none"> - 300 MHz - 22°C - Solvant : DMSO-d₆ - Scans : 16 - Logiciel : MestReNova 11.0
SPECT/CT	NanoSPECT/CT small animal imaging tomographic gamma - camera (Bioscan Inc.)	<ul style="list-style-type: none"> - Nanohybride : 50 µg, 50 µL - Radioélément : ¹¹¹In - TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX : 5 MBq d'activité
Comptage Gamma	Wizard 1480, Perkin Elmer	<ul style="list-style-type: none"> - TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX : 1,4 MBq d'activité - DOTA-¹¹¹In : 50 µL et 20 MBq d'activité - Injection intratumorale
Radiothérapie	Brachytherapy iridium projector (Microselectron HDR; Elekta)	<ul style="list-style-type: none"> - Doses de radiation quotidienne : 3 x 4 Gy - 50 µL de TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (correspondant à 12 µM de DTX et 10 µg de TiONts) - Injection intratumorale - Animaux sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane, Vetflurane, Virbac, Danemark) délivrée par système MINERVE (Esternay, France). - Logiciel : Vivo Manager® software (Biosystemes, Couternon, France) - Test non-paramétrique de Mann-whitney U
	Irradiateur petit animal de radiothérapie 3D guidé par l'image SARRP (X-STRAHL, uk).	<ul style="list-style-type: none"> - Doses de radiation quotidienne : 3 x 4 Gy en deux faisceaux opposés, photons de 220 kV, 13 mA - 50 µL de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (correspondant à 24 µM de DTX et 10 µg de TiONts) - Injection intratumorale - Animaux sous anesthésie générale (isoflurane, Vetflurane, Virbac, Danemark) délivré par système MINERVE, Esternay, France). - Logiciel : Muriplan (X-STRAHL)

Annexe 4 Précision sur les analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques des nanoparticules ou des nanohybrides se déroulent de 50°C à 800°C avec une montée en température de 5°C.min⁻¹ sous air (25 mL.min⁻¹). Les courbes sont normalisées à 50°C pour une meilleure comparaison. Toutes les équations utilisées à partir de l'ATG sont recensées dans cette annexe. Pour les calculs des taux de greffage, c'est la différence de masse Δm entre deux greffages qui est prise en compte. Nous faisons l'hypothèse que la perte de masse supplémentaire est due uniquement à la matière organique greffée.

Pour les TiONts nus :

Le taux de recouvrement des hydroxyles peut être mesuré à partir de la relation suivante :

$$N_{OH} = \frac{2 \times \frac{\Delta m}{m} \times N_A}{M(H_2O) \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

N_{OH} : Nombre d'hydroxyles par nm²
 Δm : Perte de masse de l'eau chimisorbée (g)
 m : Masse initiale de l'échantillon (g)
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol⁻¹)
 $M(H_2O)$: Masse molaire de l'eau (g.mol⁻¹)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts (m².g⁻¹)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un nombre de molécules par nm²

Pour les nanohybrides :

Cette technique permet d'estimer le taux de greffage des molécules organiques accrochées à la surface des TiONts à partir de la relation suivante :

$$N_m = \frac{\left(\frac{\Delta m_2}{m_2} - \frac{\Delta m_1}{m_1}\right) \times N_A}{M(m_2) \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

N_m : Nombre de molécules m greffées par nm²
 $(\Delta m_2/m_2 - \Delta m_1/m_1)$: Différence des pertes de masse relatives entre deux échantillons dues à la matière organique greffée (Δm et m en g)
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol⁻¹)
 $M(m_2)$: Poids moléculaire de la molécule/partie de la molécule m_2 dégradée (g.mol⁻¹)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts ou des AuNPs ($S_{BET\ TiONts} = 174 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; $S_{BET\ AuNPs} = 104 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un nombre de molécules par nm²

Cas particulier : APTES (exemple du chapitre 2)

	Température de début de dégradation (°C)	Perte de masse (%)	Masse moléculaire dégradée (g.mol ⁻¹)	Molécule.nm ⁻²
TiONts	175	2,8	18	10,6 OH
TiONts-APTES	160	10,3	58	5,3 NH ₂

Dans ce manuscrit, le taux d'APTES est calculé selon l'équation décrite dans le cas d'un nanohybride et prend en compte le fait que les hydroxyles n'ont pas tous réagi avec l'APTES ou bien encore que la condensation des oligosiloxanols sur la surface des tubes est incomplète ($\Delta m = 10,3\% - 2,8\%$). Le taux de greffage est alors de 5,3 NH₂.nm⁻².

Dans le cas où tous les hydroxyles auraient réagi avec l'APTES et d'une condensation complète des silanols, une couche de silice uniforme se formerait. En effet, il n'y aurait alors plus d'hydroxyles à la surface des tubes. La perte de masse serait seulement due à la dégradation de la partie aminopropyle de l'APTES et donnerait un taux de greffage de 7,3 APTES.nm⁻². Exemple :

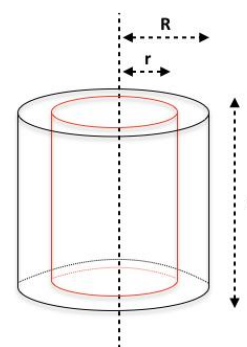
$$N_{APTES} = \frac{\frac{\Delta m_{APTES}}{m} \times N_A}{M_{(APTES)} \times S_{BET} \times 10^{18}}$$

N_{APTES} : Nombre de molécules APTES greffées par nm²
 Δm_{APTES} : Perte de masse relative à la dégradation de l'APTES seulement (10,3%) dans le cas d'une condensation complète
 m : Masse initiale de l'échantillon
 N_A : Nombre d'Avogadro (mol⁻¹)
 $M_{(APTES)}$: Poids moléculaire de la partie de l'APTES dégradée (58 g.mol⁻¹)
 S_{BET} : Surface spécifique des TiONts-APTES (m².g⁻¹)
 10^{18} : Facteur pour obtenir un taux par nm²

Estimation du nombre de ligands par nanoparticule :

Cas des TiONts : À partir de la quantité de molécules greffées par nm², il est possible d'estimer le nombre de molécules présentes à la surface d'un nanotube de titanate par un calcul géométrique en ne tenant compte que de la surface extérieure des tubes. Par conséquent, l'aire extérieure ne comprend pas la surface à l'intérieure de la cavité interne (cylindre rouge). La surface extérieure des TiONts est alors de $S_{(géo\ TiONts)} = 5470\text{ nm}^2$ d'après la formule suivante :

$$S_{(géo\ TiONts)} = 2\pi \times R \times h + 2\pi \times (R^2 - r^2)$$



$S_{(géo\ TiONts)}$: La surface extérieure des TiONts ($S_{(géo\ TiONts)} = 5470\text{ nm}^2$)
 R : Le rayon du diamètre total des TiONts ($R = 5\text{ nm}$)
 r : Le rayon de la cavité interne des TiONts ($r = 2\text{ nm}$)
 h : La hauteur moyenne d'un TiONts ($h = 170\text{ nm}$)

Cas des AuNPs: À partir de la quantité de molécules greffées par nm², il est possible d'estimer le nombre de DTDTPA présents à la surface d'une nanoparticules d'or par un calcul géométrique.

$$N_{(DTDTPA / AuNP)} = S_{(géo\ AuNPs)} \times N_x$$

$N_{DTDTPA/AuNP}$: Nombre de molécules de DTDTPA par AuNP (120 DTDTPA/AuNP)
 $S_{(géo\ AuNPs)}$: Surface géométrique des AuNPs considérés comme sphérique ($S_{(géo\ AuNPs)} = 4.\pi.r^2 = 21,24\text{ nm}^2$). Le rayon r des AuNPs est de 1,3 nm
 N_x : Nombre de molécules de DTDTPA greffées sur les AuNPs par nm² (5,7 DTDTPA.nm⁻²)

Estimation du nombre de AuNPs par TiONt par l'ATG :

Le nombre de nanoparticules d'or à la surface d'un TiONt peut être estimé à partir de la relation (1). Le nombre déterminé par l'ATG est alors de 20 AuNPs/TiONt.

$$(1) \quad N_{(AuNPs/TiONT)} = \left(\frac{N_y}{N_{(DTDTPA/AuNP)}} \right) \times S_{(géo\ TiONts)}$$

$N_{AuNPs/TiONT}$: Nombre de AuNPs par TiONts (10 AuNPs/TiONT)
 N_y : Nombre de molécules de DTDTPA présentes sur les TiONts par nm^2 (0,40 DTDTPA. nm^2)
 $N_{(DTDTPA/AuNP)}$: Nombre de molécules de DTDTPA par AuNP (120 DTDTPA/AuNP)
 $S_{(géo\ TiONts)}$: Surface géométrique extérieure des TiONts ($S_{(géo\ TiONts)} = 5470 \text{ nm}^2$)

Estimation du nombre de AuNPs par TiONT par l'ICP :

Les concentrations données *via* l'analyse ICP sont de $31,7 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le titane et de $21,4 \text{ mg.L}^{-1}$ pour l'or. La démarche utilisée pour déterminer le nombre de nanoparticules d'or à la surface d'un TiONts est la suivante :

Dans 1 L : $m(\text{Ti}) = 31,7 \text{ mg}$ et $m(\text{Au}) = 21,4 \text{ mg}$

$$(2) \quad n(\text{Ti}) = \frac{m(\text{Ti})}{M(\text{Ti})} = 6,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$m(\text{Ti}) = 31,7 \text{ mg}$ dans 1 L
 $M(\text{Ti}) = 47,87 \text{ g.mol}^{-1}$

Dans cette démarche, nous faisons l'hypothèse que les TiONts sont composés uniquement de titanate de sodium. La masse du titane dans la composition chimique $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ est alors de :

$$(3) \quad m(\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7) = \frac{n(\text{Ti}) \times M(\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7)}{3} = 66,6 \text{ mg}$$

$n(\text{Ti}) = 6,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$
 $M(\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7) = 301,58 \text{ g.mol}^{-1}$

En parallèle, la masse d'un nanotube de titanate ou d'une nanoparticule d'or est calculée par la relation (4) :

$$(4) \quad m_{(TiONT\ ou\ AuNP)} = Volume \times Densité$$

Volume (TiONts) = 4810 nm^3
 Densité ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) = $3,94 \text{ g.cm}^{-3}$
 Volume (AuNPs) = $9,2 \text{ nm}^3$
 Densité (Au) = $19,3 \text{ g.cm}^{-3}$

La masse est alors de $1,9 \cdot 10^{-17} \text{ g}$ pour un TiONT et $1,8 \cdot 10^{-20} \text{ g}$ pour un AuNP. En nombre, cela donne $3,51 \cdot 10^{15}$ TiONts et $1,20 \cdot 10^{17}$ AuNPs. D'après l'équation (5).

$$(5) \quad \begin{aligned} \#TiONts &= \frac{m(Na_2Ti_3O_7)}{m(TiONt)} \\ \#AuNps &= \frac{m(Au)}{m(AuNP)} \end{aligned}$$

Ainsi, le nombre de nanoparticules d'or par nanotube est estimé à 34 ($\#AuNps/\#TiONts$). Ces résultats corroborent ceux trouvés lors d'un comptage réalisé au MET contrairement au taux calculé par l'ATG.

Annexe 5 RMN ^1H : déplacement chimique du DTX et du DTX-PMPI

Le déplacement chimique expérimental du DTX est indiqué ci-dessous avec son spectre théorique (en accord avec la littérature [312]). Le docétaxel possède quatre groupements hydroxyles lui permettant de réagir avec la fonction isocyanate du PMPI. À partir des spectres théoriques du DTX-PMPI réalisés, à l'aide du logiciel MestReNova 11.0, selon les différentes accroches possibles entre le DTX et le PMPI, la régiosélectivité de la réaction est favorisée avec l'hydroxyle se trouvant en position 3 (OH symbolisé en bleu) après avoir comparé les différentes intégrations, les intensités et les déplacements chimiques (Figure 170 et Figure 171). Notons que la réaction entre le PMPI et l'hydroxyle positionné en 4 (symbolisé en violet) au sein du DTX est peu probable en raison d'un encombrement stérique plus important avec le groupement phényle à proximité.

Déplacement chimique expérimental du DTX : ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.97 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.71 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.49 – 7.25 (m, 5H), 7.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.86 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.16 – 4.80 (m, 5H), 4.51 (s, 1H), 4.33 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.18 – 3.91 (m, 3H), 3.66 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.17 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 2.38 – 2.14 (m, 4H), 1.90 (dd, $J = 15.4, 9.2$ Hz, 1H), 1.80 – 1.58 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.35 (s, 8H), 0.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 6H).

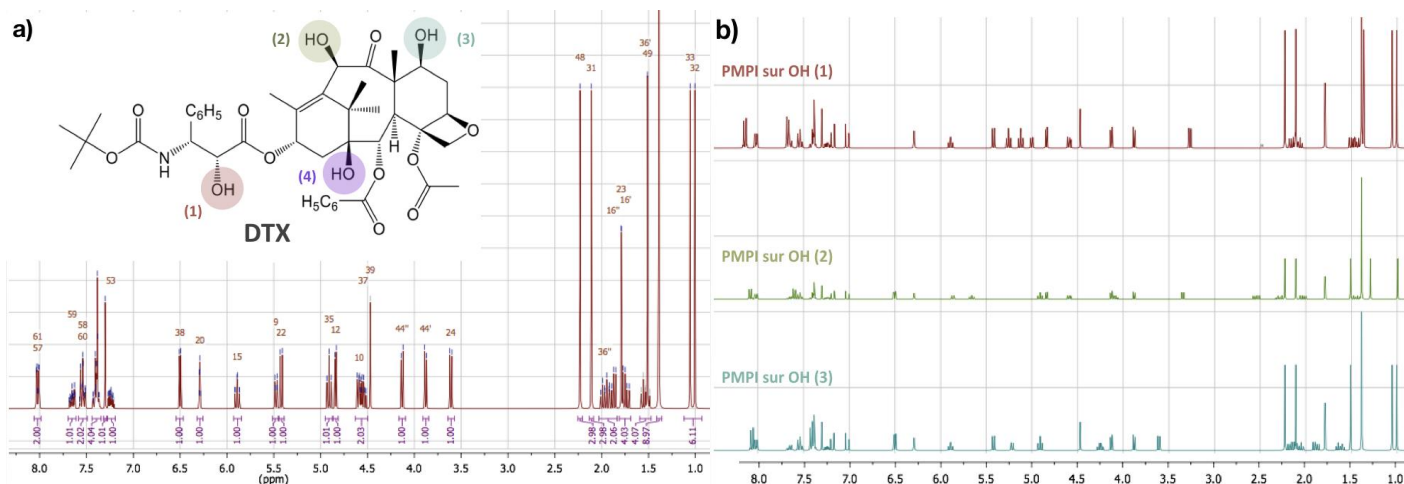


Figure 170 : Spectres RMN ^1H théoriques du (a) DTX et du (b) DTX-PMPI selon les différentes accroches possibles entre le DTX et le PMPI.

Déplacement chimique et spectre expérimental du DTX-PMPI : RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.71 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.48 – 7.33 (m, 3H), 7.29 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.86 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.89 (t, $J = 9.7$ Hz, 3H), 4.58 – 4.44 (m, 2H), 4.33 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 4.03 (p, $J = 8.2$ Hz, 6H), 3.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 9H), 2.21 (s, 4H), 1.74 (s, 4H), 1.52 (s, 3H), 1.35 (s, 8H), 0.99 (d, $J = 7.7$ Hz, 6H).

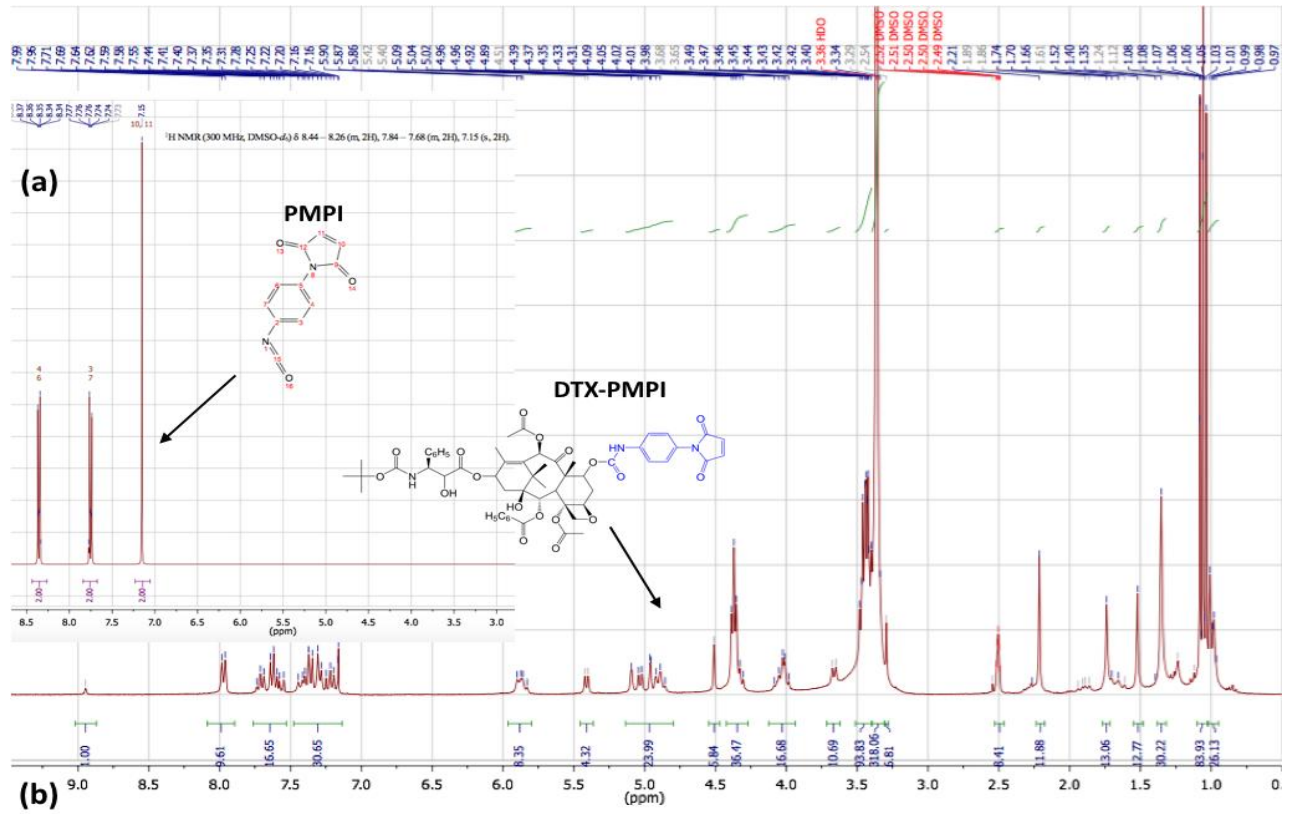


Figure 171 : Spectres RMN ^1H du (a) PMPI et (b) du DTX-PMPI.

Annexe 6 Tests de cytotoxicité et génotoxicité des TiONts-APTES

Tests biologiques *in vitro* des TiONts-APTES sur des cellules gliales de souris (BV2) :

Protocole expérimental (BV2) : Les cellules BV2 sont cultivées dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) avec 10% de sérum de veau fœtal (fetal bovine serum, FBS en anglais) et une solution d'antibiotique/antimycotique. Les cellules BV2 sontensemencées et mises en culture cellulaire pendant toute une nuit. Les cellules sont ensuite incubées avec les TiONts-APTES à différentes durées (6 h et 24 h) et à différentes concentrations (1, 5, 10, 20, 40 et 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Les cellules sontensemencées dans 6 puits avec une densité initiale de 2.10^4 cellules par puits. Elles sont ensuite incubées (6 h pour l'étude d'absorption des TiONts dans les cellules et 24 h pour les études d'intégrité des membranes et des cycles cellulaires) avec les TiONts (5, 20, 40 et 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les cellules BV2 sont récupérées par centrifugation et sont redispersées dans 500 μL de PBS afin de les analyser par cytométrie de flux (DAKO GALAXY flow cytometer, Germany). Elles sont marquées avec 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IP pendant 15 min à 37°C pour l'analyse membranaire tandis que la concentration d'IP a été de 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en présence de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ribonucléase pendant 1 h à 37°C pour étudier les cycles cellulaires. Il est à noter que le 7-ketocholestérol (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) est utilisé comme témoin positif pour traiter les cellules.

Évaluation de la cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine du cancer du foie (HepG2) et *via* deux tests :

Protocole expérimental (HepG2) : La lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain HepG2 a été obtenue par European Collection of Cell Cultures. Les cellules ont poussé sur des cultures monocouches dans le Milieu Essentiel Minimal (MEM) avec 1% de glutamine stable, 1% d'acides aminés non essentiels et 10% de FBS dans une atmosphère humidifiée à 37°C contenant 5% de CO_2 . Les cellules HepG2 sontensemencées sur des plaques de microtitrage à fond plat possédant 96 puits de 200 μL de milieu de culture avec une concentration de 5.10^4 cellules par puits pour le test alamarBlue®, la cinétique de synthèse des ARN totaux et le test des comètes. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules HepG2 sont exposées aux TiONts-APTES avec des concentrations variant de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Test alamarBlue® : La viabilité cellulaire est évaluée *via* le test alamarBlue®. Après avoir déposés 100 μL de résazurine dans chaque puits et incubés les TiONts-APTES avec les cellules HepG2 pendant 24 h, le pourcentage de viabilité cellulaire est exprimé en fonction de la fluorescence (émission à 540 nm et excitation à 590 nm) par les cellules traitées en comparaison du groupe contrôle.

Cinétique de synthèse des ARN totaux : Le marquage de l'ARN est initié par l'addition de 30 μL d'uridine tritiée (0,8 M ; 0,3 μCi par puits) pour chaque puits contenant les cellules HepG2 et de 50 μL de milieu de culture. La cinétique d'incorporation d'uridine est stoppée en ajoutant 30 μL de SDS (3%) à chaque puits après 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min. À la fin de la cinétique, les puits sont agités 5 min avant de récupérer les cellules afin de les mettre dans du TCA (20%) sur une microplaque à filtre. Les résultats

sont exprimés à l'aide d'un lecteur de microplaque en fonction du pourcentage de la synthèse en ARN par rapport au blanc considéré comme non toxique (groupe contrôle) correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Évaluation de la génotoxicité des TiONts-APTES :

Mesure de la production de ROS par le DHE (dihydroéthidium) : La surproduction d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est détectée avec le DHE qui diffuse à travers les membranes cellulaires HepG2 et s'oxyde rapidement en éthidium sous l'action de ROS (principalement en $O_2^{\cdot-}$). Le DHE (1,6 mM) est préparé dans du DMSO et utilisé à 2 μ M. Après 15 min d'incubation en présence des TiONts-APTES à 37°C, les signaux fluorescents du DHE dans les cellules sont collectés à travers un filtre passe bande à 590 nm par cytométrie de flux.

Tests des comètes : Les cellules HepG2 sont incubées pendant 24 h à différentes concentrations de TiONts-APTES diluées dans un milieu de traitement. Les cellules souches du témoin positif sont mises dans le milieu de traitement pendant 24 h puis elles sont exposées à 25 μ M de méthylsulfonate de méthyl pendant les trente dernières minutes. Après ceci, les cellules sont lavées dans du PBS par trypsinisation en utilisant la trypsine-EDTA puis centrifugées pendant 5 min à 1000 tr/min (4°C). La suspension de cellule récupérée est incorporée dans 50 μ L de 0,5% LMP agarose. Après la solidification du gel, les cellules sont immergées pendant 2 h dans une solution de lyse froide puis lavées (3 x 5 min) avec un tampon enzymatique (HEPES 40 mM, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM, BSA 0,2 mg/L, pH 8) dans une atmosphère humidifiée à 37°C contenant 5% de CO_2 . Les échantillons sont ensuite placés dans un tampon d'électrophorèse froid (NaOH 100 M, EDTA 200 mM, pH 13) pendant 20 min pour permettre le déroulement de l'ADN et pour améliorer l'expression des sites labiles alcalins. L'électrophorèse a duré 20 min à 25 V et 300 mA. Pour chaque traitement, 100 nucléoïdes, sélectionnés de façon aléatoire (50 pour chaque microgel), sont analysés par un microscope à épifluorescence. Le pourcentage d'ADN des nucléoïdes est enregistré en fonction du nombre totale de rupture de brins d'ADN. Pour chaque condition expérimentale, trois expériences indépendantes sont effectuées sur deux microgels dupliqués. Une différence statistique significative ($p < 0,05$), entre le traitement et le groupe contrôle, est considérée comme une réponse positive.

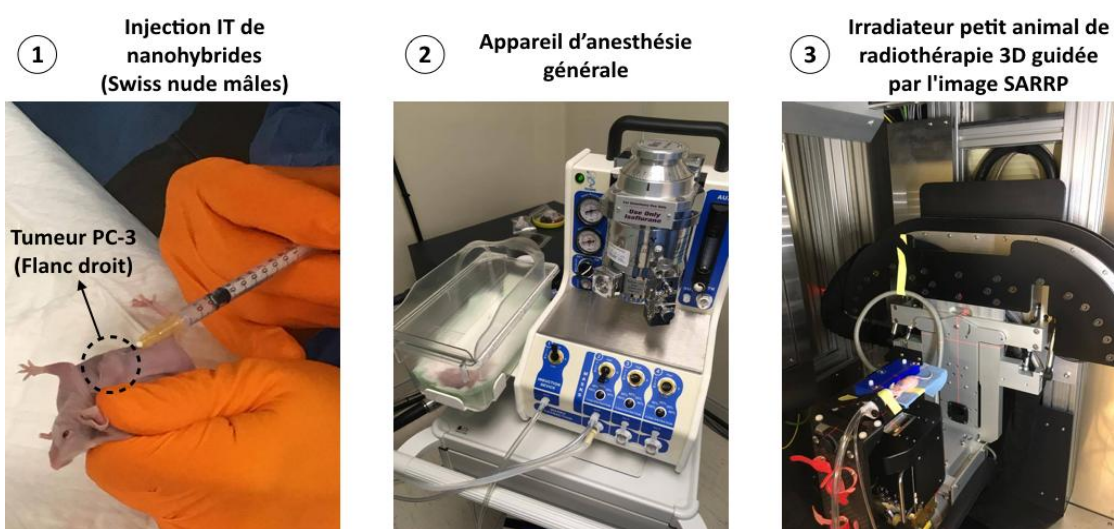
Annexe 7 Tests de cytotoxicité du DTX-PMPI et des TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX sur des lignées cellulaires de cancer de prostate

Protocole expérimental (22Rv1 et PC-3) : Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur deux modèles de cancer de prostate en utilisant des tests MTS (Promega Corporation, Madison, USA) après 96 h d'incubation (cellules 22Rv1 et PC-3). Le DTX est utilisé comme témoin positif. Les lignées cellulaires 22Rv1 et PC-3 sont des cellules de cancer de prostate hormono-résistantes. Les cellules 22Rv1 sont des cellules androgéno-dépendantes alors que les cellules PC-3 sont androgéno-indépendante. D'un côté, les cellules épithéliales de carcinome de prostate humaine 22Rv1 (American Type culture Collection, Manassas, Va) sont mises en culture dans le milieu RPMI-1640 avec 10% de FBS. De l'autre côté, les cellules d'adénocarcinome de prostate humaine PC-3 (American Type culture Collection, Manassas, Va) sont cultivées dans le MEM de Eagle modifié avec 10% de FBS. Toutes les cellules sont maintenues à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules tumorales 22Rv1 et PC-3 sontensemencées sur des plaques de microtitrage à fond plat possédant 96 puits avec une concentration de 3000 cellules par puits. Elles sont ensuite incubées à 37°C dans 190 µL de milieu de culture exempt de drogue (Drug-free Minimal Essential Medium, DMEM) 24 h avant traitement. Pendant ce temps d'incubation, les cellules ont commencé à croître exponentiellement. Les tests de cytotoxicité sont réalisés deux fois (tous deux indépendants) avec une gamme croissante de DTX (0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) pour le DTX libre, le DTX-PMPI, les TiONts-PEG₃₀₀₀ et les TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX (100nM de DTX correspond à une quantité de 0,35 µg de TiONts établie par analyse ATG). La courbe de référence TiONts-PEG₃₀₀₀ (sans DTX) correspond à la quantité de TiONts-PEG₃₀₀₀ présente dans le nanohybride TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX pour une concentration donnée en DTX. 10 µL de chaque échantillon étudié contenant la bonne concentration en DTX sont ajoutés dans les puits contenant 190 µL de milieu de culture pour les mettre en contact des cellules tumorales. Après 96 h d'incubation, la cytotoxicité des différents composés est évaluée en utilisant le test MTS en accord avec l'étude réalisée par Mirjolet *et al.* [23]. Les résultats sont révélés en utilisant une longueur d'onde d'absorption à 490 nm par rapport au groupe contrôle.

Annexe 8 Tests *in vivo* du nanohybride TiONts-AuNPs-PEG_n-DTX

Étude de l'évolution de la croissance tumorale de prostate sans et avec un traitement radiothérapeutique : Des cellules de tumeurs de prostate humaines (PC-3) sont injectées en sous-cutané au niveau des flancs de souris Swiss nude mâles. Lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral moyen de 200 mm³, les souris sont aléatoirement réparties selon leur volume de tumeur individuel dans 8 groupes (AuNPs-DTDTPA, TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀, TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX; sans ou avec RT) composés chacun de neuf souris en utilisant le logiciel Vivo manager® (Biosystemes, France). Afin d'évaluer l'effet bénéfique du nanohybride combiné à la radiothérapie (RT), 50 µL de TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX (contenant 24,9 µM de DTX greffé sur 10 µg de TiONts, correspondant à 110 µmol de DTX / g de TiONts déterminé par ATG) sont injectés dans les tumeurs. Le volume injecté (50 µL) pour les groupes des AuNPs-DTDTPA et des TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ (sans et avec RT) contient les mêmes concentrations respectives en AuNPs-DTDTPA et en TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀ présentes sur le nanohybride TiONts-AuNPs-PEG₃₀₀₀-DTX. Après 24 h d'incubation, les tumeurs sont irradiées par trois fractions journalières de 4 Gy (deux faisceaux opposés, photons de 220 kV, 13 mA) en utilisant un irradiateur petit animal de radiothérapie 3D guidée par l'image SARRP (X-STRahl, uk). La planification des faisceaux et le calcul de la dose ont été réalisés avec le logiciel Muriplan (X-STRahl). Les souris Swiss nude mâles sont préalablement anesthésiées (isoflurane, Vetflurane, Virbac, Danemark délivré par système MINERVE, Esternay, France) avant d'être irradiées. Le comportement et l'état de santé des souris sont surveillés deux fois par semaine et le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à une reprise de croissance tumorale (jusqu'à un volume maximum de 2000 mm³). De plus, le volume tumoral est comparé entre les différents groupes par une méthode non paramétrique de Mann Whitney. Les étapes avant l'irradiation sont représentées dans la figure qui suit.



Étude de la biodistribution (radiomarquage par I¹¹¹In): Brièvement, 50 µL de TiONts-PEG₃₀₀₀-DTX-DOTA-¹¹¹In contenant une activité de 1,4 MBq sont injectés à plusieurs endroits dans la tumeur. L'étude de biodistribution *in vivo* après injection, est réalisée en utilisant l'imagerie nucléaire SPECT/CT (NanoSPECT/CT®, small animal imaging tomographic gamma-camera, Bioscan Inc) à 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

MODE OPERATOIRE :

Masse de nanohybride engagée : 900 µg

[solution mère de TiONts] : 2 mg/mL

Volume de solution mère à prélever : 450 µL

Activité spécifique engagée : 120 MBq.mg⁻¹

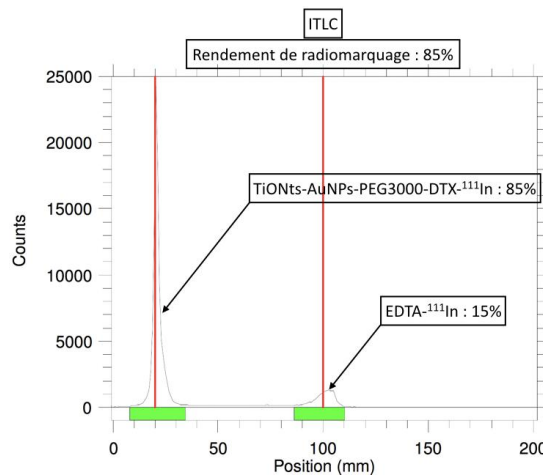
- ✓ Calculer le volume d'indium en prenant en compte le jour de calibration.
Activité indium : 275 MBq dans 300 µL
Volume à prélever : 120 µL
- ✓ Calcul du volume total de tampon : Vivo : $1/10^{\text{ème}}$ de $V(^{111}\text{In}) = 12 \mu\text{L}$

Dans un microtube, il est introduit tour à tour la solution tampon, puis la solution de TiONts, et enfin la solution d'indium 111.

- ✓ Contrôle de l'activité introduite dans le microtube : 112.9 MBq.
- ✓ Incubation 30 min à 25°C sous agitation à 1000 tr/min, chauffage assuré par le thermomixeur.
- ✓ Après incubation, analyse du rendement de marquage par ITLC. Diluer 1 µL de solution dans 1 µL d'une solution d'EDTA 50 mM dans du tampon.
- ✓ Déposer les 2 µL sur une bande ITLC, puis éluer avec un tampon citrate de sodium 0,1 M pH = 5.

Pourcentage d'incorporation du radiométal : 85.2%.

- ✓ Arrêt de la réaction par ajout d'EDTA ($1/10 * V \text{ total} = 58.2 \mu\text{L}$).
- ✓ Contrôle de la pureté chimique par ITLC (figure ci-après)
- ✓ Purification sur Amicon 3 kDa



Activité récupérée dans le microtube après purification : 17.5 MBq

Quantité de composé récupérée : 163 µg

Rendement de marquage final : 18%

- ✓ Récupération du composé radiomarqué dans du PBS. Ajuster le volume en fonction du rendement de radiomarquage pour pouvoir injecter 12 animaux (en prenant bien en compte le volume mort de la seringue) : 163 µg dans 700 µL (soit $12 * 50 \mu\text{L} + 100 \mu\text{L}$);
m injectée par animal = 11.6 µg
- ✓ Préparer les seringues pour injection en IT de 50 µL.

Annexe 9 Les imageries nucléaires

Principe de la scintigraphie :

La scintigraphie est une imagerie d'émission (c'est-à-dire que le rayonnement vient du patient après injection d'un traceur appelé radiopharmaceutique), par opposition à l'imagerie radiographique qui est une imagerie de transmission (le faisceau est externe et traverse le patient comme l'IRM).

Pour effectuer une scintigraphie, il est alors nécessaire d'injecter préalablement au patient un traceur radiopharmaceutique composé d'une molécule vectrice et d'un marqueur radioactif émetteur de rayonnement γ . La détection du marqueur radioactif dans l'organisme se fait à l'aide de γ -caméras composée d'un collimateur et de détecteurs de rayons γ . Ces caméras permettent de réaliser et reconstruire en 3D l'activité radioactive et donc la biodistribution du radiopharmaceutique dans l'organisme.

L'imagerie SPECT :

L'imagerie SPECT de l'anglais *Single Photon Emission Computed Tomography* (ou Tomographie d'Emission MonoPhotonique dite TEMP en français) est une des techniques d'imagerie nucléaire fondée sur le principe de la scintigraphie.

De nombreux marqueurs utilisés en SPECT existent tels que des bisphosphonates marqués ou encore des ligands marqués pour la détection de zones spécifiques comme des tumeurs. Les isotopes le plus souvent utilisés sont le ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I ou ^{131}I . L'imagerie SPECT permet de réaliser une imagerie fonctionnelle.

L'apport des rayons X en imagerie nucléaire SPECT :

L'imagerie nucléaire seule offre peu d'informations anatomiques ainsi pour pallier cette limite, les appareils d'imagerie SPECT ont été couplés à des scanners à rayons X pour donner naissance à des appareils SPECT/CT (CT : *Computed Tomography* en anglais). Les rayons X permettent d'obtenir des informations anatomiques car ceux-ci sont adsorbés de manières différentes selon les tissus. Le couplage de ces deux techniques d'imagerie médicale permet de localiser plus précisément la source du radioélément dans l'organisme.

Les imageries hybrides présentent alors de plus en plus d'intérêt pour associer les avantages de différentes techniques d'imagerie médicales et ainsi permettre la limitation de leurs faiblesses inhérentes.

Références

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016. **66**(1): p. 7-30.
2. *Institut National du cancer*. 2016; Available from: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers-toc-donn-es-globales>.
3. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nature reviews. Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-726.
4. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(5): p. 631-651.
5. Shi, M., J. Lu, and M.S. Shoichet, *Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(31): p. 5485-5498.
6. Park, B., *Current and future applications of nanotechnology*. Issues in environmental Science and Technology, 2007. **24**(1): p. 1-18.
7. Doane, T.L. and C. Burda, *The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2885-2911.
8. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacological reviews, 2001. **53**(2): p. 283-318.
9. Maruyama, K., *Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(3): p. 161-169.
10. Huang, H.-C., et al., *Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy*. Journal of Controlled Release, 2011. **155**(3): p. 344-357.
11. Goldberg, E.P., et al., *Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002. **54**(2): p. 159-180.
12. Choi, K.Y., et al., *Theranostic nanoplatforms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives*. Nanoscale, 2012. **4**(2): p. 330-342.
13. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
14. Karakoti, A.S., et al., *PEGylated Inorganic Nanoparticles*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(9): p. 1980-1994.
15. Erathodiyil, N. and J.Y. Ying, *Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 925-935.
16. Wang, L., et al., *Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of docetaxel and photothermal ablation induced by single-walled carbon nanotubes*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2641-2652.
17. Ametamey, S.M., M. Honer, and P.A. Schubiger, *Molecular Imaging with PET*. Chemical Reviews, 2008. **108**(5): p. 1501-1516.
18. Guillaume, T., Thèse: Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP, 2015, Université de Bourgogne.
19. Schuemann, J., et al., *Roadmap to Clinical Use of Gold Nanoparticles for Radiation Sensitization*. International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics, 2016. **94**(1): p. 189-205.
20. Xie, J., S. Lee, and X. Chen, *Nanoparticle-based theranostic agents*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(11): p. 1064-1079.
21. Xie, J. and S. Jon, *Magnetic Nanoparticle-Based Theranostics*. Theranostics, 2012. **2**(1): p. 122-124.
22. James, F.H., N.S. Daniel, and M.S. Henry, *The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice*. Physics in Medicine and Biology, 2004. **49**(18): p. N309.
23. Mirjolet, C., et al., *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept*. Radiotherapy and Oncology, 2013. **108**(1): p. 136-142.
24. Ferrari, M., *Nanovector therapeutics*. Current Opinion in Chemical Biology, 2005. **9**(4): p. 343-346.
25. Liu, Z., et al., *Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery*. Nano Research, 2009. **2**(2): p. 85-120.
26. Papa, A.L., et al., *Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes*. Nanotoxicology, 2013. **7**(6): p. 1131-42.

27. Verma, A. and F. Stellacci, *Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions*. *Small*, 2010. **6**(1): p. 12-21.
28. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**, **Supplement**: p. 206-212.
29. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. *Nat Nano*, 2007. **2**(12): p. 751-760.
30. Misra, R., S. Acharya, and S.K. Sahoo, *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy*. *Drug Discovery Today*, 2010. **15**(19): p. 842-850.
31. Lammers, T., et al., *Effect of Intratumoral Injection on the Biodistribution and the Therapeutic Potential of HPMA Copolymer-Based Drug Delivery Systems*. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2006. **8**(10): p. 788-795.
32. Verma, J., S. Lal, and C.J. Van Noorden, *Inorganic nanoparticles for the theranostics of cancer*. *European Journal of Nanomedicine*, 2015. **7**(4): p. 271-287.
33. Davis, M.E. and D.M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. *Nature reviews Drug discovery*, 2008. **7**(9): p. 771-782.
34. Lammers, T., et al., *Theranostic Nanomedicine*. *Accounts of Chemical Research*, 2011. **44**(10): p. 1029-1038.
35. Sánchez, C., et al., *Expression of multidrug resistance proteins in prostate cancer is related with cell sensitivity to chemotherapeutic drugs*. *The Prostate*, 2009. **69**(13): p. 1448-1459.
36. Sun, T., et al., *Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014. **53**(46): p. 12320-12364.
37. Oyewumi, M.O., et al., *Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **95**(3): p. 613-626.
38. Samain, R., *Ciblage thérapeutique du microenvironnement tumoral: exemple du cancer du pancréas*, 2014,
39. Merchant, N.B., et al., *Adjuvant Chemoradiation Therapy for Pancreatic Adenocarcinoma: Who Really Benefits?* *Journal of the American College of Surgeons*, 2009. **208**(5): p. 829-838.
40. Chanda, N., et al., *Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-¹⁹⁸AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010. **6**(2): p. 201-209.
41. Bregoli, L., et al., *Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016. **12**(1): p. 81-103.
42. Phillips, W.T., et al., *Image-guided interventional therapy for cancer with radiotherapeutic nanoparticles*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014. **76**: p. 39-59.
43. Xie, H., et al., *Effect of intratumoral administration on biodistribution of ⁶⁴Cu-labeled nanoshells*. *Int J Nanomedicine*, 2012. **7**: p. 2227-2238.
44. Lammers, T., et al., *Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions*. *Molecular Pharmaceutics*, 2010. **7**(6): p. 1899-1912.
45. Muthu, M.S., et al., *Nanotheranostics - Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics*. *Theranostics*, 2014. **4**(6): p. 660-677.
46. Liu, Z., et al., *In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice*. *Nature nanotechnology*, 2007. **2**(1): p. 47-52.
47. Louie, A., *Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges*. *Chemical reviews*, 2010. **110**(5): p. 3146-3195.
48. Park, J.-A., et al., *Gold nanoparticles functionalized by gadolinium–DTPA conjugate of cysteine as a multimodal bioimaging agent*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010. **20**(7): p. 2287-2291.
49. Dreaden, E.C., et al., *Beating cancer in multiple ways using nanogold*. *Chemical Society Reviews*, 2011. **40**(7): p. 3391-3404.
50. Rosi, N.L. and C.A. Mirkin, *Nanostructures in Biodiagnostics*. *Chemical Reviews*, 2005. **105**(4): p. 1547-1562.
51. Millot, N., *Rôle des interfaces sur les propriétés des nanomatériaux*. *Habilitation à diriger des recherches/Université de Bourgogne*, 2005.
52. Michalet, X., et al., *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics*. *Science*, 2005. **307**(5709): p. 538.

53. Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
54. Huang, X., S. Neretina, and M.A. El - Sayed, *Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications*. Advanced Materials, 2009. **21**(48): p. 4880-4910.
55. Jiang, S., et al., *Surface-functionalized nanoparticles for biosensing and imaging-guided therapeutics*. Nanoscale, 2013. **5**(8): p. 3127-3148.
56. Liong, M., et al., *Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery*. ACS Nano, 2008. **2**(5): p. 889-896.
57. Johannsen, M., et al., *Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial*. International Journal of Hyperthermia, 2007. **23**(3): p. 315-323.
58. Bonnemain, B., *Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review*. Journal of Drug Targeting, 1998. **6**(3): p. 167-174.
59. Chithrani, D.B., et al., *Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy*. Radiat Res, 2010. **173**(6): p. 719-28.
60. Laurent, G., et al., *Nanoparticules d'or multifonctionnelles pour l'imagerie et la thérapie*. Techniques de l'Ingenieur, 2014.
61. Matsudaira, H., A.M. Ueno, and I. Furuno, *Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to γ Rays*. Radiation Research, 1980. **84**(1): p. 144-148.
62. Yih, T.C. and M. Al - Fandi, *Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems*. Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **97**(6): p. 1184-1190.
63. Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, *Nanotech approaches to drug delivery and imaging*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(24): p. 1112-1120.
64. Couvreur, P., et al., *Nanocapsule technology: a review*. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2002. **19**(2).
65. Jain, T.K., et al., *Nanometer silica particles encapsulating active compounds: a novel ceramic drug carrier*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(43): p. 11092-11095.
66. Roser, M., D. Fischer, and T. Kissel, *Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **46**(3): p. 255-263.
67. Gref, R., et al., *The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(2): p. 215-233.
68. Sakulkhu, U., et al., *Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona*. Biomater Sci, 2015. **3**(2): p. 265-78.
69. Gianella, A., et al., *A multifunctional nanoemulsion platform for imaging guided therapy evaluated in experimental cancer*. ACS nano, 2011. **5**(6): p. 4422.
70. Kircher, M.F., H. Hricak, and S.M. Larson, *Molecular imaging for personalized cancer care*. Molecular Oncology, 2012. **6**(2): p. 182-195.
71. Lee, J.-m., et al., *Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(12): p. 2632-2641.
72. Janib, S.M., A.S. Moses, and J.A. MacKay, *Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(11): p. 1052-1063.
73. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 505-515.
74. Gao, H., W. Shi, and L.B. Freund, *Mechanics of receptor-mediated endocytosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(27): p. 9469-9474.
75. Krug, H.F. and P. Wick, *Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(6): p. 1260-1278.
76. Papa, A.L., Thèse: Synthèse et caractérisation de nanotubes d'oxydes de titane. Fonctionnalisations en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes, 2009, Université de Bourgogne.
77. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nature materials, 2009. **8**(7): p. 543.

78. Relier, C., et al., *Study of TiO₂ P25 Nanoparticles Genotoxicity on Lung, Blood, and Liver Cells in Lung Overload and Non-Overload Conditions After Repeated Respiratory Exposure in Rats*. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2017. **156**(2): p. 527-537.
79. Zhao, F., et al., *Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials*. *Small*, 2011. **7**(10): p. 1322-1337.
80. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. *Nano letters*, 2006. **6**(4): p. 662-668.
81. Chithrani, B.D. and W.C.W. Chan, *Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes*. *Nano Letters*, 2007. **7**(6): p. 1542-1550.
82. Huynh, N.T., et al., *The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting*. *Nanomedicine*, 2010. **5**(9): p. 1415-1433.
83. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Nanomedicine: current status and future prospects*. *The FASEB journal*, 2005. **19**(3): p. 311-330.
84. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. *Biomaterials*, 2010. **31**(13): p. 3657-3666.
85. Decuzzi, P., et al., *Size and shape effects in the biodistribution of intravenously injected particles*. *Journal of Controlled Release*, 2010. **141**(3): p. 320-327.
86. Ernsting, M.J., et al., *Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles*. *Journal of Controlled Release*, 2013. **172**(3): p. 782-794.
87. Deng, Z.J., et al., *Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(45): p. 455101.
88. Pujari, S.P., et al., *Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014. **53**(25): p. 6322-6356.
89. Papa, A.-L., et al., *Dispersion of titanate nanotubes for nanomedicine: comparison of PEI and PEG nanohybrids*. *Dalton Trans*, 2015. **44**(2): p. 739-46.
90. Angeles, V., et al., *The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(11): p. 115103.
91. Bhattacharjee, S., et al., *Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells*. *Particle and fibre toxicology*, 2010. **7**(1): p. 25.
92. Harush-Frenkel, O., et al., *Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **353**(1): p. 26-32.
93. Rahman, M., et al., *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*. Vol. 15. 2013: Springer Science & Business Media.
94. Otsuka, H., Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003. **55**(3): p. 403-419.
95. Levchenko, T.S., et al., *Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **240**(1-2): p. 95-102.
96. Suh, J., et al., *PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport*. *International Journal of Nanomedicine*, 2007. **2**(4): p. 735-741.
97. Sant, S., S. Poulin, and P. Hildgen, *Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008. **87A**(4): p. 885-895.
98. Hu, Y., et al., *Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **118**(1): p. 7-17.
99. Rouhana, L.L., J.A. Jaber, and J.B. Schlenoff, *Aggregation-Resistant Water-Soluble Gold Nanoparticles*. *Langmuir*, 2007. **23**(26): p. 12799-12801.
100. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. *nature*, 1991. **354**(6348): p. 56.
101. Papa, A.-L., et al., *Effect of Reaction Parameters on Composition and Morphology of Titanate Nanomaterials*. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009. **113**(29): p. 12682-12689.
102. Bavykin, D.V. and F.C. Walsh, *Titanate and titania nanotubes: synthesis, properties and applications*. 2010: Royal Society of Chemistry.
103. Kasuga, T., et al., *Formation of titanium oxide nanotube*. *Langmuir*, 1998. **14**(12): p. 3160-3163.
104. Zhang, M., Y. Bando, and K. Wada, *Sol-gel template preparation of TiO₂ nanotubes and nanorods*. *Journal of Materials Science Letters*, 2001. **20**(2): p. 167-170.
105. Hoyer, P., *Formation of a titanium dioxide nanotube array*. *Langmuir*, 1996. **12**(6): p. 1411-1413.

106. Gong, D., et al., *Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation*. Journal of Materials Research, 2001. **16**(12): p. 3331-3334.
107. Zhao, J., et al., *Fabrication of titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation*. Solid State Communications, 2005. **134**(10): p. 705-710.
108. Tsuchiya, H., et al., *Self-organized TiO₂ nanotubes prepared in ammonium fluoride containing acetic acid electrolytes*. Electrochemistry Communications, 2005. **7**(6): p. 576-580.
109. Wu, X., et al., *Synthesis of titania nanotubes by microwave irradiation*. Solid State Communications, 2005. **136**(9-10): p. 513-517.
110. Chen, Q., et al., *Trititanate Nanotubes Made via a Single Alkali Treatment*. Advanced Materials, 2002. **14**(17): p. 1208-1211.
111. Zhang, S., et al., *Formation Mechanism of H₂Ti₃O₇ Nanotubes*. Physical Review Letters, 2003. **91**(25): p. 256103.
112. Yang, J., et al., *Study on composition, structure and formation process of nanotube Na₂Ti₂O₄(OH)₂*. Dalton Transactions, 2003(20): p. 3898-3901.
113. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(8): p. 615-627.
114. Kasuga, T., et al., *Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing*. Advanced Materials, 1999. **11**(15): p. 1307-1311.
115. Sun, X. and Y. Li, *Synthesis and Characterization of Ion-Exchangeable Titanate Nanotubes*. Chemistry – A European Journal, 2003. **9**(10): p. 2229-2238.
116. Bavykin, D.V., et al., *The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO₂ nanotubes*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(22): p. 3370-3377.
117. Ma, Y., et al., *Sonication-hydrothermal combination technique for the synthesis of titanate nanotubes from commercially available precursors*. Materials Research Bulletin, 2006. **41**(2): p. 237-243.
118. Wu, D., et al., *Sequence of Events for the Formation of Titanate Nanotubes, Nanofibers, Nanowires, and Nanobelts*. Chemistry of Materials, 2006. **18**(2): p. 547-553.
119. Sallem, F., et al., *Effect of mechanical stirring and temperature on dynamic hydrothermal synthesis of titanate nanotubes*. Journal of Alloys and Compounds, 2017. **722**: p. 785-796.
120. Viriya-empikul, N., et al., *Effect of preparation variables on morphology and anatase-brookite phase transition in sonication assisted hydrothermal reaction for synthesis of titanate nanostructures*. Materials Chemistry and Physics, 2009. **118**(1): p. 254-258.
121. Sreekantan, S. and L.C. Wei, *Study on the formation and photocatalytic activity of titanate nanotubes synthesized via hydrothermal method*. Journal of Alloys and Compounds, 2010. **490**(1-2): p. 436-442.
122. Bellat, V., et al., *A multi-step mechanism and integrity of titanate nanoribbons*. Dalton Trans, 2015. **44**(3): p. 1150-60.
123. Bellat, V., Thèse: Ingénierie d'un nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates pour la médecine régénérative, 2012, Université de Bourgogne.
124. Paris, J., Thèse: Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse, 2013, Université de Bourgogne.
125. Tsai, C.-C. and H. Teng, *Structural Features of Nanotubes Synthesized from NaOH Treatment on TiO₂ with Different Post-Treatments*. Chemistry of Materials, 2006. **18**(2): p. 367-373.
126. Zhang, M., et al., *Effect of annealing temperature on morphology, structure and photocatalytic behavior of nanotubed H₂Ti₂O₄(OH)₂*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2004. **217**(1-2): p. 203-210.
127. Kukovecz, Á., et al., *Oriented Crystal Growth Model Explains the Formation of Titania Nanotubes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(38): p. 17781-17783.
128. Morgan, D.L., et al., *Alkaline hydrothermal kinetics in titanate nanostructure formation*. Journal of Materials Science, 2011. **46**(2): p. 548-557.
129. Viana, B.C., et al., *Structural, Morphological and Vibrational Properties of Titanate Nanotubes and Nanoribbons*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009. **20**(1): p. 167-175.
130. Ferreira, O.P., et al., *Unveiling the structure and composition of titanium oxide nanotubes through ion exchange chemical reactions and thermal decomposition processes*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2006. **17**(2): p. 393-402.
131. Torrente-Murciano, L., A.A. Lapkin, and D. Chadwick, *Synthesis of high aspect ratio titanate nanotubes*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(31): p. 6484-6489.
132. Pontón, P.I., et al., *The effects of the chemical composition of titanate nanotubes and solvent type on 3-aminopropyltriethoxysilane grafting efficiency*. Applied Surface Science, 2014. **301**: p. 315-322.

133. Boudon, J., et al., *Titanate Nanotubes as a Versatile Platform for Nanomedicine*, in *Nanomedicine*, O.C. Press, Editor. 2014. p. 403-427.
134. Bavykin, D.V. and F.C. Walsh, *Elongated Titanate Nanostructures and Their Applications*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009. **2009**(8): p. 977-997.
135. Kuang, D., et al., *Application of highly ordered TiO₂ nanotube arrays in flexible dye-sensitized solar cells*. *ACS nano*, 2008. **2**(6): p. 1113-1116.
136. Idakiev, V., et al., *Titanium oxide nanotubes as supports of nano-sized gold catalysts for low temperature water-gas shift reaction*. *Applied Catalysis A: General*, 2005. **281**(1-2): p. 149-155.
137. Matos, B.R., et al., *Nafion-titanate nanotube composite membranes for PEMFC operating at high temperature*. *Journal of The Electrochemical Society*, 2007. **154**(12): p. B1358-B1361.
138. Lee, C.-K., et al., *Effects of sodium content on the microstructures and basic dye cation exchange of titanate nanotubes*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008. **317**(1-3): p. 164-173.
139. Paramasivam, I., et al., *A Review of Photocatalysis using Self - organized TiO₂ Nanotubes and Other Ordered Oxide Nanostructures*. *Small*, 2012. **8**(20): p. 3073-3103.
140. Huang, C., et al., *The structural and magnetic properties of Co-doped titanate nanotubes synthesized under hydrothermal conditions*. *Applied Physics A*, 2007. **87**(4): p. 781-786.
141. Di Wu, Y.C., Ji Liu, Xiaoning Zhao, Aidong Li, and Naiben Ming, *Co-doped titanate nanotubes*. *Applied Physics Letters*, 2005. **87**(11): p. 112501.
142. Bavykin, D.V., et al., *A novel cation-binding TiO₂ nanotube substrate for electro- and bioelectro-catalysis*. *Electrochemistry Communications*, 2005. **7**(10): p. 1050-1058.
143. Zheng, W., et al., *Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized in TiO₂ nanotube films*. *Talanta*, 2008. **74**(5): p. 1414-1419.
144. Liu, A., et al., *Direct Electrochemistry of Myoglobin in Titanate Nanotubes Film*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(24): p. 8068-8074.
145. Niu, L., et al., *Titanate nanotubes: preparation, characterization, and application in the detection of dopamine*. *Journal of Materials Science*, 2008. **43**(5): p. 1510-1514.
146. Oh, S.-H., et al., *Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes*. *Biomaterials*, 2005. **26**(24): p. 4938-4943.
147. Papa, A.-L., et al., *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier*. *Journal of Physical Chemistry C*, 2011. **115**(39): p. 19012-19017.
148. Paris, J., et al., *Phthalocyanine-titanate nanotubes: a promising nanocarrier detectable by optical imaging in the so-called imaging window*. *RSC Advances*, 2015. **5**(9): p. 6315-6322.
149. Baati, T., et al., *Biocompatible titanate nanotubes with high loading capacity of genistein: cytotoxicity study and anti-migratory effect on U87-MG cancer cell lines*. *RSC Advances*, 2016. **6**(103): p. 101688-101696.
150. Magdolenova, Z., et al., *Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles*. *Nanotoxicology*, 2014. **8**(3): p. 233-278.
151. Fenyvesi, F., et al., *Investigation of the Cytotoxic Effects of Titanate Nanotubes on Caco-2 Cells*. *AAPS PharmSciTech*, 2014. **15**(4): p. 858-861.
152. Sekkat, N., et al., *Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics*. *Molecules*, 2011. **17**(1): p. 98-144.
153. Das, A., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes*. *Cancer*, 2010. **116**(1): p. 164-176.
154. Takakura, K., *Double-strand breaks in DNA induced by the K-shell ionization of calcium atoms*. *Acta Oncologica*, 1996. **35**(7): p. 883-888.
155. Maezawa, H., et al., *Lethal effect of K-shell absorption of intracellular phosphorus on wild-type and radiation sensitive mutants of Escherichia coli*. *Acta Oncologica*, 1996. **35**(7): p. 889-894.
156. Boudon, J., et al., *Radiolabeling and biodistribution study of titanate nanotubes*. Submitted, 2017.
157. Archibald, S.J., *Macrocyclic coordination chemistry*. *Annual Reports Section "A" (Inorganic Chemistry)*, 2012. **108**(0): p. 271-291.
158. McDevitt, M.R., et al., *Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2007. **48**(7): p. 1180-1189.
159. Fabian, E., et al., *Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats*. *Archives of Toxicology*, 2008. **82**(3): p. 151-157.

160. Debouttiere, P.-J., *Élaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques*, 2006, Université Claude Bernard-Lyon I.
161. Dykman, L. and N. Khlebtsov, *Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(6).
162. Mezni, A., *Synthèse et caractérisation de nanoparticules métalliques vers la nanomédecine*, 2013, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
163. Debouttière, P.J., et al., *Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging*. Advanced Functional Materials, 2006. **16**(18): p. 2330-2339.
164. Brun, E., L. Sanche, and C. Sicard-Roselli, *Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **72**(1): p. 128-134.
165. Alkilany, A.M. and C.J. Murphy, *Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?* Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(7): p. 2313-2333.
166. Alric, C., et al., *The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance*. Nanoscale, 2013. **5**(13): p. 5930-5939.
167. Mieszawska, A.J., et al., *Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(3): p. 831-847.
168. Sara Figueiredo, R.C., Daniel Luís, Alexandra R. Fernandes and Pedro V. Baptista, *Conjugation of Gold nanoparticles and liposomes for combined vehicles of drug delivery in cancer*, in *Nanomedicine* O.C. Press, Editor. 2014. p. 49-69.
169. Brust, M., et al., *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1994(7).
170. Love, J.C., et al., *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1170.
171. Alric, C., et al., *Gold nanoparticles designed for combining dual modality imaging and radiotherapy*. Gold Bulletin, 2008. **41**(2): p. 90-97.
172. Jain, P.K., W. Qian, and M.A. El-Sayed, *Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol bond*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(7): p. 2426-2433.
173. Giljohann, D.A., et al., *Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(6): p. 2072-2073.
174. Kim, D., Y.Y. Jeong, and S. Jon, *A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer*. ACS nano, 2010. **4**(7): p. 3689-3696.
175. Wang, F., et al., *Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells*. ACS nano, 2011. **5**(5): p. 3679-3692.
176. Hong, R., et al., *Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(4): p. 1078-1079.
177. Khlebtsov, N. and L. Dykman, *Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(3): p. 1647-71.
178. Butterworth, K.T., et al., *Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization*. Nanoscale, 2012. **4**(16): p. 4830-4838.
179. Miladi, I., et al., *The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents*. Small, 2014. **10**(6): p. 1116-1124.
180. Hainfeld, J.F., et al., *Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent*. Br J Radiol, 2006. **79**(939): p. 248-53.
181. James, F.H., et al., *Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma*. Physics in Medicine and Biology, 2010. **55**(11): p. 3045.
182. McMahon, S.J., et al., *Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles*. Scientific reports, 2011. **1**: p. 18.
183. Alric, C., et al., *Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(18): p. 5908-15.
184. Caravan, P., et al., *Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2293-2352.
185. White, G.W., W.A. Gibby, and M.F. Tweedle, *Comparison of Gd (DTPA-BMA)(Omniscan) versus Gd (HP-DO3A)(ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled plasma mass spectroscopy*. Investigative radiology, 2006. **41**(3): p. 272-278.

186. Roosenburg, S., et al., *PET and SPECT imaging of a radiolabeled minigastrin analogue conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and labeled with ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, and ¹¹¹In*. *Molecular pharmaceuticals*, 2014. **11**(11): p. 3930-3937.
187. Price, E.W. and C. Orvig, *Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals*. *Chemical Society Reviews*, 2014. **43**(1): p. 260-290.
188. Amstad, E., M. Textor, and E. Reimhult, *Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. *Nanoscale*, 2011. **3**(7): p. 2819-2843.
189. Studart, A.R., et al., *Rheology of Concentrated Suspensions Containing Weakly Attractive Alumina Nanoparticles*. *Journal of the American Ceramic Society*, 2006. **89**(8): p. 2418-2425.
190. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Vol. 368. 2010. 1333-1383.
191. Bridot, J.-L., et al., *Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(16): p. 5076-5084.
192. Maurizi, L., et al., *Influence of Surface Charge and Polymer Coating on Internalization and Biodistribution of Polyethylene Glycol-Modified Iron Oxide Nanoparticles*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015. **11**(1): p. 126-136.
193. Dupraz, A., et al., *Characterization of silane-treated hydroxyapatite powders for use as filler in biodegradable composites*. *Journal of biomedical materials research*, 1996. **30**(2): p. 231-238.
194. Thanh, N.T.K. and L.A.W. Green, *Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications*. *Nano Today*, 2010. **5**(3): p. 213-230.
195. Mohapatra, S. and P. Pramanik, *Synthesis and stability of functionalized iron oxide nanoparticles using organophosphorus coupling agents*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009. **339**(1-3): p. 35-42.
196. Biju, V., *Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy*. *Chemical Society Reviews*, 2014. **43**(3): p. 744-764.
197. Overbeek, J.T.G. and E. Verwey, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*. 1948.
198. Doane, T.L., et al., *Nanoparticle ζ -Potentials*. *Accounts of Chemical Research*, 2012. **45**(3): p. 317-326.
199. Lu, A.H., E.L. Salabas, and F. Schüth, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(8): p. 1222-1244.
200. Laaksonen, T., et al., *Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid - Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size*. *ChemPhysChem*, 2006. **7**(10): p. 2143-2149.
201. Bini, R.A., et al., *Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy-silanes*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2012. **324**(4): p. 534-539.
202. Plueddemann, E.P., *Silane coupling agents*. 2013: Springer Science & Business Media.
203. Togashi, T., et al., *Continuous hydrothermal synthesis of 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid-modified magnetite nanoparticles with stealth-functionality against immunological response*. *Journal of Materials Chemistry*, 2012. **22**(18): p. 9041-9045.
204. Guénin, E., et al., *Catechol versus bisphosphonate ligand exchange at the surface of iron oxide nanoparticles: towards multi-functionalization*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014. **16**(11): p. 1-13.
205. Pringuet, A., *Granulation d'une poudre d'anatase par voie colloïdale : étude de formulations pour l'élaboration de sphères poreuses millimétriques*, 2010,
206. Sakura, T., et al., *One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid*. *Colloid and Polymer Science*, 2005. **284**(1): p. 97-101.
207. Salunkhe, A.B., et al., *Polyvinyl alcohol functionalized cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications*. *Applied Surface Science*, 2013. **264**: p. 598-604.
208. Hwu, J.R., et al., *Targeted Paclitaxel by Conjugation to Iron Oxide and Gold Nanoparticles*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **131**(1): p. 66-68.
209. Mosqueira, V.C.F., et al., *Biodistribution of Long-Circulating PEG-Grafted Nanocapsules in Mice: Effects of PEG Chain Length and Density*. *Pharmaceutical Research*, 2001. **18**(10): p. 1411-1419.
210. Cruje, C. and B. Chithrani, *Polyethylene glycol density and length affects nanoparticle uptake by cancer cells*. *J Nanomed Res*, 2014. **1**(1): p. 00006.
211. Fritz, G., et al., *Electrosteric stabilization of colloidal dispersions*. *Langmuir*, 2002. **18**(16): p. 6381-6390.
212. Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. *Chemical society reviews*, 2009. **38**(6): p. 1759-1782.

213. Parhi, P., C. Mohanty, and S.K. Sahoo, *Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy*. Drug Discovery Today, 2012. **17**(17–18): p. 1044-1052.
214. Chiang, C.-T., et al., *Combinations of mTORC1 inhibitor RAD001 with gemcitabine and paclitaxel for treating non-Hodgkin lymphoma*. Cancer letters, 2010. **298**(2): p. 195-203.
215. Bava, S.V., et al., *Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor- κ B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(8): p. 6301-6308.
216. Berhoun, M., et al., *Therapeutic strategy for treatment of metastatic non-small cell lung cancer*. Annals of Pharmacotherapy, 2008. **42**(11): p. 1640-1652.
217. Nigro, N.D., V.K. Vaitkevicius, and B. Considine, *Combined therapy for cancer of the anal canal: A preliminary report*. Diseases of the Colon & Rectum, 1974. **17**(3): p. 354-356.
218. Pauwels, B., et al., *Combined modality therapy of gemcitabine and radiation*. The oncologist, 2005. **10**(1): p. 34-51.
219. Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. Clinical cancer research, 2008. **14**(5): p. 1310-1316.
220. Bartlett, D.W. and M.E. Davis, *Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA - mediated gene silencing*. Biotechnology and bioengineering, 2007. **97**(4): p. 909-921.
221. Wagner, V., et al., *The emerging nanomedicine landscape*. Nature biotechnology, 2006. **24**(10): p. 1211.
222. Keyzers, R.A. and M.T. Davies-Coleman, *Anti-inflammatory metabolites from marine sponges*. Chemical Society Reviews, 2005. **34**(4): p. 355-365.
223. Rowinsky, M., Eric K, *The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents*. Annual review of medicine, 1997. **48**(1): p. 353-374.
224. Hennenfent, K. and R. Govindan, *Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?* Annals of oncology, 2006. **17**(5): p. 735-749.
225. Zhao, P. and D. Astruc, *Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy*. ChemMedChem, 2012. **7**(6): p. 952-972.
226. Choy, H., *Taxanes in combined modality therapy for solid tumors*. Critical reviews in oncology/hematology, 2001. **37**(3): p. 237-247.
227. Dranitsaris, G., et al., *Nab-paclitaxel, docetaxel, or solvent-based paclitaxel in metastatic breast cancer: a cost-utility analysis from a Chinese health care perspective*. ClinicoEconomics and Outcomes Research: CEOR, 2015. **7**: p. 249-256.
228. Galsky, M.D. and N.J. Vogelzang, *Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer*. Annals of Oncology, 2010. **21**(11): p. 2135-2144.
229. Von Hoff, D.D., et al., *Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors*. Clinical Cancer Research, 2016. **22**(13): p. 3157.
230. Hrkach, J., et al., *Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile*. Science Translational Medicine, 2012. **4**(128): p. 128ra39-128ra39.
231. Arora, S., et al., *Attachment of docetaxel to multiwalled carbon nanotubes for drug Delivery applications*. Advanced Science Letters, 2012. **17**(1): p. 70-75.
232. Sato, A., et al., *Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 3151.
233. Reichert, D.E., J.S. Lewis, and C.J. Anderson, *Metal complexes as diagnostic tools*. Coordination Chemistry Reviews, 1999. **184**(1): p. 3-66.
234. Liu, S. and D.S. Edwards, *Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals*. Bioconjugate chemistry, 2001. **12**(1): p. 7-34.
235. Carvalho, J.F., S.H. Kim, and C.A. Chang, *Synthesis and metal complex selectivity of macrocyclic DTPA and EDTA bis (amide) ligands*. Inorganic Chemistry, 1992. **31**(20): p. 4065-4068.
236. Park, J.-A., et al., *Gold nanoparticles functionalised by Gd-complex of DTPA-bis(amide) conjugate of glutathione as an MRI contrast agent*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(23): p. 6135-6137.
237. Wu, W., et al., *Covalently combining carbon nanotubes with anticancer agent: preparation and antitumor activity*. ACS nano, 2009. **3**(9): p. 2740-2750.
238. Safavy, A., et al., *De novo synthesis of a new diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bifunctional chelating agent*. Bioconjugate chemistry, 2002. **13**(2): p. 317-326.

239. Byegård, J., G. Skarnemark, and M. Skålberg, *The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies*. Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 1999. **241**(2): p. 281-290.
240. Hancock, R.D., *Chelate ring size and metal ion selection. The basis of selectivity for metal ions in open-chain ligands and macrocycles*. J. Chem. Educ, 1992. **69**(8): p. 615.
241. Lau, E.Y., F.C. Lightstone, and M.E. Colvin, *Environmental Effects on the Structure of Metal Ion–DOTA Complexes: An ab Initio Study of Radiopharmaceutical Metals*. Inorganic chemistry, 2006. **45**(23): p. 9225-9232.
242. Xing, Y., et al., *Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging*. Theranostics, 2014. **4**(3): p. 290-306.
243. Ng, Q.K., et al., *Indium-111 labeled gold nanoparticles for in-vivo molecular targeting*. Biomaterials, 2014. **35**(25): p. 7050-7057.
244. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015. **65**(2): p. 87-108.
245. Flanders, W.D., *Review: prostate cancer epidemiology*. The Prostate, 1984. **5**(6): p. 621-629.
246. Paller, C.J. and E.S. Antonarakis, *Management of biochemically recurrent prostate cancer after local therapy: evolving standards of care and new directions*. Clinical advances in hematology & oncology: H&O, 2013. **11**(1): p. 14.
247. Denmeade, S.R. and J.T. Isaacs, *A history of prostate cancer treatment*. Nature reviews. Cancer, 2002. **2**(5): p. 389-396.
248. Hoskin, P., *Clinical Use of Brachytherapy*, in *Comprehensive Brachytherapy: Physical and Clinical Aspects*. 2012, Taylor & Francis. p. 247-252.
249. Laprise - Pelletier, M., et al., *Low - Dose Prostate Cancer Brachytherapy with Radioactive Palladium–Gold Nanoparticles*. Advanced Healthcare Materials, 2017. **6**(4).
250. Mornet, S., Thèse: Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales, 2002, Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
251. Balasundaram, G., M. Sato, and T.J. Webster, *Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD*. Biomaterials, 2006. **27**(14): p. 2798-2805.
252. Howarter, J.A. and J.P. Youngblood, *Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane*. Langmuir, 2006. **22**(26): p. 11142-11147.
253. White, L. and C. Tripp, *Reaction of (3-aminopropyl) dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. **232**(2): p. 400-407.
254. Liu, Y., et al., *Kinetics of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*. Langmuir, 2013. **29**(49): p. 15275-15282.
255. Bartczak, D. and A.G. Kanaras, *Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling*. Langmuir, 2011. **27**(16): p. 10119-10123.
256. Mi, C., et al., *Multifunctional nanocomposites of superparamagnetic (Fe₃O₄) and NIR-responsive rare earth-doped up-conversion fluorescent (NaYF₄:Yb,Er) nanoparticles and their applications in biolabeling and fluorescent imaging of cancer cells*. Nanoscale, 2010. **2**(7): p. 1141-1148.
257. Lomant, A.J. and G. Fairbanks, *Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S] dithiobis (succinimidyl propionate)*. Journal of molecular biology, 1976. **104**(1): p. 243-261.
258. Rouxhet, P.G. and M.J. Genet, *XPS analysis of bio-organic systems*. Surface and Interface Analysis, 2011. **43**(12): p. 1453-1470.
259. Koffie, R.M., et al., *Nanoparticles enhance brain delivery of blood–brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(46): p. 18837-18842.
260. Bussy, C., et al., *Microglia determine brain region-specific neurotoxic responses to chemically functionalized carbon nanotubes*. ACS nano, 2015. **9**(8): p. 7815-7830.
261. Sruthi, S., et al., *Interactions between titanate nanotubes and microglial cells*. Submitted, 2017.
262. Suzuki, H., T. Toyooka, and Y. Ibuki, *Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis*. Environmental science & technology, 2007. **41**(8): p. 3018-3024.
263. Jondeau, A., et al., *Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants*. Toxicology, 2006. **226**(2): p. 218-228.

264. Saibi, Y., et al., *Hazard identification of emergent nanomaterials: Innovative bioassays to evaluate cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress on a human hepatoma cell line*. Submitted, 2017.
265. Shen, G., A. Horgan, and R. Levicky, *Reaction of N-phenyl maleimide with aminosilane monolayers*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004. **35**(1): p. 59-65.
266. Tardio, S., *A Study of the Interfacial Interaction between Methylene Diphenyl Diisocyanate and Metals by XPS and ToF-SIMS*.
267. Cipriani, P. and D. Ben-Amotz, *Characterization of select members of the Taxane family using Raman spectroscopy*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005. **36**(11): p. 1052-1058.
268. Lee, D.S., H.J. Im, and Y.S. Lee, *Radionanomedicine: widened perspectives of molecular theragnosis*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(4): p. 795-810.
269. Moreau, M., Thèse: Marquage de molécules biologiques par des complexes de radiométaux à base de polyamines macrocycliques, 2012, Université de Bourgogne.
270. Wang, X., et al., *In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen*. *Molecular cancer therapeutics*, 2011. **10**(9): p. 1728-1739.
271. Hrkach, J., et al., *Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile*. *Science translational medicine*, 2012. **4**(128): p. 128ra39-128ra39.
272. Armstrong, C.M. and A.C. Gao, *Drug resistance in castration resistant prostate cancer: resistance mechanisms and emerging treatment strategies*. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 2015. **3**(2): p. 64-76.
273. Quivrin, M., et al., *Multiparametric MRI and post implant CT-based dosimetry after prostate brachytherapy with iodine seeds: The higher the dose to the dominant index lesion, the lower the PSA bounce*. *Radiotherapy and Oncology*, 2015. **117**(2): p. 258-261.
274. Stephen, Z.R., F.M. Kievit, and M. Zhang, *Magnetite nanoparticles for medical MR imaging*. *Materials Today*, 2011. **14**(7): p. 330-338.
275. Neouze, M.-A. and U. Schubert, *Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands*. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 2008. **139**(3): p. 183-195.
276. Zhu, M., M.Z. Lerum, and W. Chen, *How To Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-Derived Layers on Silica*. *Langmuir*, 2012. **28**(1): p. 416-423.
277. Vohs, J.M., *Site Requirements for the Adsorption and Reaction of Oxygenates on Metal Oxide Surfaces*. *Chemical Reviews*, 2013. **113**(6): p. 4136-4163.
278. Benyettou, F., et al., *Superparamagnetic nanovector with anti-cancer properties: $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @Zoledronate*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. **379**(2): p. 324-327.
279. Amstad, E., et al., *Influence of Electronegative Substituents on the Binding Affinity of Catechol-Derived Anchors to Fe_3O_4 Nanoparticles*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011. **115**(3): p. 683-691.
280. Benyettou, F., et al., *Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. **3**(36): p. 7237-7245.
281. Amstad, E., et al., *Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups*. *Nano Letters*, 2009. **9**(12): p. 4042-4048.
282. Motte, L., et al., *Multimodal superparamagnetic nanoplatform for clinical applications: immunoassays, imaging & therapy*. *Faraday Discussions*, 2011. **149**(0): p. 211-225.
283. Asenath Smith, E. and W. Chen, *How to Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes*. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2008. **24**(21): p. 12405-12409.
284. Kim, J., G.J. Holinga, and G.A. Somorjai, *Curing induced structural reorganization and enhanced reactivity of amino-terminated organic thin films on solid substrates: observations of two types of chemically and structurally unique amino groups on the surface*. *Langmuir*, 2011. **27**(9): p. 5171-5175.
285. Wang, H., X.F. Wang, and C.L. Yu. *Preparation and characterization of copolymerized aminohexylaminomethyl/phenylsilsesquioxane microparticles*. in *Applied Mechanics and Materials*. 2012. Trans Tech Publ.
286. Lee, K.W., et al., *Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003. **51**(22): p. 6516-6520.
287. Bahri, S., et al., *Adsorption and Surface Complexation Study of L-DOPA on Rutile ($\alpha\text{-TiO}_2$) in NaCl Solutions*. *Environmental Science & Technology*, 2011. **45**(9): p. 3959-3966.
288. Thomas, G., et al., *Functionalized Fe_3O_4 nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis*. *RSC Advances*, 2015. **5**(96): p. 78614-78624.

289. Malisova, B., et al., *Poly (ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: influence of assembly conditions on formation and stability*. *Langmuir*, 2010. **26**(6): p. 4018-4026.
290. Amstad, E., Thèse: Surface functionalizing superparamagnetic iron oxide nanoparticles using nitrocatechol anchors, 2010,
291. Lee, N., et al., *Speciation of l-DOPA on nanorutile as a function of pH and surface coverage using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)*. *Langmuir*, 2012. **28**(50): p. 17322-17330.
292. Fahn, S. and W. Poewe, *Levodopa: 50 years of a revolutionary drug for Parkinson disease*. *Movement Disorders*, 2015. **30**(1): p. 1-3.
293. Cencer, M., et al., *Effect of Nitro-Functionalization on the Cross-Linking and Bioadhesion of Biomimetic Adhesive Moiety*. *Biomacromolecules*, 2015. **16**(1): p. 404-410.
294. Zirbs, R., et al., *Melt-grafting for the synthesis of core-shell nanoparticles with ultra-high dispersant density*. *Nanoscale*, 2015. **7**(25): p. 11216-11225.
295. Thomas, G., et al., *One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers*. *Nanotechnology*, 2016. **27**(13): p. 135604.
296. Bekyarova, E., et al., *Chemical Modification of Epitaxial Graphene: Spontaneous Grafting of Aryl Groups*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(4): p. 1336-1337.
297. Ries, H.E. and H.D. Cook, *Monomolecular films of mixtures. I. Stearic acid with isostearic acid and with tri-*p*-cresyl phosphate. Comparison of components with octadecylphosphonic acid and with tri-*o*-xenyl phosphate*. *Journal of Colloid Science*, 1954. **9**(6): p. 535-546.
298. Mutin, P.H., G. Guerrero, and A. Vioux, *Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules*. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. **15**(35-36): p. 3761-3768.
299. Guerrero, G., et al., *Phosphonate coupling molecules for the control of surface/interface properties and the synthesis of nanomaterials*. *Dalton Transactions*, 2013. **42**(35).
300. Guerrero, G., P.H. Mutin, and A. Vioux, *Anchoring of phosphonate and phosphinate coupling molecules on titania particles*. *Chemistry of Materials*, 2001. **13**(11): p. 4367-4373.
301. Daou, T.J., et al., *Investigation of the grafting rate of organic molecules on the surface of magnetite nanoparticles as a function of the coupling agent*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **126**(1): p. 159-162.
302. Benyettou, F., et al., *A multimodal magnetic resonance imaging nanoplatfom for cancer theranostics*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011. **13**(21): p. 10020-10027.
303. Rojo, L., et al., *Self-assembled monolayers of alendronate on Ti₆Al₄V alloy surfaces enhance osteogenesis in mesenchymal stem cells*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 30548.
304. Basly, B., Thèse: Conception et caractérisation de nano-objets magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), 2010, Université de Strasbourg.
305. McLeod, K., et al., *XPS and bioactivity study of the bisphosphonate pamidronate adsorbed onto plasma sprayed hydroxyapatite coatings*. *Applied Surface Science*, 2006. **253**(5): p. 2644-2651.
306. Coste, J., D. Le-Nguyen, and B. Castro, *PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*. *Tetrahedron Letters*, 1990. **31**(2): p. 205-208.
307. Al-Warhi, T.I., H.M.A. Al-Hazimi, and A. El-Faham, *Recent development in peptide coupling reagents*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012. **16**(2): p. 97-116.
308. Castedo, M. and G. Kroemer, *La catastrophe mitotique: un cas particulier d'apoptose*. *Journal de la Société de Biologie*, 2004. **198**(2): p. 97-103.
309. Subiel, A., R. Ashmore, and G. Schettino, *Standards and Methodologies for Characterizing Radiobiological Impact of High-Z Nanoparticles*. *Theranostics*, 2016. **6**(10): p. 1651-1671.
310. Bio, M., G. Nkegang, and Y. You, *Click and photo-unclick chemistry of aminoacrylate for visible light-triggered drug release*. *Chemical Communications*, 2012. **48**(52): p. 6517-6519.
311. Zhao, P., Thèse: Nanoparticules d'or: fonctionnalisations et applications en nanomédecine et nanomatériaux, 2012, Université de Bordeaux 1.
312. Kumar, D., et al., *Isolation and characterization of degradation impurities in docetaxel drug substance and its formulation*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2007. **43**(4): p. 1228-1235.

Titre : Nanotubes de titanate comme nanovecteurs polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et sondes pour l'imagerie nucléaire

Résumé : Actuellement, les injections systémiques de médicaments atteignent faiblement les sites tumoraux et de fortes doses sont alors administrées provoquant des effets secondaires parfois lourds. Les possibilités offertes par les applications en médecine des nanoparticules permettent de nouvelles stratégies pour vectoriser des substances actives dans les cellules malades. Ces travaux de thèse portent sur le cancer de la prostate qui est le deuxième cancer le plus diagnostiqué et la cinquième cause de décès chez les hommes dans le monde.

Les nanotubes de titanate (TiONts) sont synthétisés par voie hydrothermale et présentent une longueur moyenne de 170 nm, un diamètre extérieur de 10 nm et une cavité interne accessible de 4 nm. Leur morphologie tubulaire permet aux TiONts d'être internalisés plus facilement dans les cellules, sans induire de cytotoxicité, tout en créant un effet radiosensibilisant.

Deux nanohybrides ont été développés dans cette thèse, pour lutter contre le cancer de la prostate par injection intratumorale (IT) et une attention particulière a été portée sur leur élaboration. Ces nouveaux nanomédicaments ont été pleinement caractérisés par différentes techniques (MET, ATG, potentiel zêta, XPS, spectroscopies UV-visible, IR et Raman).

La première approche consiste à combiner les TiONts avec un agent thérapeutique (le docétaxel, DTX), largement utilisé pour inhiber les tumeurs de prostate et un agent chélatant (le DOTA, radiomarqué avec ^{111}In) pour suivre la biodistribution des tubes par SPECT/CT. La surface des TiONts a été préalablement fonctionnalisée par l'APTES et le poly(éthylène) glycol (PEG₃₀₀₀) pour rendre les TiONts stables et biocompatibles. Afin d'évaluer l'efficacité de ce nanohybride, des tests *in vitro* ont montré que l'association entre les TiONts et le DTX permettait de maintenir une activité cytotoxique sur des lignées cellulaires de prostate (cellules 22Rv1 et PC-3) alors que les TiONts sans le DTX n'étaient pas toxiques. Les études *in vivo* ont montré, sur des souris Swiss nude mâles, que plus de 70% des nanovecteurs étaient retenus dans la tumeur, après injection IT, après 7 jours. De plus, un retard de croissance tumorale pour les souris ayant reçu le nanohybride avec la radiothérapie (RT) est observé, par rapport aux souris ayant reçues seulement le DTX. Après cette étude, d'autres molécules organiques ont été greffées avec succès à la surface des TiONts pour améliorer la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des nanotubes : AHAMTES, catéchols (LDOPA, DHCA et NDOPA), phosphonates (PHA, ALD) et un polymère hétérobifonctionnel de type phosphonate : $(\text{HO})_2\text{-(O)P-PEG-NH}_2$. De plus, le greffage de différentes longueurs de chaîne de PEG a été évalué par deux voies de synthèses. Le greffage de ces PEG en milieu organique (PyBOP) s'est avéré très prometteur pour améliorer leur taux de greffage et leur stabilité colloïdale.

Dans une seconde approche, pour accroître l'effet radiosensibilisant, des nanoparticules d'or (AuNPs), elles-mêmes modifiées par le DTDTPA, ont été couplées avec les TiONts en présence ou non de DTX. Cette nouvelle combinaison a pour objectif le maintien des AuNPs, par les TiONts, dans la tumeur afin d'améliorer l'effet de la RT. Grâce aux AuNPs modifiées par le DTDTPA, le nanohybride est également détectable par imagerie X et par SPECT/CT. Les résultats *in vitro* ont démontré l'activité cytotoxique de l'édifice final. Des études de biodistribution et de croissance tumorale ont également été réalisées sur des tumeurs PC-3 xénogreffées sur des souris.

Ces TiONts fonctionnalisés apparaissent comme un nouvel outil polyvalent dans le domaine médical, notamment pour lutter contre le cancer de la prostate.

Mots clés : Nanotubes de titanate, nanovecteurs, nanohybrides, stabilité colloïdale, fonctionnalisation, greffage, nanoparticules d'or, docétaxel, agents chélatants, cytotoxicité, SPECT, biodistribution, radiothérapie, croissance tumorale, cancer de la prostate

Title: Titanate nanotubes as versatile nanovectors: radiosensitizers for the treatment of prostate cancer and nuclear imaging probes

Abstract: Currently, the systemic injections of drugs reach very weakly tumor sites and large doses are thus administered causing adverse side effects. The new implementations of nanoparticles in the medical field offer new strategies to vectorize an active substance in diseased cells. This work is focused on the prostate cancer, which is the second most frequently diagnosed cancer and the fifth leading cause of cancer death in men worldwide.

Titanate nanotubes (TiONts) are synthesized by a hydrothermal process and have average dimensions of about 170 nm in length, 10 nm in outer diameter and also have an internal cavity of 4 nm in diameter. Their needle-shaped morphology allows them to be internalized more easily into cells without inducing cytotoxicity while providing a radiosensitization effect.

In the present manuscript are described two TiONts-based nanohybrids which were developed with a view to fight against prostate cancer by intratumoral (IT) injection and a particular attention was paid on their elaboration. These new nanomedicines were extensively characterized by different techniques (TEM, TGA, ζ -potential, XPS, UV-visible, IR and Raman spectroscopies).

The first approach that has been developed consists in combining TiONts with a therapeutic agent (docetaxel, DTX), widely used for the treatment of prostate cancer, and a chelating agent (DOTA) allowing the radiolabeling with ^{111}In radionuclide to monitor TiONts biodistribution by SPECT/CT. The surface of TiONts was beforehand coated with a siloxane (APTES) and linked to a heterobifunctional polymer (PEG₃₀₀₀) to create well-dispersed and biocompatible TiONts. *In vitro* tests demonstrated that the association between TiONts and DTX had cytotoxic activity against prostate cancer cell lines (22Rv1 and PC-3 cells) whereas TiONts without DTX did not. The results of *in vivo* SPECT/CT imaging are also presented as well as first irradiation tests in Swiss nude mice after IT injection on PC-3 tumors. Biological tests showed that more than 70% of TiONts nanovectors were retained within the tumor for at least 7 days. In addition, tumor growth of mice receiving nanohybrids with radiotherapy was significantly slower than that of mice receiving free DTX. After this first study, other organic molecules were successfully grafted to the surface of TiONts to improve colloidal stability and biocompatibility of nanotubes: AHAMTES, catechols (LDOPA, DHCA and NDOPA) and phosphonates (PHA, ALD and a phosphonate heterobifunctional polymer-based: $(\text{HO})_2\text{-(O)P-PEG-NH}_2$). Moreover, the influence of different PEG lengths has been considered on the nanomedicine efficacy by two different pathways. The grafting of these PEG in an organic medium (PyBOP) was very promising to improve their graft ratio and their colloidal stability.

In a second approach and in order to improve the radiosensitizing effect, DTDTPA-modified gold nanoparticles (AuNPs) were coupled with TiONts in the presence of DTX. This novel combination aims at retaining these AuNPs into the tumor *via* the TiONts to enhance the radiotherapeutic effect. The nanohybrid was also detectable by X-ray and SPECT/CT imaging through AuNPs-DTDTPA. Preliminary *in vitro* results showed once again that our final nanohybrid had a satisfactory cytotoxic activity. Biodistribution and tumor growth studies were also realized on PC-3 xenografted tumors on mice.

These functionalized-TiONts could thus become a new tool in the field of biomedicine to fight against prostate cancer and appear as versatile nanovectors.

Keywords: Titanate nanotubes, nanovectors, nanohybrids, colloidal stability, functionalization, grafting, gold nanoparticles, docetaxel, chelating agents, cytotoxicity, SPECT, biodistribution, radiotherapy, tumor growth, prostate cancer