



HAL
open science

Nanoparticules d'or à couronne polymère modulable : synthèse, interactions avec les systèmes biologiques et propriétés de radiosensibilisation

Marine Le Goas

► **To cite this version:**

Marine Le Goas. Nanoparticules d'or à couronne polymère modulable : synthèse, interactions avec les systèmes biologiques et propriétés de radiosensibilisation. Matériaux. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS163 . tel-02341658

HAL Id: tel-02341658

<https://theses.hal.science/tel-02341658>

Submitted on 31 Oct 2019

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.

Nanoparticules d'or à couronne polymère modulable : synthèse, interactions avec les systèmes biologiques et propriétés de radiosensibilisation

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : Molécules, Matériaux,
Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 19 juillet 2019, par

Marine LE GOAS

Composition du Jury :

Mme Ruxandra GREF Directrice de Recherche Université Paris Sud/CNRS (Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay)	Présidente
M. François LUX Maître de Conférences, HDR Université Claude Bernard de Lyon (Institut Lumière Matière)	Rapporteur
M. Olivier SANDRE Directeur de Recherche Université de Bordeaux/CNRS (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques)	Rapporteur
Mme Claire WILHELM Directrice de Recherche Université Paris-Diderot/CNRS (Laboratoire Matière et Systèmes Complexes)	Examinatrice
M. Serge PALACIN Directeur de Recherche CEA CEA Saclay (Laboratoire Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Energie)	Directeur de thèse
Mme Geraldine CARROT Chercheur CEA, HDR CEA Saclay (Laboratoire Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Energie)	Encadrante (Invitée)
M. Jean-Philippe RENAULT Chercheur CEA, HDR CEA Saclay (Laboratoire Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Energie)	Encadrant (Invité)

REMERCIEMENTS

Après bientôt quatre ans et demi passés au CEA, dans trois laboratoires différents, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée durant cette période, tant du point de vue scientifique qu'humain.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, **Serge Palacin**, qui a suivi d'un œil bienveillant l'ensemble de mon parcours au CEA. Merci de m'avoir permis de rebondir sur ce projet dans lequel je pense m'être pleinement épanouie.

Je remercie **Geraldine Carrot**, qui m'a co-encadrée durant cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance en me permettant de rejoindre ce projet. Merci également pour ton suivi attentif de toute la partie synthèse, de m'avoir formée à la chimie des polymères et de m'avoir permis de découvrir la diffusion des neutrons.

J'aimerais également exprimer toute ma reconnaissance à **Jean-Philippe Renault**, mon co-encadrant. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci pour ton fourmillement d'idées constant (même si je n'ai eu le temps d'en tester qu'une infime partie !) et pour l'étendue de tes connaissances scientifiques, qui ont tant enrichi ce projet fortement pluridisciplinaire. Merci également pour ton soutien permanent et ta confiance.

Je remercie les différents stagiaires qui ont travaillé avec moi sur ce sujet : **Anne Xu**, **Maria Kalbazova** et **Tom Roussel**. Merci à tous pour votre implication, j'ai vraiment apprécié travailler avec vous, et j'espère vous avoir apporté autant que vous m'avez apporté, à moi et au sujet ! Merci aussi à **Manon Boul**, qui était en stage au moment de mon arrivée, et qui a assuré la transition !

J'ai eu la chance de collaborer avec de nombreuses personnes durant ma thèse, que je souhaite toutes remercier chaleureusement.

Tout d'abord, un grand merci à **Béatrice Cambien**, qui m'a formée sur la culture cellulaire, toute novice que j'étais ! Merci pour ton enthousiasme sans faille, pour ton accueil à Nice et pour nos courses effrénées dans les couloirs du CAL pour irradier les cellules ! Merci également d'avoir effectué tous les tests avec l'iode, et d'avoir relu attentivement une partie de mon manuscrit.

Merci à toutes les personnes qui ont travaillé sur le projet NanoPIXE : **Béatrice Cambien**, **Thierry Pourcher**, **Hermine Lemaire**, **Adrien Stolidi**, **Hugues Paradis**, **Dominique Chambellan**, **Joël Hérault** et

Charbel Koumeir. Merci également à Hermine, Adrien et Hugues pour les tests réalisés en fluorescence X sur mes expériences de diffusion, et un merci tout particulier à Hugues pour la simulation et pour sa relecture de la partie de mon manuscrit qui concerne NanoPIXE.

Merci à **Fabienne Testard** pour les expériences de SAXS, et en particulier pour son aide précieuse dans le dépouillement des données de SWING ! Merci à **David Carrière** de m'avoir permis de passer des échantillons à Soleil, et pour son aide sur place. Merci également à **Frédéric Gobeaux** et **Maxime Durelle**, qui ont été mes partenaires de run nocturne là-bas. Merci à **Giulia Fadda** pour les expériences de SANS, notamment sur l'analyse des (nombreux) résultats. Merci aussi à **Arnaud Héлары** pour son aide lors du run à Orphée. Merci à **Valérie Geertsen** et **Elodie Barruet** de m'avoir formée à l'ICP-MS puis de m'avoir permis de l'utiliser régulièrement et d'avoir résolu les nombreux bugs auxquels j'ai dû faire face. Merci aussi à Elodie d'avoir passé quelques-uns de mes échantillons pendant ma période de rédaction ! Merci à **Claire Boulogne** et **Cynthia Gillet** de m'avoir formée sur le TEM, mais également d'être venues tester avec moi un grand nombre de protocoles de fixation des cellules ! Merci aussi pour leur expertise précieuse dans l'interprétation des images de TEM intracellulaires. Merci à **Jean-Charles Méaudre** pour son système de photographie sophistiqué, et pour sa patience face à la fréquence de mes visites avec mes petits gels. Merci à **Mathieu Pinault** et **Sylvie Marguet** pour les observations en MEB. Merci à **Céline Boutin** de m'avoir laissé l'accès à la salle de culture cellulaire, et pour son aide concernant sa gestion. Merci à **Sophie Combet** de m'avoir permis d'effectuer des mesures de dichroïsme circulaire. Merci à **Mickaël Bouhier** et **Sandrine Moreau** pour leur aide ponctuelle sur mes différentes manip.

Merci aussi à toutes les personnes qui ont facilité mon quotidien. Merci à **Olivier Taché** pour avoir reboosté mon ordinateur et avoir ainsi grandement amélioré ma période de rédaction. Merci à **Sandrine Moreau** et **Nabila Debou** pour les nombreuses commandes effectuées. Merci à **Catherine Julien** et **Céline Delobel** pour leur aide indispensable concernant toutes les procédures administratives !

Je tiens également à remercier tous les membres du LEDNA, LIONS et LICSEN avec qui j'ai passé de bons moments.

Un grand merci à **Clarisse Tran**, ma co-bureau de toujours au LEDNA, pour sa générosité, son écoute et son soutien sans faille dans les moments difficiles. Merci à **Raphaëlle Belchi**, **Antoine Desrues**, **Baptiste Pibaleau**, **Romain Lafourcade**, **Nicolas Massonnet** et **Christophe Théron** pour les pauses café au soleil et les discussions pour savoir QUI était partant pour un verre. Merci aussi à **Ana Borta** pour

son sourire et son soutien, à **Guillaume Le Chevallier** pour son humour à toute épreuve et à **Charles Rivron** pour sa bonne humeur.

Merci à tous mes co-bâtiment du 546, **Marie-Claire Pignié, Lucie Huart, Clémentine Colas, Serge Pin, Paul Datin, Gaël Giraudon, Maxime Durelle, David Carrière, Corinne Chevallard, Sophie Le Caër, Sandrine Moreau** et **Antoine Thill** pour leur gentillesse et pour tous les bons moments passés au labo, notamment autour d'une ou deux fondues ! Un merci tout particulier à Serge pour les nombreux débats footballistiques, les pauses goûter à deux quand tout le monde est parti, et surtout son écoute et son soutien !

Merci aussi aux membres du LICSEN que j'ai eu le plaisir de côtoyer au labo et en-dehors, **Sarah Bernardi, Julie Machado, Nabila Debou, Florian Lebon, Thomas Petenzi, Cédric Zobrist, Aurélien Doublet, Bruno Jusselme, Guy Deniau, Pascal Viel** et tous les autres, notamment pour les traditionnels pots et repas de Noël endiablés ! Merci en particulier à Sarah pour son soutien.

Un grand merci également à **l'équipe des licornes atomiques et leurs trois super coachs** ! Merci pour tous les moments partagés sur et hors des terrains de foot, toujours caractérisés par une ambiance déjantée ! Je reviendrai avec plaisir taper dans le ballon et/ou boire un verre avec vous tous !

Je voudrais enfin remercier toutes les personnes extérieures au CEA qui m'ont entourée durant ces quatre années.

Merci à **mes amis**, pour leurs encouragements constants et leur écoute, pour s'être appliqués à retenir ce sur quoi je travaillais, pour les dîners, verres, brunchs, week-ends et j'en passe, qui m'ont permis de garder une vie équilibrée même en phase de rédaction ! Un merci tout particulier à **Giulia**, qui m'a fait une formation express sur R, à **Jeanne** pour son coaching permanent, et à **Sabine**, pour avoir raconté avec fierté que sa copine de toujours soignait le cancer.

Un grand merci aussi à ma famille, à **mes parents, frère et sœurs** et **grands-parents** pour leur soutien indéfectible. Merci de m'avoir encouragée et d'avoir toujours cru en moi.

Enfin, merci à **Charles**, pour tout le reste et bien plus encore.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

I.	Nanoparticules pour le cancer	13
A.	Une grande diversité dans la nature et la fonction.....	14
B.	La possibilité d'assurer un ciblage.....	15
C.	Propriétés recherchées	17
II.	Radiosensibilisation.....	22
A.	Traitement du cancer par radiothérapie	22
B.	La radiosensibilisation comme solution pour améliorer les traitements.....	25
C.	Mécanismes de l'effet radiosensibilisant des NPs	28
III.	Nanoparticules d'or greffées polymères	32
A.	Propriétés intéressantes des nanoparticules d'or	32
B.	Pourquoi et comment greffer du polymère en surface ?.....	33
IV.	Objectifs de la thèse	35
	Bibliographie	37

CHAPITRE 2. SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR GREFFÉES POLYMÈRES

I.	Stratégie de synthèse	47
A.	Méthode de synthèse des polymères	47
B.	Méthode de synthèse des nanoparticules d'or	53
II.	Synthèse et caractérisation des ligands polymères	55
A.	Synthèse de l'amorceur	55
B.	Synthèse par ATRP des ligands méthacrylates	56
III.	Elaboration des nanoparticules d'or greffées polymères.....	61
A.	Synthèse et purification.....	61
B.	Caractérisation du cœur d'or.....	64
C.	Etude en diffusion de neutrons aux petits angles.....	71
IV.	Greffages post-synthèse	79
A.	Association avec la chimiothérapie : greffage de la doxorubicine.....	79

B. Greffage de protéines : BSA et lactoferrine.....	83
V. Conclusions et perspectives.....	93
Bibliographie	98

CHAPITRE 3. INTERACTION DES NANOPARTICULES AVEC LES SYSTEMES BIOLOGIQUES

I. Stabilité colloïdale en milieux biologiques.....	111
A. Etude par spectroscopie UV-visible.....	113
B. Etude par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	115
II. Migration dans la matrice extracellulaire.....	119
A. Le Matrigel® comme modèle de la MEC.....	120
B. Méthodologie.....	122
C. Résultats	124
III. Captation et localisation intracellulaire des NPs.....	130
A. Quelle est la cinétique d'internalisation ?	130
B. Quel est l'impact de la couronne polymère sur l'internalisation ?	132
C. Où sont localisées les NPs et dans quel état d'agrégation se trouvent-elles ?.....	141
D. Les NPs peuvent-elles être éliminées ?	154
IV. Cytotoxicité	156
A. Description de la méthode utilisée	157
B. Variation de la longueur de la couronne PMAA	158
C. Variation de la nature de la couronne.....	159
D. Impact de la Doxorubicine greffée.....	163
E. Impact des protéines greffées	164
V. Conclusions et perspectives.....	165
Bibliographie	172

CHAPITRE 4. COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES SOUS IRRADIATION

I. Effets de l'irradiation sur les NPs greffées polymères.....	189
A. Stabilité des NPs sous irradiation.....	190
B. Cytotoxicité des NPs irradiées	192

II. Étude de la radiosensibilisation sous plusieurs types de rayonnements	195
A. Radiothérapie interne : iode 131	196
B. Radiothérapie externe : protons.....	201
C. Discussion	203
III. Méthode PIXE pour localiser les NPs.....	207
IV. Conclusions et perspectives.....	211
Bibliographie	214
CONCLUSION GÉNÉRALE	221
ANNEXE A : PARTIE EXPÉRIMENTALE	231
ANNEXE B : SPECTRES RMN	247
ANNEXE C : SPECTRES UV-VISIBLE	250
ANNEXE C : DIFFUSION DE RAYONNEMENTS AUX PETITS ANGLES	251
ANNEXE E : IMPACT DU POLYMÈRE LIBRE	259

Chapitre 1. Contexte de l'étude

TABLE DES MATIÈRES

I. Nanoparticules pour le cancer	13
A. Une grande diversité dans la nature et la fonction.....	14
B. La possibilité d'assurer un ciblage.....	15
C. Propriétés recherchées	17
1. Stabilité en milieu biologique.....	17
2. Hémocompatibilité.....	17
3. Circulation prolongée	18
4. Extravasation vers la tumeur	18
5. Diffusion à l'intérieur de la tumeur	19
6. Internalisation cellulaire	20
II. Radiosensibilisation	22
A. Traitement du cancer par radiothérapie	22
1. Principe et modalités.....	22
2. Effets radiobiologiques : mécanismes et implications	24
B. La radiosensibilisation comme solution pour améliorer les traitements.....	25
C. Mécanismes de l'effet radiosensibilisant des NPs	28
1. Mécanismes physiques.....	28
2. Mécanismes chimiques.....	30
3. Mécanismes biologiques.....	31
III. Nanoparticules d'or greffées polymères	32
A. Propriétés intéressantes des nanoparticules d'or	32
B. Pourquoi et comment greffer du polymère en surface ?.....	33
1. Les avantages d'une couronne polymère	33
2. Les polymères couramment utilisés.....	33
3. Méthodes de synthèse	34

IV. Objectifs de la thèse	35
Bibliographie.....	37

Le concept de nanotechnologie a été évoqué pour la première fois par Richard Feynman, dans son discours visionnaire du 29 décembre 1959, intitulé *There's Plenty of Room at the Bottom*, dans lequel il anticipe et encourage le développement de processus qui permettront de manipuler la matière à l'échelle nanométrique.¹ Ce n'est cependant qu'en 1974 que le terme 'nanotechnologie' est utilisé pour la première fois par Norio Taniguchi.² Les nanotechnologies se développent ensuite rapidement, notamment avec l'invention de deux instruments permettant d'observer la matière à l'échelle atomique ou subatomique : le microscope à effet tunnel en 1981, et le microscope à force atomique en 1985.³

Aujourd'hui, d'après les définitions de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), un nano-objet est défini comme « une portion discrète de matériau dont une, deux ou les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique ».⁴ Les nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques des nanomatériaux, qui résultent de leur taille nanométrique, sont exploitées dans de nombreux domaines comme l'électronique, l'énergie, le bâtiment ou la santé.

L'utilisation de nanoparticules pour le traitement du cancer semble notamment très prometteuse. En particulier, l'effet radiosensibilisant des nanoparticules métalliques a été beaucoup étudié en radiothérapie, dans une perspective de réduction des effets secondaires générés par l'irradiation des tissus sains autour de la tumeur. C'est dans ce cadre que se situe ce projet de thèse, qui porte sur l'étude de nanoparticules d'or greffées d'une couronne polymère pour la radiosensibilisation.

Ce premier chapitre a pour objectif de présenter le contexte de l'étude, et ainsi d'exposer les différentes problématiques qui y sont liées. L'utilisation des nanoparticules (NPs) pour le traitement du cancer sera tout d'abord abordée d'un point de vue général. Nous évoquerons ensuite le cas particulier de la radiosensibilisation, avant de nous focaliser sur les nanoparticules d'or greffées de polymères. Les objectifs de la thèse seront détaillés en fin de chapitre.

I. NANOPARTICULES POUR LE CANCER

Le principe de la nanomédecine consiste à utiliser les nanotechnologies dans le domaine de la santé, à la fois pour la prévention, le diagnostic, et le traitement des maladies. Cette discipline a commencé à se développer dès les années 1990, mais le terme n'est apparu qu'en 2000 dans la littérature scientifique.⁵ Elle constitue depuis un pan important de la recherche en nanotechnologies.

Parmi les maladies ciblées par les recherches en nanomédecine, le cancer reste majoritaire. Il reste en effet l'une des principales causes de décès dans le monde, étant responsable d'une mort sur six d'après les chiffres publiés par l'Organisation Mondiale de la Santé.⁶ Dans ce contexte, la nanomédecine

semble très prometteuse puisqu'elle ouvre de nombreuses possibilités : délivrance d'agents anticancéreux, développement de nouveaux agents thérapeutiques, développement de systèmes de diagnostic *in vitro* et *in vivo* pour identifier et classer les cellules cancéreuses.⁷ En particulier, une grande variété de NPs a été mise au point pour une utilisation en tant que vecteurs, agents de contraste, ou agents thérapeutiques, en exploitant différentes propriétés des NPs.

A. UNE GRANDE DIVERSITÉ DANS LA NATURE ET LA FONCTION

Initialement, les NPs ont été développées en tant que vecteurs, dans le but d'améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution d'agents anticancéreux déjà existants. Le Doxil™ a ainsi été le premier nanomédicament approuvé par la *Food and Drug Administration* aux Etats-Unis, il correspond à des molécules de doxorubicine (agent chimiothérapeutique) encapsulées dans des liposomes.⁸ En effet, un des problèmes majeurs de la chimiothérapie réside dans sa non-spécificité : les molécules cytotoxiques affectent la tumeur, mais aussi les tissus sains, ce qui génère d'importants effets secondaires.⁹ La possibilité d'assurer un relargage au niveau de la cible grâce à des nanovecteurs a donc été beaucoup étudiée.

Les NPs développées pour la délivrance de médicaments sont de nature très variée : liposomes, polymères, hydrogels, micelles, silice mésoporeuse, nanotubes de carbone, NPs métalliques, NPs d'oxydes métalliques, etc.¹⁰ On peut noter qu'au-delà de la chimiothérapie, les NPs sont également utilisées comme vecteurs pour d'autres types de thérapie du cancer, comme la thérapie génique ou l'immunothérapie.^{11,12} Parmi les nombreuses NPs étudiées, beaucoup ont été conçues dans l'optique d'effectuer un relargage contrôlé du médicament qu'elles transportent. Deux stratégies sont possibles : effectuer une libération progressive de la molécule, par diffusion à travers une matrice polymère par exemple, ou bien déclencher son relargage sous stimuli, qu'il soit interne (pH, enzymes) ou externe (température, lumière, ultrasons, champ magnétique, etc.).¹⁰

Outre leur fonction de vecteur, certaines NPs sont également utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques intrinsèques, contribuant ainsi au développement de nouvelles méthodes de traitement du cancer :

- Hyperthermie magnétique : l'objectif de l'hyperthermie est d'induire une augmentation locale de la température au niveau des tissus cancéreux pour les détruire. Ce phénomène peut être obtenu en utilisant des NPs magnétiques exposées à un champ magnétique. Les nanoparticules d'oxydes de fer sont les plus répandues.¹³
- Photothérapies : on distingue la thérapie photothermale, qui utilise des agents capables d'absorber l'énergie de photons incidents et de la dissiper localement sous forme de chaleur,

de la thérapie photodynamique, pour laquelle les agents génèrent des espèces réactives de l'oxygène.¹⁴ La lumière envoyée est généralement dans la gamme du proche infrarouge (700-1100 nm), très peu adsorbée par les tissus, ce qui permet une bonne pénétration de la lumière. Les NPs métalliques présentant des propriétés de plasmon de surface (or en particulier) sont particulièrement exploitées en thérapie photothermale, à condition que leur bande plasmon se trouve dans cette région du proche infrarouge. En thérapie photodynamique, les *quantum dots* et les NPs à conversion ascendante (*upconversion*) sont parmi les objets les plus utilisés.¹⁴

- Radiosensibilisation : certaines NPs sont utilisées pour augmenter les effets des rayonnements en radiothérapie. Ce type de traitement sera exposé en détails dans une partie dédiée de ce chapitre.

Parallèlement aux NPs à visée thérapeutique, certaines sont utilisées en tant qu'agents de contraste pour différentes techniques d'imagerie. Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont par exemple étudiées en radiographie ou en tomodensitométrie aux rayons X (couramment appelée scanner dans le contexte médical).¹⁵ En IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), les NPs d'oxyde de fer peuvent être utilisées grâce à leurs propriétés ferromagnétiques ou superparamagnétiques.¹⁶ Différents types de NPs ont également été développés en médecine nucléaire, pour vectoriser certains radioisotopes.¹⁷

Enfin, certains systèmes cherchent à combiner propriétés thérapeutiques et diagnostiques des NPs, on les qualifie alors de théranostiques.¹⁸ L'utilisation de NPs dans le cadre du traitement du cancer offre donc de multiples possibilités.

B. LA POSSIBILITÉ D'ASSURER UN CIBLAGE

Si les NPs ont été tant étudiées, c'est aussi parce qu'elles permettent *a priori* un ciblage des tumeurs. Deux stratégies peuvent être utilisées : le ciblage passif, qui exploite les défauts structurels intrinsèques des tumeurs, et le ciblage actif, qui met en jeu des mécanismes de reconnaissance moléculaire entre cellules et nanovecteurs.

Le ciblage passif repose sur une perméabilité et une rétention accrue des NPs dans les tumeurs, ce qu'on appelle effet EPR (*Enhanced Permeation and Retention*). Les parois des vaisseaux sanguins tumoraux sont en effet caractérisées par une structure moins jointive, avec des espaces entre les cellules endothéliales qui permettent aux NPs de passer pour atteindre la tumeur. La taille des NPs est ici un critère important puisqu'il a été montré que ce phénomène de transport à travers les parois des vaisseaux sanguins, appelé extravasation, était favorisé pour les petites NPs.¹⁹ En outre, les tumeurs possèdent un système lymphatique défaillant, ce qui limite l'évacuation des NPs. La combinaison des

deux effets entraîne ainsi l'accumulation des NPs dans les tumeurs.²⁰ Une schématisation de l'ensemble de l'effet EPR est présentée sur la Figure I.1.

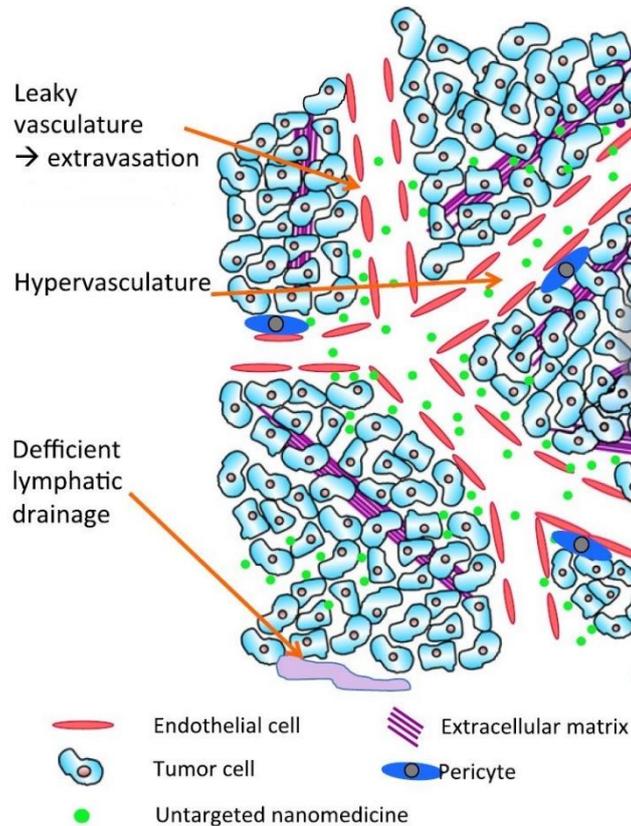


Figure I.1 - Schématisation de l'effet EPR²¹

Depuis sa mise en évidence, l'effet EPR a constitué l'un des principaux arguments pour le développement de NPs dans le cadre du cancer. S'il a été démontré à de nombreuses reprises chez le petit animal, son application à l'homme est cependant remise en question depuis quelques années.^{20,21} La raison principalement invoquée est le caractère faiblement représentatif du modèle de tumeur murine par rapport à la tumeur humaine, en particulier en termes de vitesse de développement, ratio massique tumeur/corps, taux métaboliques et durée de vie de l'hôte. Des différences ont également été observées au niveau du microenvironnement tumoral, avec notamment l'identification dans la tumeur humaine de régions hypoxiques et d'une pression de fluide interstitiel plus élevée.²¹ L'extension de l'effet EPR à l'homme est donc à considérer avec précaution.

Plutôt que de se reposer sur l'effet EPR, certaines études ont choisi un ciblage actif de leurs NPs, en ajoutant sur leur surface des ligands spécifiques de récepteurs situés sur les cellules visées.¹⁰ Les ligands utilisés sont de nature variée : petites molécules, peptides, anticorps, acides nucléiques.⁹ Cependant, certaines études ont montré que la présence de ces ligands améliorait l'internalisation cellulaire des NPs mais n'affectait pas leur localisation dans la tumeur.²² Salvati *et al.* ont également mis en évidence la perte des propriétés de ciblage de leurs NPs fonctionnalisées après exposition à des

protéines, à cause de l'adsorption de celles-ci sur la surface des NPs.²³ De manière générale, cette approche reste en outre limitée par l'hétérogénéité des tumeurs, puisque la majorité des systèmes développés ne cible qu'un récepteur.

L'efficacité des NPs pour assurer le ciblage des tumeurs, bien que prometteuse, est ainsi sujette à débats. Le faible nombre de nanomédicaments mis sur le marché témoigne des difficultés rencontrées dans le transfert vers la clinique²⁴ et souligne l'importance de développer des modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents pour anticiper les comportements des NPs. L'utilisation de NPs dont la biodistribution pourrait être suivie *in vivo* serait également un avantage pour s'assurer de leur ciblage.²⁵

C. PROPRIÉTÉS RECHERCHÉES

L'écart observé entre le potentiel des NPs en oncologie et leur faible utilisation en clinique s'explique en grande partie par la multitude de barrières biologiques auxquelles elles doivent faire face, une fois administrées au patient, et qui ont pour conséquence de limiter leur efficacité. L'anticipation du comportement des NPs *in vivo* est donc complexe. Nous allons tenter de dresser ici une liste non exhaustive des différentes propriétés recherchées pour les NPs, en lien avec les obstacles rencontrés. Les paragraphes sont organisés de manière séquentielle, pour suivre les NPs depuis leur administration jusqu'à leur arrivée au site d'intérêt. On se place ici dans le cadre d'une injection intraveineuse, qui est la méthode d'administration la plus courante.

1. Stabilité en milieu biologique

La première propriété que les NPs à visée médicale doivent posséder est une bonne stabilité en milieu biologique. Des phénomènes d'agrégation, voire de précipitation, sont en effet souvent observés au contact d'environnements contenant de fortes concentrations en sels et/ou biomolécules.²⁶ Les propriétés physico-chimiques déterminées auparavant se trouvent alors modifiées. Cette agrégation peut se produire avant même l'administration, lors de la préparation de la solution par exemple. Elle peut alors nuire lors de l'injection, en plus d'induire une instabilité de la solution dans le temps. *In vivo*, l'agrégation va avoir un fort impact sur la biodistribution des NPs, et peut aller jusqu'à générer une toxicité importante, via un blocage des capillaires pulmonaires par exemple.²⁷ Ces aspects de stabilité en milieu biologique seront abordés de manière détaillée dans le chapitre 3 (§ 1).

2. Hémocompatibilité

Lors d'une administration intraveineuse, les NPs vont également interagir avec les différents constituants du sang. Certaines études ont ainsi montré des effets dangereux pour certaines NPs : agrégation des plaquettes et induction de thromboses,²⁸ effet pro- ou anti-coagulation,²⁹ induction de

l'hémolyse (destruction des globules rouges) et d'inflammations,³⁰ etc. L'hémocompatibilité des NPs est donc un critère primordial dans une perspective d'injection intraveineuse.

3. Circulation prolongée

Pour augmenter la proportion de NPs susceptibles d'atteindre la tumeur, le temps de circulation des NPs doit être suffisamment long pour qu'une grande partie des NPs ait l'occasion de passer dans les vaisseaux sanguins de la tumeur, et ainsi profiter de l'effet EPR supposé pour pénétrer celle-ci. Plusieurs processus biologiques s'opposent cependant à cette circulation prolongée.

Tout d'abord, une filtration rapide des petites NPs (diamètre hydrodynamique < 5-6 nm) est assurée par les reins.³¹ Le système réticulo-endothélial, qui se compose de cellules phagocytaires situées principalement dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques, peut également éliminer les NPs de la circulation sanguine. Le processus commence par l'opsonisation des NPs, qui correspond à la reconnaissance d'un élément étranger par l'organisme, et qui s'effectue via l'adsorption de protéines à la surface des NPs. Celles-ci vont ensuite se lier à des récepteurs spécifiques des phagocytes, qui vont procéder à leur élimination.³² Ce processus est extrêmement efficace pour les particules de diamètre supérieur à 200 nm. Pour des tailles inférieures, il a été montré que, pour des propriétés de surface identiques, le temps de circulation diminue quand la taille des NPs augmente.³³ Les propriétés électrostatiques vont également impacter le temps de circulation selon la tendance suivante : neutre/zwitterionique > anionique > cationique.^{32,34}

Parmi les stratégies les plus répandues, l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) en surface des NPs permet de réduire efficacement le processus d'opsonisation, et donc l'élimination par le système réticulo-endothélial.³⁵ Le temps de circulation des NPs peut ainsi passer de quelques minutes à plusieurs heures.³⁶ D'autres approches pour rendre les NPs furtives visent à les recouvrir de peptides reconnus comme « soi » par les macrophages, ou bien de membranes cellulaires extraites de leucocytes ou de globules rouges.³²

4. Extravasation vers la tumeur

Comme dit précédemment, l'extravasation correspond au passage des NPs à travers les parois des vaisseaux sanguins pour pénétrer dans les tissus. Elle est censée être favorisée au niveau de la tumeur, grâce à l'effet EPR. Les petites NPs vont bénéficier plus facilement de cet effet, en particulier pour les tumeurs peu perméables, qui présentent des espaces plus réduits entre les cellules endothéliales.³⁷

Les phénomènes d'adhésion des NPs sur les parois des vaisseaux sanguins impactent fortement la propension des NPs à l'extravasation. Des considérations de dynamique des fluides doivent tout d'abord être prises en compte. Il a en effet été montré que les petites NPs sphériques situées dans le

flux sanguin étaient moins susceptibles de dériver vers les parois des vaisseaux et d'établir un contact avec celles-ci, par rapport aux NPs non sphériques et de taille plus importante (Figure I.2).^{38,39} Cette caractéristique va donc défavoriser leur extravasation vers la tumeur. Les vaisseaux sanguins étant chargés négativement, la charge de surface joue également un rôle : les interactions avec les NPs cationiques sont favorisées, ce qui leur confère une bonne capacité à traverser les parois.³³

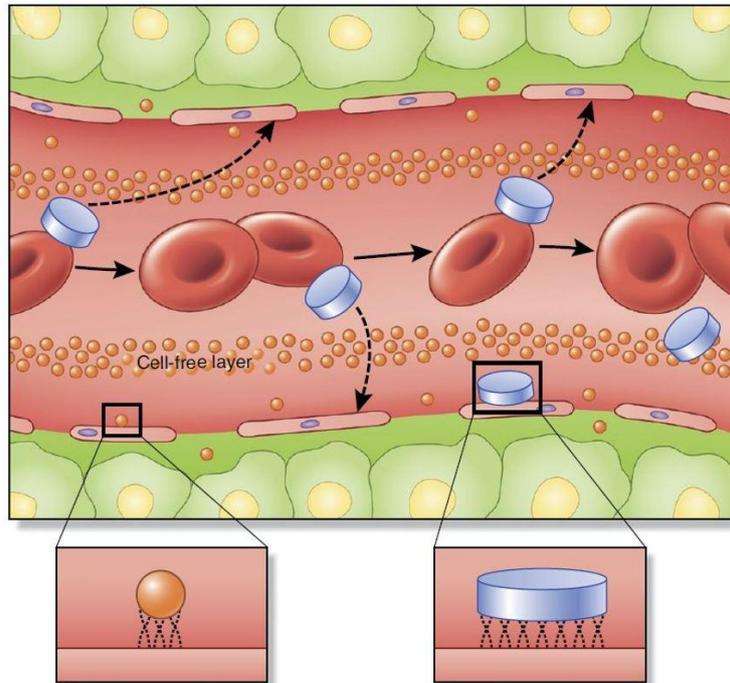


Figure I.2 - Schématisation des flux de NPs dans le sang et de leur adhésion sur les parois des vaisseaux : impact de leur taille et leur géométrie³²

Un frein majeur à la pénétration des NPs dans la tumeur provient de la forte pression du fluide interstitiel dans les tumeurs,⁴⁰ mentionnée précédemment. Celle-ci s'explique en partie par le mauvais drainage lymphatique qui caractérise les tumeurs et qui les empêche d'éliminer les excès de fluide. Cette forte pression peut augmenter jusqu'à s'approcher de la pression microvasculaire, stoppant ainsi tout flux des vaisseaux vers la tumeur.⁴¹ L'extravasation des NPs repose alors sur le seul mécanisme de diffusion, pour lequel les petites tailles sont favorisées.⁴²

5. Diffusion à l'intérieur de la tumeur

De la même manière, le déplacement des NPs dans la tumeur repose principalement sur la diffusion, puisque la pression du fluide interstitiel est à peu près uniforme sur l'ensemble de la tumeur. La seule exception est la périphérie de la tumeur, où la pression chute rapidement, ce qui crée un fort gradient et a tendance à évacuer les NPs par convection, depuis ces zones périphériques vers les tissus environnants.⁴¹

Les tumeurs étant souvent caractérisées par une distribution inégale des vaisseaux sanguins,⁴³ certaines régions se trouvent accessibles uniquement aux NPs ayant une bonne capacité de diffusion dans la matrice extracellulaire (MEC) tumorale, plus dense que celle des tissus sains.⁴⁴ La densité cellulaire dans les tumeurs est en outre très élevée, ce qui limite encore la diffusion des NPs.⁴⁵ La taille et les propriétés électrostatiques des NPs vont à nouveau être déterminantes.³³ Cet aspect sera abordé plus en détails dans le chapitre 3 (§ II).

Ainsi, le transport intratumoral est considéré comme un frein majeur à l'application des NPs, puisqu'une grande partie reste bloquée près des vaisseaux sanguins dont elles se sont extraites.⁴⁶ On peut noter que ces limitations sont également à prendre en compte dans le cas d'injections intratumorales, contrairement à la plupart des points évoqués jusqu'à présent.

6. Internalisation cellulaire

La plupart des NPs doivent pénétrer jusque dans la cellule pour assurer leur fonction thérapeutique. Pour celles qui ont réussi à pénétrer dans la tumeur et atteindre une cellule, la prochaine étape est donc l'internalisation. Deux principaux mécanismes ont été rapportés : la diffusion passive à travers la membrane cellulaire⁴⁷ et l'endocytose, démontrée dans la plupart des études de captation de NPs.⁴⁸ L'endocytose est un processus d'internalisation au cours duquel la membrane plasmique enveloppe de la matière extérieure pour former une vésicule, appelée endosome, qui est invaginée par la cellule (Figure 1.3).⁴⁹ Il existe différents types d'endocytose, dont certains reposent sur des interactions spécifiques avec des récepteurs membranaires.

En termes de propriétés favorisant l'internalisation, il a été montré que les NPs cationiques pénétraient très bien dans les cellules.⁵⁰ Certains auteurs ont également déterminé, à la fois expérimentalement et à partir de modélisations, une taille optimale d'environ 50 nm pour le processus d'endocytose.^{51,52} Dans ce contexte, l'impact des différentes propriétés des NPs sur leur captation sera discuté de manière plus approfondie dans le chapitre 3 (§ III.B). Le greffage de protéines capables d'être reconnues par les récepteurs de certaines cellules sera également étudié.

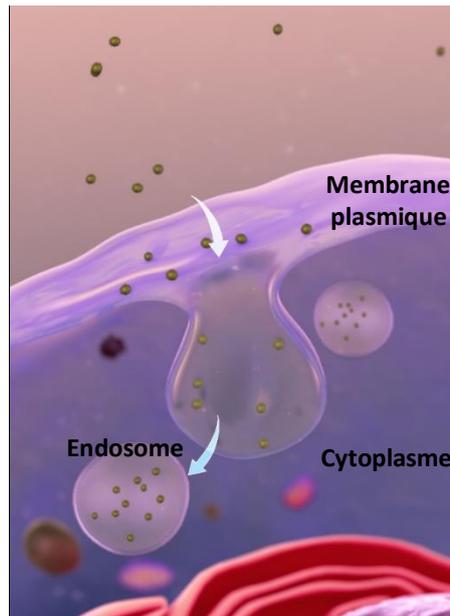


Figure I.3 - Schématisation du mécanisme d'endocytose ⁵³

Le mécanisme d'endocytose implique cependant que les NPs internalisées vont être soit directement évacuées de la cellule par exocytose, soit dirigées vers les lysosomes, qui sont les compartiments cellulaires assurant la digestion des corps étrangers.⁴⁹ Les lysosomes sont caractérisés par une forte acidité et par la présence de nombreuses protéases, ce qui leur permet de dégrader certaines NPs ou parties de NPs.^{54,55} Pour échapper à cette possible élimination ou dégradation, une stratégie récurrente consiste à développer des NPs capables de s'échapper des endosomes après internalisation, c'est ce qu'on appelle la fuite endosomale.⁵⁶ Ce phénomène n'est toutefois pas toujours nécessaire, puisqu'il a été montré que les NPs localisées dans les lysosomes pouvaient générer de la toxicité, y compris en radiosensibilisation.^{57,58}

Les différents obstacles listés ici montrent les difficultés à développer des NPs dont une grande proportion serait capable d'atteindre leur cible tumorale. Les propriétés nécessaires au passage des différentes étapes sont parfois peu compatibles entre elles, ce qui complique davantage le design d'une NP optimale. Si nous avons traité ici un cas général, on peut ajouter que certaines tumeurs sont encore plus difficiles d'accès, comme celles se situant dans le cerveau, qui sont protégées par la barrière hémato-encéphalique.⁵⁹ L'évaluation des propriétés des NPs et de leur capacité à passer chacune des barrières biologiques mentionnées est donc primordiale au cours de leur développement, et ce quelles que soient leur nature et leur fonctionnalité.

II. RADIOSENSIBILISATION

Les NPs qu'on se propose d'étudier dans ce projet sont développées dans la perspective d'être utilisées pour leurs propriétés radiosensibilisantes, dans le cadre du traitement du cancer. Cette partie a donc pour objectif d'établir un état de l'art de la radiosensibilisation. Nous allons tout d'abord rappeler le fonctionnement des traitements par radiothérapie, à la fois au niveau physique et biologique. Le principe de la radiosensibilisation sera ensuite détaillé, avant d'évoquer les différents mécanismes sous-jacents.

A. TRAITEMENT DU CANCER PAR RADIOTHÉRAPIE

La découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895, puis la découverte du radium par Marie Curie peu de temps après, ont permis d'établir les premiers jalons de l'utilisation de rayonnements pour traiter le cancer. La radiothérapie est aujourd'hui une des méthodes les plus utilisées en oncologie, puisque 50% des patients en reçoivent au cours de leur traitement.⁶⁰ Elle est généralement employée à des fins curatives, seule ou en combinaison avec d'autres types de traitement, mais également à des fins palliatives, afin de soulager les patients de certains symptômes causés par la maladie.

1. Principe et modalités

Le principe de la radiothérapie est d'utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Ces derniers peuvent provenir d'une source externe ou interne. Le deuxième cas repose sur l'injection de sources radioactives dans le corps du patient. Soit la source est scellée et implantée près de la tumeur de manière temporaire (curiethérapie, ou brachythérapie), soit elle est non scellée et administrée de manière systémique, par injection ou ingestion, et va se fixer sur les cellules cibles (radiothérapie interne vectorisée).⁶¹ Le traitement du cancer de la thyroïde par utilisation d'iode radioactif est un exemple d'application de la radiothérapie interne vectorisée, aussi appelée radiothérapie métabolique dans ce cas précis.⁶²

La radiothérapie externe est la modalité la plus répandue. Elle consiste à irradier la tumeur avec des rayons de haute énergie, depuis une source située à l'extérieur du patient. Le dépôt d'énergie produit localement est quantifié par la dose reçue, qui correspond à la quantité d'énergie absorbée par unité de masse, mesurée en gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Plusieurs natures de rayonnements peuvent être exploitées : photons (rayons X et gamma) ou particules (protons, électrons, ions carbone ou autres). Le premier cas constitue la radiothérapie à proprement parler, tandis que le second est appelé hadronthérapie. Par abus de langage, on parle cependant de radiothérapie pour désigner l'ensemble

des techniques utilisant des rayonnements ionisants. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons nous concentrer sur le cas de la protonthérapie, qui est la plus utilisée des hadronthérapies.

La protonthérapie a été développée à partir des années 1950. Son principe a tout d'abord été proposé par Robert Wilson en 1946, qui avait anticipé les avantages de l'utilisation de protons dans une visée thérapeutique.⁶³ La technique a été appliquée sur des patients pour la première fois en 1954, aux Etats-Unis.⁶⁴ L'utilisation de protons se justifie principalement par une meilleure distribution spatiale de la dose par rapport aux photons. Comme illustré sur la Figure I.4, les rayons X (courbe verte) déposent une dose maximale en entrée, qui diminue ensuite progressivement à mesure qu'ils pénètrent plus profondément dans le corps, entraînant une irradiation des tissus sains en amont et en aval de la tumeur. Par comparaison, la dose déposée dans le corps par les protons (courbes rouges) est caractérisée par une valeur faible et constante en entrée, puis par une augmentation forte au niveau de la tumeur (pic de Bragg), et enfin par une chute brutale, jusqu'à une valeur nulle.⁶⁵ Les courbes rouges correspondent cependant à des faisceaux monoénergétiques, tandis que ce sont des faisceaux modulés qui sont utilisés en thérapie (courbe orange sur la Figure I.4). Ceux-ci permettent d'augmenter la taille de la zone du pic de Bragg (*Spread-Out Bragg Curve*) afin de recouvrir la totalité de la tumeur. Cela implique toutefois une augmentation de la dose en entrée. Outre la meilleure distribution en profondeur, les protons ont également l'avantage de moins se disperser latéralement par rapport aux photons.⁶⁵

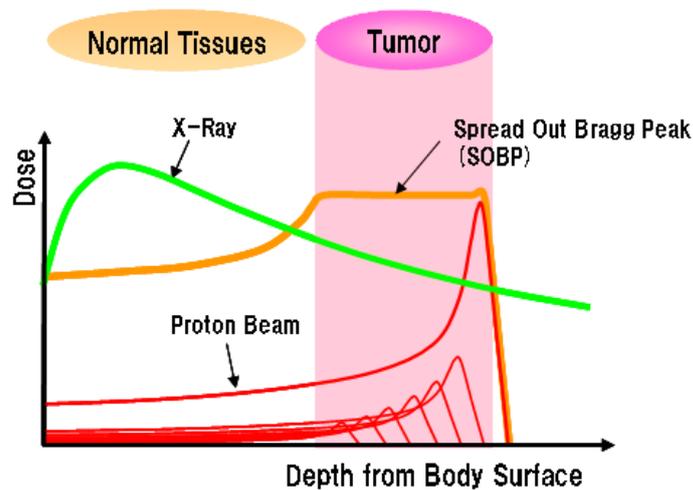


Figure I.4 - Distributions de dose en fonction de la profondeur : comparaison des rayons X et des protons ⁶⁶

En augmentant le différentiel de dose déposée entre la tumeur et les tissus sains, l'utilisation des protons permet donc de réduire la dose totale nécessaire pour traiter les patients. Sachant que l'irradiation peut générer l'apparition de cancers radio-induits tardifs, la protonthérapie est indiquée dans le cas des cancers pédiatriques, afin de limiter ces risques sur le long terme. Les tumeurs localisées au niveau de l'œil, de la base du crâne ou de la colonne vertébrale constituent la deuxième indication

majeure, afin d'épargner les tissus/organes sensibles situés en aval.⁶⁷ La principale limite à la diffusion de la protonthérapie provient cependant de son coût important, dû en particulier à l'infrastructure complexe nécessaire pour la production du faisceau (cyclotron).^{67,68} En France, il existe trois centres de protonthérapie, dont celui situé à Nice, sur lequel nous avons pu réaliser des expériences (chapitre 4 § II.B).

2. Effets radiobiologiques : mécanismes et implications

L'irradiation d'un système biologique génère une succession de processus dont les échelles de temps varient énormément, comme illustré sur la Figure I.5.

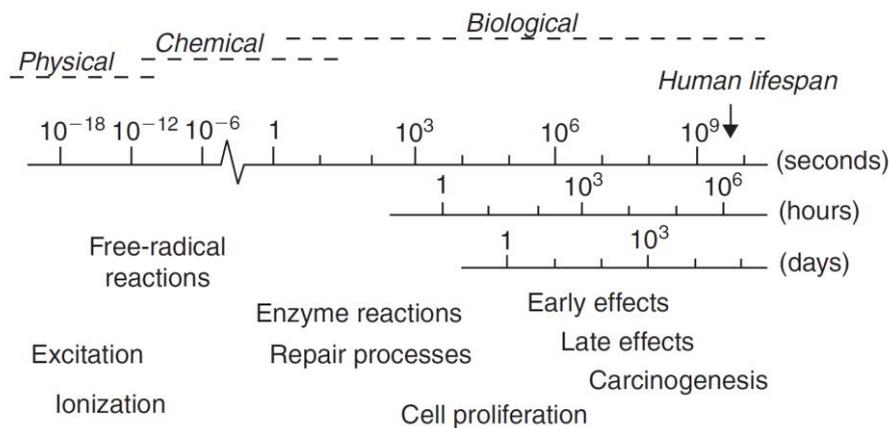


Figure I.5 - Echelle de temps des différents effets de l'irradiation sur des systèmes biologiques⁶⁹

Les processus mis en jeu peuvent être divisés en trois phases :^{69,70}

- La phase physique, où les rayonnements interagissent avec les atomes constitutifs du milieu, entraînant des phénomènes d'excitation et d'ionisation via l'éjection d'électrons. Ces électrons secondaires peuvent à leur tour exciter et ioniser d'autres atomes, ce qui peut générer des cascades d'événements. Au cours de cette phase, les électrons secondaires produits peuvent se solvater, et des radicaux libres sont créés (HO^\bullet et H^\bullet par exemple).
- La phase chimique, durant laquelle les espèces formées pendant la phase physique (électrons solvatés et radicaux libres) réagissent avec les composants cellulaires. On assiste également à une homogénéisation de la distribution des radicaux libres, auparavant regroupés le long de du parcours du rayonnement. Les réactions mises en jeu sont à la fois des recombinaisons et des réactions dites de fixation, qui mènent à des modifications chimiques stables de molécules biologiques, comme l'ADN par exemple.
- La phase biologique, qui regroupe tous les processus ultérieurs. Des réactions enzymatiques se produisent dans un premier temps, afin d'agir sur les lésions formées. La plupart de ces lésions vont pouvoir être réparées, et ce sont les quelques-unes dont la réparation a échoué qui vont mener à la mort cellulaire. Les cassures double-brin sur l'ADN sont par exemple plus

difficiles à réparer que les simple-brin, et vont donc générer plus de toxicité. La mort des cellules impactées peut s'effectuer lentement, celles-ci pouvant encore subir plusieurs divisions mitotiques avant de mourir. D'autre part, il a été montré que des cellules non irradiées pouvaient aussi être affectées, à cause de signaux de stress envoyés par les cellules voisines.⁷¹ Les premiers effets sur les tissus apparaissent au bout de quelques jours, mais des effets se manifestent également à plus long terme, quelques mois ou années après l'irradiation.

Les processus décrits ici sont communs aux tissus sains et cancéreux. Comme cela a déjà été évoqué, durant un traitement par radiothérapie, l'irradiation cible la tumeur mais ne peut épargner complètement les tissus sains environnants. C'est cette exposition des tissus sains qui va générer des effets secondaires indésirables chez les patients. Les effets suivants sont parmi les plus fréquemment observés : fatigue, perte de cheveux, réactions de la peau, nausées, problèmes de fertilité, etc.⁷²

Outre les effets secondaires, un problème majeur lié à l'utilisation de la radiothérapie est le développement de radiorésistance chez certaines tumeurs. Ce phénomène peut provoquer un échec du traitement, et entraîner par la suite une résurgence de la tumeur ou l'apparition de métastases.⁷³

B. LA RADIOSENSIBILISATION COMME SOLUTION POUR AMÉLIORER LES TRAITEMENTS

Afin de pallier les inconvénients de la radiothérapie, la communauté scientifique s'est penchée sur l'utilisation de composés, appelés radiosensibilisants, qui vont permettre d'améliorer l'efficacité du traitement. L'objectif est de réduire la dose nécessaire pour traiter la tumeur, afin de minimiser les effets secondaires et pouvoir surmonter une éventuelle radiorésistance. Dans la littérature, le terme radiosensibilisant regroupe des effets assez divers, qu'on pourrait en réalité diviser en deux catégories : les effets de radiosensibilisation, et les effets de radioamplification.

La radiosensibilisation consiste à agir sur différents aspects de la tumeur pour qu'elle soit plus impactée par l'irradiation. Cela peut passer par l'apport d'oxygène pour contrer les phénomènes de radiorésistance des zones hypoxiques,⁷⁴ par des modifications du métabolisme du glucose, également source de radiorésistance,⁷³ ou encore par l'utilisation de leurres moléculaires qui imitent les cassures double-brin de l'ADN, piégeant ainsi les protéines chargées de la réparation de l'ADN et limitant leur action sur les dommages réels induits par l'irradiation.⁷⁵ Les agents de chimiothérapie peuvent également être considérés comme des radiosensibilisants, lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec la radiothérapie.⁷⁶ L'ensemble de ces composés augmente donc l'efficacité du traitement par radiothérapie, mais sans interagir directement avec les rayonnements.

Au contraire, certains composés sont utilisés pour amplifier les effets des rayonnements, notamment la production d'électrons secondaires, ce qui augmente la dose déposée localement. Les éléments lourds étant connus pour posséder ce type de propriété,⁷⁷ les NPs composées de matériaux à numéro atomique élevé sont particulièrement étudiées dans ce contexte.⁷⁸ On peut désigner ce type d'effets comme de la radioamplification. Pour la suite, on peut noter que la distinction sémantique radiosensibilisation/radioamplification ne sera cependant plus faite, et que le terme de radiosensibilisant sera également utilisé pour caractériser les NPs de numéro atomique élevé.

Hainfeld *et al.* sont les premiers à avoir mis en évidence la capacité de tels objets à améliorer les effets d'une irradiation sous rayons X. Leur étude, publiée en 2004, montre une augmentation significative de la survie à un an de souris atteintes de carcinomes, traitées avec des AuNPs ($Z = 79$) de 1,9 nm de diamètre avant d'être irradiées par des rayons X : le taux de survie passe de 20% pour le traitement aux rayons X seuls à 86% lorsqu'il est précédé de l'injection de AuNPs (Figure I.6).⁷⁹

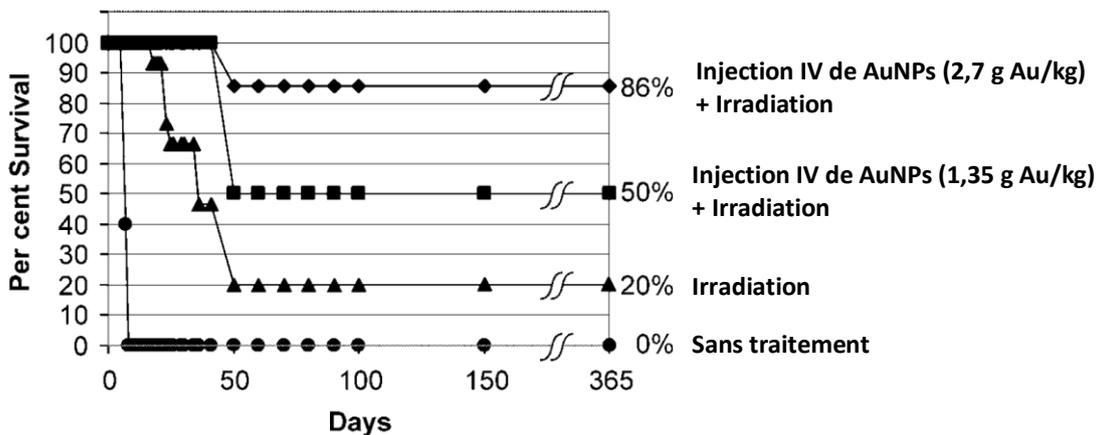


Figure I.6 - Première étude *in vivo* mettant en évidence l'effet radiosensibilisant de AuNPs : courbes de survie de souris atteintes de carcinomes et ayant reçu différents traitements⁷⁹ (IV = intraveineuse)

Cette étude a ouvert la voie à de nombreuses autres utilisant des AuNPs, à la fois *in vitro* et *in vivo*, qui ont fait l'objet de plusieurs revues ces dernières années.⁸⁰⁻⁸³ Leur travail de synthèse des différentes données publiées souligne la grande variété d'objets testés, à la fois en termes de taille (1,9 à 74 nm), de forme (nanosphères, nanobâtonnets, nanotriangles, « nanopointes »), ou encore de ligands utilisés (petites molécules comme des citrates ou des thiols, polymères, dont PEG, ou biomolécules). Les conditions expérimentales sont elles aussi très diverses, notamment la nature et l'énergie du rayonnement utilisé (rayons X, rayons γ , protons, électrons ou ions carbone, avec des énergies allant de 100 keV à 12 MeV environ), le type de tumeur, la concentration des AuNPs, le temps d'exposition avant irradiation, la dose d'irradiation, etc.

Outre l'or, d'autres éléments ont également été utilisés pour former des NPs radiosensibilisantes. Le gadolinium, en particulier, est exploité car il présente un numéro atomique élevé ($Z = 64$) et est déjà

utilisé en tant qu'agent de contraste en IRM. Il n'est pas utilisé sous forme de cœur métallique comme les AuNPs, mais plutôt de chélates. Ainsi, les NPs nommées AGuIX[®] (Figure I.7), produites par la société NH TherAguix, sont constituées d'un cœur de polysiloxane sur lequel sont greffées des dérivés des chélates DOTA(Gd) (DOTA = 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacide acétique).⁸⁴ Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré leur pouvoir radiosensibilisant, et ce sur différents types de cancers.⁸⁵ La possibilité de suivre la biodistribution des AGuIX[®] par IRM est un avantage notable. Cela a notamment permis de mettre en évidence une accumulation des NPs dans les tumeurs après une injection intraveineuse.⁸⁶ La connaissance de l'évolution dans le temps de leur biodistribution offre aussi la possibilité d'ajuster le moment de l'irradiation pour que le différentiel de concentration de NPs entre tumeur et tissus sains soit maximal. Le même groupe a aussi développé des NPs combinant or et gadolinium.^{87,88}

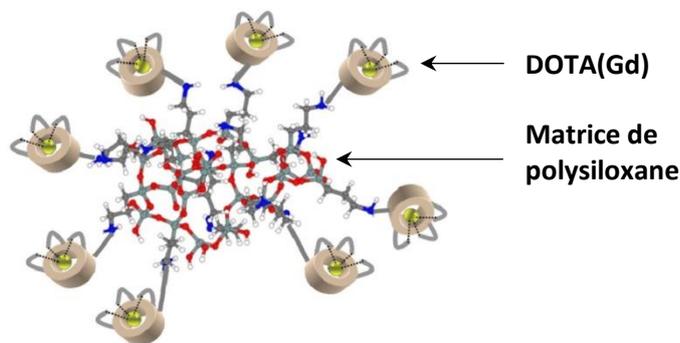


Figure I.7 - Représentation schématisée des NPs AGuIX[®] ⁸⁹

Des NPs constituées d'oxyde d'hafnium ($Z = 72$), appelées NBTXR3 et fabriquées par la société Nanobiotix, ont également montré de bonnes propriétés radiosensibilisantes *in vitro* et *in vivo*.⁹⁰ Elles ont la particularité d'être développées pour des injections intratumorales. Les NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques et d'argent ont aussi fait l'objet de quelques études de radiosensibilisation. De bons résultats ont été démontrés *in vivo*.⁹¹⁻⁹³ Enfin, une grande variété d'autres matériaux ont été testés uniquement *in vitro*, sur cellules ou à l'échelle moléculaire (impact sur des plasmides notamment), parmi lesquels des nanoparticules de platine,⁹⁴ d'oxyde de cérium,⁹⁵ de sélénium,⁹⁶ de bismuth,⁹⁷ ou encore des nanodiamants.⁹⁸

Malgré le nombre important d'études *in vivo* et *in vitro* rapportant des résultats prometteurs dans la littérature, la translation du concept de NPs radiosensibilisantes vers la clinique reste très limitée. Seules les NPs AGuIX[®] et NBTXR3 sont en cours d'essais cliniques pour différents types de cancers. Les AGuIX[®] sont notamment en entrée de phase II pour le traitement des métastases cérébrales,⁹⁹ tandis que les NBTXR3 viennent tout juste d'obtenir une autorisation de mise sur le marché européen pour le traitement des sarcomes des tissus mous.¹⁰⁰

La difficulté à transférer ce type de technologie vers la clinique s'explique tout d'abord par les mêmes problèmes que rencontrent les autres types de nanomédicaments : synthèses difficiles à monter en échelle, caractérisations effectuées dans des conditions peu représentatives du vivant, modèles *in vitro* et *in vivo* peu pertinents, comparaison des résultats limitée à cause d'une grande variabilité dans les méthodologies utilisées, manque de données toxicologiques. Mais certains challenges sont également spécifiques au domaine de la radiosensibilisation, en particulier la compréhension des mécanismes sous-jacents.

C. MÉCANISMES DE L'EFFET RADIOSENSIBILISANT DES NPS

Si l'effet radiosensibilisant des NPs à numéro atomique élevé a été démontré depuis maintenant quinze ans, les mécanismes impliqués sont encore mal compris et sujets à débat. Initialement, seul l'effet physique d'augmentation de la dose était considéré, mais les différents travaux menés ont ensuite montré que les NPs agissent au niveau des trois phases (physique, chimique, biologique) utilisées pour décrire les processus radiobiologiques. C'est cette distinction que nous avons choisie pour structurer notre état de l'art des mécanismes.

1. Mécanismes physiques

A l'origine, l'utilisation de NPs composées de matériaux à numéro atomique élevé s'est faite pour exploiter leur fort coefficient d'absorption massique en énergie comparé à celui de l'eau ou des tissus mous, notamment pour les photons d'énergie 10-200 keV (cas de l'or illustré sur la Figure I.8a). Cette caractéristique permet aux NPs d'augmenter considérablement la dose déposée au niveau des tissus irradiés.¹⁰¹ Cependant, en radiothérapie clinique, les énergies utilisées sont plutôt de l'ordre du MeV, afin de pénétrer plus profondément les tissus (profondeur atteinte inférieure à 5 mm pour des énergies de 200 keV¹⁰²). A ces énergies, le contraste entre les tissus et les NPs est beaucoup plus faible (Figure I.8a). Les premières modélisations prévoyaient donc que les NPs ne seraient pas efficaces à ces énergies,¹⁰¹ tandis que les études *in vitro* réalisées ont montré un effet radiosensibilisant.¹⁰³ McMahon *et al.* ont expliqué cette divergence par le fait que les modélisations initiales du phénomène s'intéressaient à la dose moyenne déposée, alors que la radiosensibilisation provient d'une forte inhomogénéité de la dose à l'échelle nanométrique.¹⁰⁴ Cette inhomogénéité s'explique par les processus physiques mis en jeu.

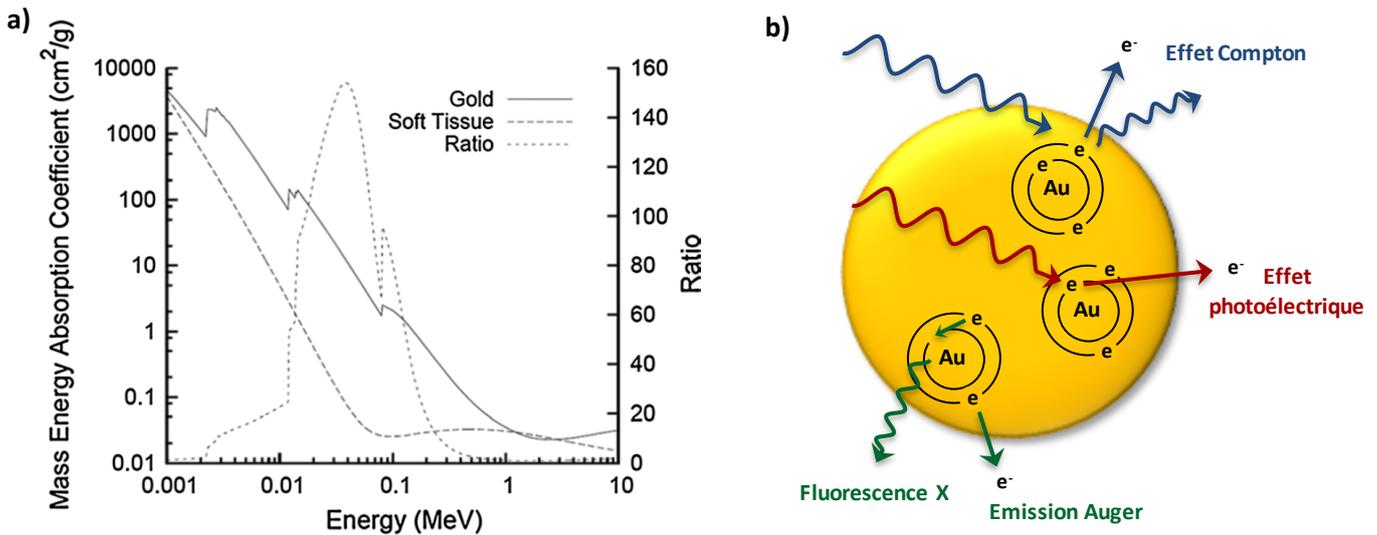


Figure 1.8 - Principes physiques à l'origine des propriétés radiosensibilisantes des AuNPs
 (a) Comparaison des coefficients d'absorption massique en énergie de l'or et des tissus mous ⁸²

(b) Schématisation des différents types de rayonnements secondaires produits par une AuNP exposée à des rayonnements ionisants

Lorsqu'une NP interagit avec le rayonnement incident, deux principaux processus peuvent avoir lieu au niveau des atomes : l'effet Compton et l'effet photoélectrique, qui correspondent à l'éjection d'un électron après l'absorption partielle ou totale de l'énergie d'un photon incident (Figure 1.8b). L'absorption photoélectrique est dominante pour les photons keV. La dépendance en $\sim Z^4$ de sa section efficace explique donc que les matériaux à Z élevé soient performants dans cette gamme d'énergie. Pour des énergies supérieures à 500 keV, c'est l'effet Compton qui devient prédominant, avec une section efficace proportionnelle à Z.⁷⁸ C'est pourquoi le contraste avec les tissus devient nettement plus faible. Les électrons Compton et photoélectrons sont très énergétiques et ont une grande portée (plusieurs micromètres).¹⁰⁵

Après une ionisation des couches internes, l'atome peut se désexciter via l'émission d'un photon fluorescent ou d'un électron Auger. Les photons fluorescents sont caractérisés par une grande portée et peuvent ainsi délocaliser la perturbation loin de la NP. Les électrons Auger, souvent produits en cascade, sont caractérisés par une énergie faible (systématiquement inférieure à 10 keV, et souvent inférieure à 1 keV) qu'ils déposent à proximité de la NP (portée maximale de quelques centaines de nanomètres) de manière très dense.¹⁰⁵ Autour de la NP, l'énergie déposée semble donc principalement provenir des électrons Auger. Dans le cas des NPs présentant des plasmons de surface, comme les AuNPs, Verkhovtsev *et al.* proposent en outre un mécanisme de désexcitation lié à ces plasmons, qui produirait une quantité importante d'électrons de basse énergie.^{106,107}

C'est cette production importante d'électrons de basse énergie (Auger ou issus des plasmons de surface) qui expliquerait la forte inhomogénéité de dose à l'origine de l'effet radiosensibilisant des NPs.¹⁰⁵ Les électrons de basse énergie semblent donc jouer un rôle prépondérant, que ce soit pour des

irradiations autour du MeV ou du keV.¹⁰⁴ Si les deux gammes d'énergie génèrent un effet radiosensibilisant, celui-ci semble toutefois plus important pour les photons keV, dans des conditions expérimentales similaires.^{90,103,108,109} Pour les irradiations en protons, les simulations réalisées semblent montrer que l'augmentation de la dose est indépendante de l'énergie incidente.¹¹⁰

2. Mécanismes chimiques

Au-delà des processus purement physiques, un impact des NPs a également été identifié au niveau de la phase de production des radicaux libres (dite phase physico-chimique). L'équipe de Guo a été la première à développer le concept de *Chemical Enhancement* des NPs sous irradiation et à mettre en valeur le rôle prépondérant de la surface des NPs.¹¹¹ D'autres études ont depuis été publiées, mais le sujet reste assez peu traité. Sicard-Roselli *et al.* ont ainsi mesuré une production massive de radicaux hydroxyles HO• en présence de NPs, qu'ils expliquent par un mécanisme de catalyse à l'interface eau/NP.¹¹² Une étude plus récente de la même équipe a mis en évidence une production d'électrons solvatés en quantité similaire (Figure I.9).¹¹³ Les auteurs soulignent que cette observation est en contradiction avec les augmentations de doses prévues par les mécanismes physiques, remettant en cause les approches décrites dans la partie précédente. D'autres travaux récents, menés par deux équipes distinctes, mettent eux aussi en avant les mécanismes chimiques pour expliquer l'effet radiosensibilisant.^{114,115} Toutes ces équipes formulent cependant des hypothèses différentes quant aux réactions radicalaires sous-jacentes à ces mécanismes chimiques. Les ions superoxyde (O₂⁻) sont notamment évoqués, de même que le peroxyde d'hydrogène, dont la décomposition en radicaux hydroxyles HO• peut être catalysée par des surfaces métalliques.¹¹⁶

Puisque la surface semble jouer un rôle prépondérant dans ces divers mécanismes, ceux-ci vont être sensibles à l'environnement chimique en surface des NPs. Ainsi, plusieurs études (expérimentales et simulations) ont montré une production de radicaux libres réduite en présence de ligands.^{117,118} Cet aspect sera abordé plus en détails dans le chapitre 4 (§ II).

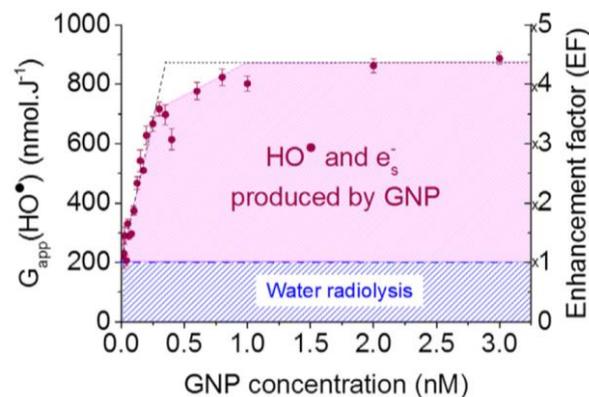


Figure I.9 - Rendements apparents de formation de radicaux libres sous irradiation en présence de AuNPs ¹¹³

Les NPs peuvent également impacter la phase chimique des processus radiobiologiques à travers une sensibilisation de l'ADN. L'équipe de Sanche a ainsi montré que la formation de complexes ADN/AuNPs augmente la proportion de dommages générés par l'irradiation au niveau de l'ADN.^{119,120} Seules les NPs capables de pénétrer dans le noyau sont toutefois concernées par ce mécanisme.

3. Mécanismes biologiques

L'hypothèse d'un effet biologique des NPs a initialement été avancée pour tenter d'expliquer des disparités de radiosensibilisation qui ne peuvent provenir des mécanismes physiques et chimiques évoqués précédemment, comme la différence d'efficacité observée pour deux lignées cellulaires proches.¹²¹ L'impact des NPs sur le cycle cellulaire a souvent été proposé comme un des possibles processus biologiques de radiosensibilisation. Certaines NPs semblent en effet induire un arrêt du cycle dans les phases les plus sensibles aux rayonnements, mais les résultats contradictoires obtenus par l'ensemble des études à ce sujet imposent de considérer cette hypothèse avec précaution. L'altération des fonctions de réparation de l'ADN par les NPs est un autre mécanisme souvent proposé dans la littérature. Là encore, les résultats sont très disparates, et cet effet pourrait dépendre de la nature des NPs.^{83,122}

Outre l'ADN, d'autres composants cellulaires pourraient être affectés par la présence des NPs. Taggart *et al.* suggèrent ainsi que les mitochondries jouent un rôle dans la radiosensibilisation.¹²³ La membrane cellulaire et le réticulum endoplasmique pourraient eux aussi être des cibles des NPs radiosensibilisantes.^{122,124} L'ensemble de ces mécanismes biologiques devra donc être étudié plus en détails dans les années à venir.

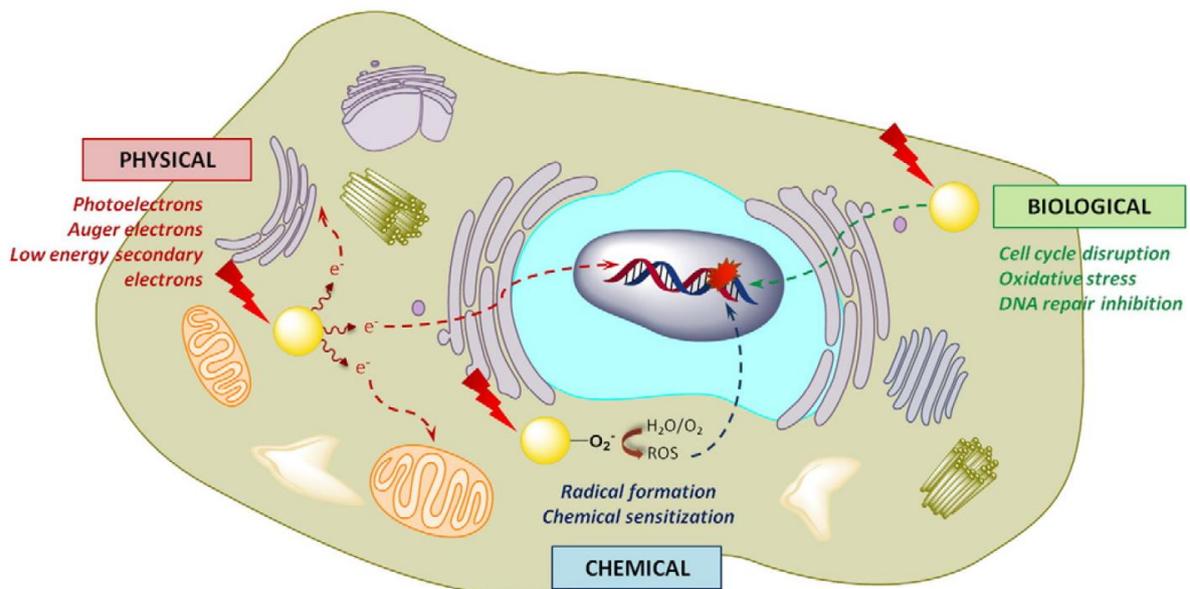


Figure 1.10 - Schématisation des mécanismes de radiosensibilisation par les NPs divisés selon les 3 phases utilisées en radiobiologie⁸³

L'état de l'art présenté ici souligne la complexité des mécanismes de radiosensibilisation, qui reposent sur des processus multiples de nature physique, chimique et biologique (résumés et schématisés sur la Figure I.10). Malgré un grand nombre d'études *in silico*, *in vitro* et *in vivo* publiées, des incohérences et contradictions persistent dans la littérature, ce qui nuit actuellement au développement clinique de NPs radiosensibilisantes. A terme, seule une meilleure compréhension des mécanismes permettra d'identifier les paramètres clés pour optimiser la radiosensibilisation des NPs, et ainsi développer des NPs transférables vers la clinique. La méthode de screening *in silico* récemment proposée par Retif *et al.* va tout à fait dans ce sens,¹²⁵ et souligne l'intérêt d'avoir accès à des objets bien définis et stables.

III. NANOPARTICULES D'OR GREFFÉES POLYMÈRES

Les nanoparticules d'or sont parmi les plus étudiées pour les applications médicales, en particulier en radiosensibilisation, comme cela vient d'être évoqué. Ce projet portant sur l'utilisation de AuNPs, nous allons ici détailler l'ensemble de leurs caractéristiques qui expliquent cet intérêt particulier, avant d'aborder le cas précis des AuNPs greffées polymères, à la fois en termes de propriétés recherchées et de méthodes de synthèse.

A. PROPRIÉTÉS INTÉRESSANTES DES NANOPARTICULES D'OR

L'or se distingue tout d'abord par sa grande inertie chimique, ce qui permet de limiter sa toxicité. Ainsi, les AuNPs sont souvent considérées comme biocompatibles, même si certaines études ont révélé une certaine toxicité, en particulier pour les AuNPs non fonctionnalisées en surface.¹²⁶

Les différentes méthodes de synthèse des AuNPs permettent de jouer facilement sur leur taille, mais aussi d'obtenir des objets de formes très diverses (sphères, bâtonnets, cubes, bipyramides, cages, etc.).¹²⁷ La morphologie des AuNPs peut donc être adaptée selon l'application visée.

La surface des AuNPs est facilement fonctionnalisable, car elle est capable de lier différents groupements tels que les thiols et les amines. Les ligands thiols sont les plus utilisés, afin d'exploiter leur meilleure affinité pour l'or.¹²⁷ Les propriétés de surface des AuNPs sont ainsi parfaitement modulables, selon la nature des ligands utilisés.

Les AuNPs possèdent des propriétés optiques particulières, en particulier la résonance de plasmon de surface, qui leur donne cette couleur rouge. C'est cette résonance plasmon qui est exploitée pour la thérapie photothermale, comme expliqué dans la première partie de ce chapitre.

Enfin, comme cela a déjà été mentionné dans ce chapitre, le fort coefficient d'absorption massique des rayons X de l'or rend les AuNPs attractives en tant qu'agents de contraste ou radiosensibilisants.

L'intérêt pour les AuNPs en médecine s'explique donc par l'ensemble de ces propriétés, qui leur confèrent trois avantages : une morphologie et des propriétés physico-chimiques modulables, des propriétés thérapeutiques prometteuses, et la possibilité de les détecter *in vivo*. Le greffage de polymères en surface des AuNPs peut en outre apporter des avantages supplémentaires.

B. POURQUOI ET COMMENT GREFFER DU POLYMÈRE EN SURFACE ?

1. Les avantages d'une couronne polymère

Une des principales limites pour l'application des NPs dans le domaine médical est leur faible stabilité colloïdale. Elles ont souvent tendance à s'agréger avec le temps, en particulier dans les milieux salins et/ou contenant des protéines. L'ajout de polymères en surface constitue donc un moyen efficace pour stabiliser les objets.¹²⁸ Cette stratégie a été largement utilisée dans les études de NPs à visée médicale, en particulier pour les AuNPs. On distingue toutefois les polymères simplement adsorbés en surface de ceux greffés de manière covalente, par exemple avec des thiols dans le cas des AuNPs. La deuxième stratégie assure une meilleure stabilité.

Selon la nature du polymère choisi, d'autres fonctions peuvent être assurées par les ligands. Comme mentionné précédemment, l'utilisation de PEG permet par exemple de réduire l'adsorption des protéines en surface des NPs, ce qui limite leur élimination par le système réticulo-endothélial.³⁵ Plus généralement, l'ajout de polymères en surface peut permettre d'améliorer la biocompatibilité des AuNPs.

Certains polymères offrent également des groupements fonctionnels qui peuvent permettre le greffage de différentes molécules d'intérêt, pour assurer un ciblage ou charger des agents thérapeutiques par exemple. Ils servent ainsi de support pour des fonctionnalisations additionnelles.

La grande variété des polymères permet en fait d'adapter sur mesure les propriétés recherchées pour la NP, offrant ainsi une large palette de fonctions biologiques. Le choix du polymère utilisé va donc être déterminant.

2. Les polymères couramment utilisés

Déjà évoqué à plusieurs reprises, le PEG est le polymère le plus utilisé pour recouvrir les nanoparticules de tous types, car il est biocompatible et permet une bonne stabilisation en phase aqueuse, ainsi qu'un temps de circulation prolongé dans le sang.¹²⁹ Dans le cas des AuNPs, il peut être utilisé pour recouvrir leur surface par simple adsorption ou bien par greffage covalent via des fonctions thiols.¹¹³

De nombreux autres polymères ont été utilisés comme ligands des AuNPs. Dans leur revue, Muddineti *et al.* en dressent une liste non exhaustive, qui illustre bien la variété des structures chimiques et des

propriétés (Figure I.11). On y trouve notamment de nombreux biopolymères, tels que le chitosan ou des dérivés de la cellulose, qui sont souvent utilisés pour leur caractère biocompatible.

Polymer	Nature
Heparin	Anionic, sulfated glycosaminoglycan, UV sensitive
Hyaluronic acid	Water soluble, nonsulfated glycosaminoglycan
Chitosan	Cationic, β -linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine hydrophilic
Dextran	Cationic, α -linked D-glucopyranosyl units, hydrophilic
Pullulan	Cationic, amphiphilic, maltotriose units, hydrophilic
Cellulose derivatives	$\beta(1 \rightarrow 4)$ linked D-glucose units
Guar gum	Cationic, galactomannan
Starch	Glucose units joined by glycosidic bonds
Gum arabic	Anionic, mixture of glycoproteins and polysaccharides
Maltose	Disaccharide formed from two units of glucose joined with an $\alpha(1 \rightarrow 4)$ bond
Xanthan gum	Anionic, repeated pentasaccharide, hydrophilic
Gelatin	From porcine skin, thermo stable
PSS	Anionic, capable of forming polyelectrolyte layer by layer assembly
PCL	Film formation by thermal pressing
PEG	Biocompatible, non-toxic
PEI	Cationic
DDT-PVAc and PTMP-PVAc	Multidentate thioether
PVCL	Thermo responsive
PDDA	Cationic, polyelectrolyte, Layer by layer assemble forming
Thiolate PVP	pH responsive
PDMA and PDMA based copolymers	pH responsive
PNIPAM	Thermo sensitive
PNIPAM-b-(PVPRD)	Thermo sensitive
ELP	Thermo sensitive
PS-b-PAA	Solvent responsive
PMOEGMA	Solvent responsive
PMEOMA	Solvent responsive

Figure I.11 - Polymères utilisés en surface des AuNPs ¹²⁸

3. Méthodes de synthèse

Pour obtenir des AuNPs greffées d'une couronne polymère, trois stratégies de synthèse sont possibles : *grafting to*, *grafting from* et synthèse directe (Figure I.12).¹²⁸

La méthode *grafting to* consiste à faire réagir des ligands polymères et des AuNPs tous deux synthétisés au préalable. Le greffage s'effectue par l'intermédiaire d'un groupement fonctionnel situé à l'extrémité des chaînes polymères, généralement un thiol. Il procède par échange de ligands avec celui utilisé lors de la synthèse des AuNPs : généralement du citrate, mais également du bromure de cetyltriméthylammonium dans le cas des nanobâtonnets.¹³⁰ La fiabilité de cette méthode d'échange de ligands reste sujette à débat, certains auteurs ayant montré qu'une partie importante des citrates reste en surface des NPs,^{131,132} tandis que d'autres ont au contraire prouvé l'absence de citrates après cette étape d'échange.¹³³ La chimie de surface n'est donc pas parfaitement contrôlée dans cette méthode. De plus, il a été montré que les citrates peuvent induire une toxicité au niveau des cellules,^{134,135} ce qui rend leur présence résiduelle problématique.

Pour la méthode *grafting from*, la polymérisation s'effectue directement à partir des AuNPs, préalablement fonctionnalisées par un amorceur. Cette stratégie ne nécessite pas d'échange de

ligands. La caractérisation de la couronne est cependant plus complexe, et des méthodes de dégreffage sont souvent utilisées pour déterminer les caractéristiques des ligands formés en surface.

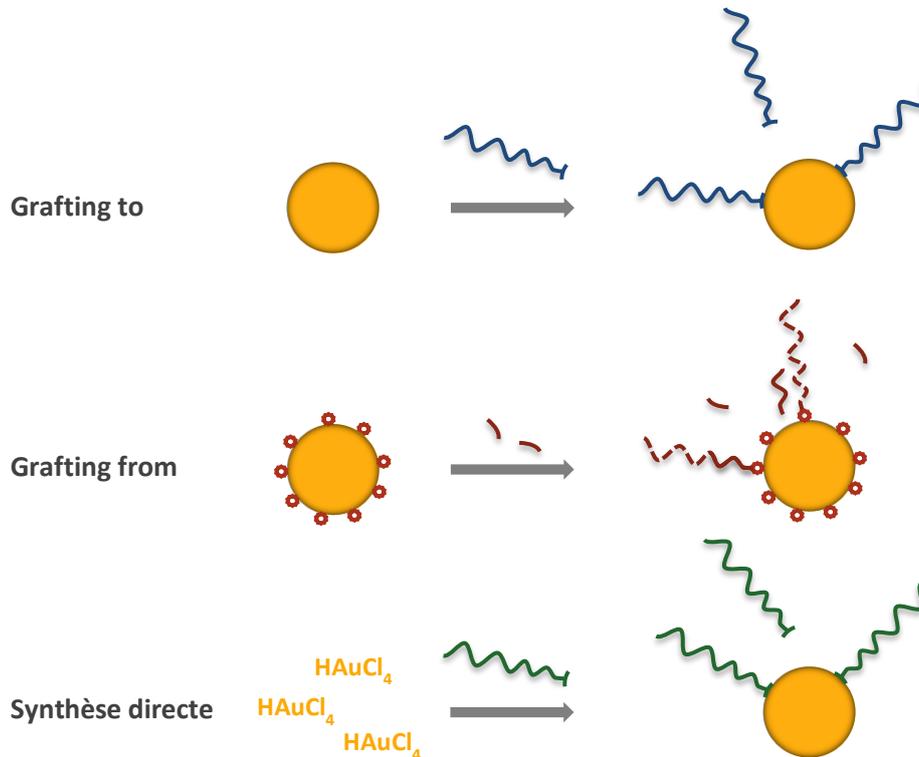


Figure 1.12 - Stratégies de synthèse de AuNPs greffées polymère

La troisième méthode consiste à synthétiser les AuNPs par réduction de sels d'or, directement en présence de ligands polymères fonctionnalisés qui jouent le rôle de stabilisants. Les AuNPs greffées polymères sont ainsi obtenues en une seule étape. Là encore, les fonctions contenant du soufre sont les plus utilisées pour fonctionnaliser l'extrémité des chaînes et permettre la formation de la liaison Au-S. Cette méthode assure une bonne maîtrise de la chimie de surface, tout en permettant une caractérisation approfondie des ligands polymères en amont de la synthèse des AuNPs. C'est cette méthode que nous avons choisie pour la préparation de nos objets, nous y reviendrons plus en détails dans le chapitre 2.

IV. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le contexte présenté ici a permis de mettre en évidence la difficulté de prédiction des comportements des NPs à visée médicale, aussi bien du point de vue général de leurs interactions avec le vivant que de celui, plus spécifique, de leurs propriétés de radiosensibilisation. Cette difficulté provient d'un manque de compréhension des mécanismes sous-jacents qui s'explique tant par la complexité des phénomènes que par une absence de cohérence entre les multiples études menées.

Ayant identifié ce manque dans la littérature, l'objectif principal de cette thèse était de mettre au point une stratégie pour déterminer, de manière fiable, l'impact des propriétés physico-chimiques des NPs sur leur comportement en milieu biologique, en particulier dans le cadre de la radiosensibilisation. Nous avons ainsi cherché à développer et étudier des nanoparticules modèles via une approche intégrée et rationalisée. Les nanoparticules d'or greffées d'une couronne polymère ont été choisies comme objets de référence pour leur grande stabilité et leur caractère modulable.

Nous avons tout d'abord constitué une librairie de nano-objets modèles présentant une diversité de propriétés physico-chimiques (charge, balance hydrophile/hydrophobe), grâce à l'utilisation d'une gamme de ligands polymères dont nous avons fait varier la masse molaire et la nature chimique. Afin d'exclure autant que possible les effets de taille et de forme, nous avons cherché dans le même temps à maintenir une unité de structure pour l'ensemble des NPs. La possibilité d'effectuer des greffages sur la couronne a également été explorée. Tous les objets ont été caractérisés de manière la plus exhaustive possible, notamment grâce à l'utilisation de techniques de diffusion des rayonnements.

Nous avons ensuite mis en place des protocoles permettant de caractériser le comportement de nos objets vis-à-vis de plusieurs modèles *in vitro* (cellulaires ou non). En exploitant les informations issues de la première partie de l'étude, nous avons pu étudier de manière systématique l'impact des propriétés physico-chimiques sur les interactions des NPs avec divers systèmes biologiques. L'effet des greffages effectués sur la couronne polymère a également été évalué.

Nous avons enfin exploré la possibilité d'utiliser ces objets modèles en radiosensibilisation. Une caractérisation approfondie du comportement des objets sous irradiation a, là encore, été menée. Certaines NPs ont été couplées à deux modalités d'irradiation pour tester leurs propriétés de radiosensibilisation.

Le manuscrit s'articule en trois chapitres qui correspondent au développement des trois axes présentés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng. Sci.* **23**, 22–36 (1960).
2. Taniguchi, N. On the Basic Concept of Nanotechnology. *Proc. Int. Conf. Prod. Eng.* 18–23 (1974).
3. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
4. *ISO/TS 80004-2:2015(fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 2: Nano-objets.* (Organisation Internationale de Normalisation, 2015).
5. Min, Y., Caster, J. M., Eblan, M. J. & Wang, A. Z. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chem. Rev.* **115**, 11147–11190 (2015).
6. Cancer | Organisation mondiale de la santé. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
7. Chan, W. C. W., Khademhosseini, A., Parak, W. & Weiss, P. S. Cancer: Nanoscience and Nanotechnology Approaches. *ACS Nano* **11**, 4375–4376 (2017).
8. Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release* **160**, 117–134 (2012).
9. Bazak, R., Hourri, M., Achy, S. E., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 769–784 (2015).
10. Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M. & Xia, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 12320–12364 (2014).
11. Riley, M. K. & Vermerris, W. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. *Nanomaterials* **7**, (2017).
12. Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K. & Tokatlian, T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chem. Rev.* **115**, 11109–11146 (2015).
13. Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A. & Kamrava, S. K. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J. Controlled Release* **235**, 205–221 (2016).
14. Shibu, E. S., Hamada, M., Murase, N. & Biju, V. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **15**, 53–72 (2013).
15. Cole, L. E., Ross, R. D., Tilley, J. M., Vargo-Gogola, T. & Roeder, R. K. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomed.* **10**, 321–341 (2015).
16. Estelrich, J., Sánchez-Martín, M. J. & Busquets, M. A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1727–1741 (2015).
17. Thakor, A. S., Jokerst, J. V., Ghanouni, P., Campbell, J. L., Mittra, E. & Gambhir, S. S. Clinically Approved Nanoparticle Imaging Agents. *J. Nucl. Med.* **57**, 1833–1837 (2016).
18. Chen, F., Ehlerding, E. B. & Cai, W. Theranostic Nanoparticles. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **55**, 1919–1922 (2014).
19. Popović, Z., Liu, W., Chauhan, V. P., Lee, J., Wong, C., Greytak, A. B., Insin, N., Nocera, D. G., Fukumura, D., Jain, R. K. & Bawendi, M. G. A Nanoparticle Size Series for In Vivo Fluorescence Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8649–8652 (2010).
20. Nichols, J. W. & Bae, Y. H. EPR: Evidence and fallacy. *J. Controlled Release* **190**, 451–464 (2014).
21. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Controlled Release* **244**, 108–121 (2016).

22. Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J. M. & Peer, D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
23. Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., Kelly, P. M., Åberg, C., Mahon, E. & Dawson, K. A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 137–143 (2013).
24. Hua, S., de Matos, M. B. C., Metselaar, J. M. & Storm, G. Current Trends and Challenges in the Clinical Translation of Nanoparticulate Nanomedicines: Pathways for Translational Development and Commercialization. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
25. Kim, Y.-H., Min, K. H., Wang, Z., Kim, J., Jacobson, O., Huang, P., Zhu, G., Liu, Y., Yung, B., Niu, G. & Chen, X. Development of Sialic Acid-coated Nanoparticles for Targeting Cancer and Efficient Evasion of the Immune System. *Theranostics* **7**, 962–973 (2017).
26. L. Moore, T., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M. & Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6287–6305 (2015).
27. L Moore, T. Polymer-Coated Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of Statins. *J. Nanomedicine Nanotechnol.* **05**, (2014).
28. Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T. & Radomski, M. W. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br. J. Pharmacol.* **146**, 882–893 (2005).
29. Ilinskaya, A. N. & Dobrovolskaia, M. A. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomed.* **8**, 969–981 (2013).
30. Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B., Novak, A., Wintersteiger, R. & Fröhlich, E. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology* **258**, 139–147 (2009).
31. Longmire, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomed.* **3**, 703–717 (2008).
32. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
33. Stylianopoulos, T. & Jain, R. K. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1893–1907 (2015).
34. Arvizo, R. R., Miranda, O. R., Moyano, D. F., Walden, C. A., Giri, K., Bhattacharya, R., Robertson, J. D., Rotello, V. M., Reid, J. M. & Mukherjee, P. Modulating Pharmacokinetics, Tumor Uptake and Biodistribution by Engineered Nanoparticles. *PLOS ONE* **6**, e24374 (2011).
35. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
36. Hamilton, A., Biganzoli, L., Coleman, R., Mauriac, L., Hennebert, P., Awada, A., Nooij, M., Beex, L., Piccart, M., Van Hoorebeeck, I., Bruning, P. & de Valeriola, D. EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx[®], Doxil[®]) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **13**, 910–918 (2002).
37. Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M. R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. & Kataoka, K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 815–823 (2011).
38. Shah, S., Liu, Y., Hu, W. & Gao, J. Modeling Particle Shape-Dependent Dynamics in Nanomedicine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 919–928 (2011).
39. Tan, J., Shah, S., Thomas, A., Ou-Yang, H. D. & Liu, Y. The influence of size, shape and vessel geometry on nanoparticle distribution. *Microfluid. Nanofluidics* **14**, 77–87 (2013).

40. Less, J. R., Posner, M. C., Boucher, Y., Borochoviz, D., Wolmark, N. & Jain, R. K. Interstitial Hypertension in Human Breast and Colorectal Tumors. *Cancer Res.* **52**, 6371–6374 (1992).
41. Baxter, L. T. & Jain, R. K. Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc. Res.* **37**, 77–104 (1989).
42. Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C. & Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **9**, 1909–1915 (2009).
43. Graff, B. A., Benjaminsen, I. C., Brurberg, K. G., Ruud, E. B. & Rofstad, E. K. Comparison of tumor blood perfusion assessed by dynamic contrast-enhanced MRI with tumor blood supply assessed by invasive imaging. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **21**, 272–281 (2005).
44. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406 (2012).
45. Nichols, J. W. & Bae, Y. H. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. *Nano Today* **7**, 606–618 (2012).
46. Dai, Q., Wilhelm, S., Ding, D., Syed, A. M., Sindhvani, S., Zhang, Y., Chen, Y. Y., MacMillan, P. & Chan, W. C. W. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. *ACS Nano* (2018).
47. Lund, T., Callaghan, M. F., Williams, P., Turmaine, M., Bachmann, C., Rademacher, T., Roitt, I. M. & Bayford, R. The influence of ligand organization on the rate of uptake of gold nanoparticles by colorectal cancer cells. *Biomaterials* **32**, 9776–9784 (2011).
48. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release* **145**, 182–195 (2010).
49. Cooper, G. M. Protein Sorting and Transport - The Endoplasmic Reticulum, Golgi Apparatus, and Lysosomes. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (2000).
50. Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A. & Xia, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett.* **9**, 1080–1084 (2009).
51. Gao, H., Shi, W. & Freund, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9469–9474 (2005).
52. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
53. Manu5. *A depiction of various types of endocytosis.* (2018).
54. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
55. Arbab, A. S., Wilson, L. B., Ashari, P., Jordan, E. K., Lewis, B. K. & Frank, J. A. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* 383–389 (2018).
56. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug. Chem.* **30**, 263–272 (2019).
57. Štefančíková, L., Porcel, E., Eustache, P., Li, S., Salado, D., Marco, S., Guerquin-Kern, J.-L., Réfrégiers, M., Tillement, O., Lux, F. & Lacombe, S. Cell localisation of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells. *Cancer Nanotechnol.* **5**, 6 (2014).
58. Li, Q., Huang, C., Liu, L., Hu, R. & Qu, J. Effect of Surface Coating of Gold Nanoparticles on Cytotoxicity and Cell Cycle Progression. *Nanomaterials* **8**, 1063 (2018).

59. ELAmrawy, F., Othman, A. A., Adkins, C., Helmy, A. & Nounou, M. I. Tailored nanocarriers and bioconjugates for combating glioblastoma and other brain tumors. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2**, 112 (2016).
60. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer* **104**, 1129–1137 (2005).
61. Radiation Therapy to treat Cancer. *National Cancer Institute* <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/radiation-fact-sheet>.
62. Maxon, H. R., Englaro, E. E., Thomas, S. R., Hertzberg, V. S., Hinnefeld, J. D., Chen, L. S., Smith, H., Cummings, D. & Aden, M. D. Radioiodine-131 therapy for well-differentiated thyroid cancer--a quantitative radiation dosimetric approach: outcome and validation in 85 patients. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **33**, 1132–1136 (1992).
63. Wilson, R. R. Radiological Use of Fast Protons. *Radiology* **47**, 487–491 (1946).
64. Tobias, C. A., Lawrence, J. H., Born, J. L., McCombs, R. K., Roberts, J. E., Anger, H. O., Low-Beer, B. V. A. & Huggins, C. B. Pituitary Irradiation with High-Energy Proton Beams A Preliminary Report. *Cancer Res.* **18**, 121–134 (1958).
65. Newhauser, W. D. & Zhang, R. The physics of proton therapy. *Phys. Med. Biol.* **60**, R155–R209 (2015).
66. Proton Therapy System. *Sumitomo Heavy Industries, Ltd.* <http://www.shi.co.jp/quantum/eng/product/proton/proton.html>.
67. *Protonthérapie, indications et capacité de traitement.* (Institut National du Cancer, 2016).
68. Lievens, Y. & Pijls-Johannesma, M. Health Economic Controversy and Cost-Effectiveness of Proton Therapy. *Semin. Radiat. Oncol.* **23**, 134–141 (2013).
69. *Basic clinical radiobiology.* (Hodder Arnold, 2009).
70. Adams, G. E. & Jameson, D. G. Time effects in molecular radiation Biology. *Radiat. Environ. Biophys.* **17**, 95–113 (1980).
71. Chevalier, F., Hamdi, D. H., Saintigny, Y. & Lefaix, J.-L. Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **763**, 280–293 (2015).
72. Effets secondaires - Radiothérapie. *Institut National du Cancer* <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Radiotherapie/Effets-secondaires>.
73. Tang, L. *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **37**, (2018).
74. Song, G., Liang, C., Yi, X., Zhao, Q., Cheng, L., Yang, K. & Liu, Z. Perfluorocarbon-Loaded Hollow Bi₂Se₃ Nanoparticles for Timely Supply of Oxygen under Near-Infrared Light to Enhance the Radiotherapy of Cancer. *Adv. Mater.* **28**, 2716–2723 (2016).
75. Biau, J., Devun, F., Jdey, W., Kotula, E., Quanz, M., Chautard, E., Sayarath, M., Sun, J.-S., Verrelle, P. & Dutreix, M. A Preclinical Study Combining the DNA Repair Inhibitor Dbait with Radiotherapy for the Treatment of Melanoma. *Neoplasia* **16**, 835–844 (2014).
76. Lawrence, T. S., Blackstock, A. W. & McGinn, C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin. Radiat. Oncol.* **13**, 13–21 (2003).
77. Kobayashi, K., Usami, N., Porcel, E., Lacombe, S. & Le Sech, C. Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **704**, 123–131 (2010).
78. Kuncic, Z. & Lacombe, S. Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment. *Phys. Med. Biol.* **63**, 02TR01 (2018).

79. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* **49**, N309 (2004).
80. T. Butterworth, K., J. McMahon, S., J. Currell, F. & M. Prise, K. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* **4**, 4830–4838 (2012).
81. Haume, K., Rosa, S., Grellet, S., Śmiątek, M. A., Butterworth, K. T., Solov'yov, A. V., Prise, K. M., Golding, J. & Mason, N. J. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnol.* **7**, 8 (2016).
82. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 2 (2017).
83. Her, S., Jaffray, D. A. & Allen, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **109**, 84–101 (2017).
84. Mignot, A. *et al.* A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications. *Chem. – Eur. J.* **19**, 6122–6136 (2013).
85. Lux, F., Sancey, L., Bianchi, A., Crémillieux, Y., Roux, S. & Tillement, O. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomed.* **10**, 1801–1815 (2015).
86. Le Duc, G., Miladi, I., Alric, C., Mowat, P., Bräuer-Krisch, E., Bouchet, A., Khalil, E., Billotey, C., Janier, M., Lux, F., Epicier, T., Perriat, P., Roux, S. & Tillement, O. Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 9566–9574 (2011).
87. Miladi, I. *et al.* The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small* **10**, 1116–1124 (2014).
88. Laurent, G. *et al.* Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization. *Nanoscale* **8**, 12054–12065 (2016).
89. Sancey, L. *et al.* The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* **87**, 20140134 (2014).
90. Maggiorella, L., Barouch, G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch, E., Bourhis, J., Borghi, E. & Levy, L. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol.* **8**, 1167–1181 (2012).
91. Choi, G.-H., Seo, S.-J., Kim, K.-H., Kim, H.-T., Park, S.-H., Lim, J.-H. & Kim, J.-K. Photon activated therapy (PAT) using monochromatic Synchrotron x-rays and iron oxide nanoparticles in a mouse tumor model: feasibility study of PAT for the treatment of superficial malignancy. *Radiat. Oncol.* **7**, 184 (2012).
92. Kim, J.-K., Seo, S.-J., Kim, H.-T., Kim, K.-H., Chung, M.-H., Kim, K.-R. & Ye, S.-J. Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* **57**, 8309 (2012).
93. Liu, P., Jin, H., Guo, Z., Ma, J., Zhao, J., Li, D., Wu, H. & Gu, N. Silver nanoparticles outperform gold nanoparticles in radiosensitizing U251 cells in vitro and in an intracranial mouse model of glioma. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 5003–5014 (2016).
94. Porcel, E., Liehn, S., Remita, H., Usami, N., Kobayashi, K., Furusawa, Y., Sech, C. L. & Lacombe, S. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **21**, 085103 (2010).
95. Briggs, A., Corde, S., Oktaria, S., Brown, R., Rosenfeld, A., Lerch, M., Konstantinov, K. & Tehei, M. Cerium oxide nanoparticles: influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1098–1105 (2013).
96. Cruz, L. Y., Wang, D. & Liu, J. Biosynthesis of selenium nanoparticles, characterization and X-ray induced radiotherapy for the treatment of lung cancer with interstitial lung disease. *J. Photochem. Photobiol. B* (2018).

97. Deng, J., Xu, S., Hu, W., Xun, X., Zheng, L. & Su, M. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. *Biomaterials* **154**, 24–33 (2018).
98. Grall, R., Girard, H., Saad, L., Petit, T., Gesset, C., Combis-Schlumberger, M., Paget, V., Delic, J., Arnault, J.-C. & Chevillard, S. Impairing the radioresistance of cancer cells by hydrogenated nanodiamonds. *Biomaterials* **61**, 290–298 (2015).
99. NH TherAguix, a clinical stage company. <http://nhtheraguix.com/>.
100. News | Nanobiotix. https://www.nanobiotix.com/_fr/news/.
101. Cho, S. H. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys. Med. Biol.* **50**, N163 (2005).
102. Retif, P., Pinel, S., Toussaint, M., Frochot, C., Chouikrat, R., Bastogne, T. & Barberi-Heyob, M. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* **5**, 1030–1044 (2015).
103. Jain, S., Coulter, J. A., Hounsell, A. R., Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Dickson, G. R., Prise, K. M., Currell, F. J., O'Sullivan, J. M. & Hirst, D. G. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **79**, 531–539 (2011).
104. McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O'Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G. & Currell, F. J. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother. Oncol.* **100**, 412–416 (2011).
105. McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O'Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G. & Currell, F. J. Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci. Rep.* **1**, 18 (2011).
106. Verkhovtsev, A., Korol, A. & Solov'yov, A. Electron production by noble metal nanoparticles in collision processes with photons and fast ions. *J. Phys. Conf. Ser.* **635**, 112091 (2015).
107. Verkhovtsev, A. V., Korol, A. V. & Solov'yov, A. V. Revealing the Mechanism of the Low-Energy Electron Yield Enhancement from Sensitizing Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **114**, 063401 (2015).
108. Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P. & Jaffray, D. A. Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiat. Res.* **173**, 719–728 (2010).
109. Geng, F., Song, K., Xing, J. Z., Yuan, C., Yan, S., Yang, Q., Chen, J. & Kong, B. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology* **22**, 285101 (2011).
110. Lin, Y., McMahon, S. J., Scarpelli, M., Paganetti, H. & Schuemann, J. Comparing gold nanoparticle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation. *Phys. Med. Biol.* **59**, 7675 (2014).
111. Cheng, N. N., Starkewolf, Z., Davidson, R. A., Sharmah, A., Lee, C., Lien, J. & Guo, T. Chemical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1950–1953 (2012).
112. Sicard-Roselli, C., Brun, E., Gilles, M., Baldacchino, G., Kelsey, C., McQuaid, H., Polin, C., Wardlow, N. & Currell, F. A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions. *Small* **10**, 3338–3346 (2014).
113. Gilles, M., Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Quantification of hydroxyl radicals and solvated electrons produced by irradiated gold nanoparticles suggests a crucial role of interfacial water. *J. Colloid Interface Sci.* **525**, 31–38 (2018).

114. Khalil, T. T., Bazzi, R., Roux, S. & Fromm, M. The contribution of hydrogen peroxide to the radiosensitizing effect of gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **175**, 606–613 (2019).
115. Lien, J., Su, M. & Guo, T. Identification of Individual Reaction Steps in Complex Radical Reactions Involving Gold Nanoparticles. *ChemPhysChem* **19**, 3328–3333 (2018).
116. Moreau, S., Fenart, M. & Renault, J. P. Radiolysis of water in the vicinity of passive surfaces. *Corros. Sci.* **83**, 255–260 (2014).
117. Gilles, M., Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **123**, 770–777 (2014).
118. Haume, K., de Vera, P., Verkhovtsev, A., Surdutovich, E., Mason, N. J. & Solov'yov, A. V. Transport of secondary electrons through coatings of ion-irradiated metallic nanoparticles. *Eur. Phys. J. D* **72**, (2018).
119. Zheng, Y., Hunting, D. J., Ayotte, P. & Sanche, L. Radiosensitization of DNA by Gold Nanoparticles Irradiated with High-Energy Electrons. *Radiat. Res.* **169**, 19–27 (2008).
120. Yao, X., Huang, C., Chen, X., Zheng, Y. & Sanche, L. Chemical Radiosensitivity of DNA Induced by Gold Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **11**, 478–485 (2015).
121. Kong, T., Zeng, J., Wang, X., Yang, X., Yang, J., McQuarrie, S., McEwan, A., Roa, W., Chen, J. & Xing, J. Z. Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles. *Small* **4**, 1537–1543 (2008).
122. Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Actual questions raised by nanoparticle radiosensitization. *Radiat. Phys. Chem.* **128**, 134–142 (2016).
123. Taggart, L. E., McMahon, S. J., Currell, F. J., Prise, K. M. & Butterworth, K. T. The role of mitochondrial function in gold nanoparticle mediated radiosensitisation. *Cancer Nanotechnol.* **5**, 5 (2014).
124. Delorme, R., Taupin, F., Flaender, M., Ravanat, J.-L., Champion, C., Agelou, M. & Elleaume, H. Comparison of gadolinium nanoparticles and molecular contrast agents for radiation therapy-enhancement. *Med. Phys.* **44**, 5949–5960 (2017).
125. Retif, P., Reinhard, A., Paquot, H., Jouan-Hureau, V., Chateau, A., Sancey, L., Barberi-Heyob, M., Pinel, S. & Bastogne, T. Monte Carlo simulations guided by imaging to predict the in vitro ranking of radiosensitizing nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 11**, 6169–6179 (2016).
126. Jia, Y.-P., Ma, B.-Y., Wei, X.-W. & Qian, Z.-Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* **28**, 691–702 (2017).
127. Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J. & El-Sayed, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2740–2779 (2012).
128. Muddineti, O. S., Ghosh, B. & Biswas, S. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy. *Int. J. Pharm.* **484**, 252–267 (2015).
129. Cruje, C. & Chithrani, D. B. Polyethylene Glycol Functionalized Nanoparticles for Improved Cancer Treatment. *Rev. Nanosci. Nanotechnol.* **3**, 20–30 (2014).
130. Hotchkiss, J. W., Lowe, A. B. & Boyes, S. G. Surface Modification of Gold Nanorods with Polymers Synthesized by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Chem. Mater.* **19**, 6–13 (2007).
131. Park, J.-W. & Shumaker-Parry, J. S. Strong Resistance of Citrate Anions on Metal Nanoparticles to Desorption under Thiol Functionalization. *ACS Nano* **9**, 1665–1682 (2015).

132. Dinkel, R., Jakobi, J., Ziefuß, A. R., Barcikowski, S., Braunschweig, B. & Peukert, W. Role of Citrate and NaBr at the Surface of Colloidal Gold Nanoparticles during Functionalization. *J. Phys. Chem. C* (2018).
133. Perera, G. S., Athukorale, S. A., Perez, F., Pittman, C. U. & Zhang, D. Facile displacement of citrate residues from gold nanoparticle surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **511**, 335–343 (2018).
134. Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, M. I., Pohl, C., Baldi, G., Unger, R. E. & Kirkpatrick, C. J. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part. Fibre Toxicol.* **6**, 18 (2009).
135. Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M. I., Unger, R. E., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P.-O. & Kirkpatrick, C. J. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 23 (2012).

Chapitre 2. Synthèse des nanoparticules d'or greffées polymères

TABLE DES MATIÈRES

I. Stratégie de synthèse	47
A. Méthode de synthèse des polymères	47
1. Polymérisation radicalaire contrôlée	47
2. Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP).....	49
3. Synthèse de polyméthacrylates par ATRP	49
4. Choix des monomères	50
B. Méthode de synthèse des nanoparticules d'or	53
II. Synthèse et caractérisation des ligands polymères	55
A. Synthèse de l'amorceur	55
B. Synthèse par ATRP des ligands méthacrylates	56
1. Protocole général	56
2. Variation de la longueur de la couronne PMAA.....	57
3. Variation de la nature de la couronne	59
III. Elaboration des nanoparticules d'or greffées polymères	61
A. Synthèse et purification.....	61
B. Caractérisation du cœur d'or.....	64
1. Caractérisation par ICP-MS	65
2. Caractérisation par TEM	65
3. Caractérisation par SAXS.....	68
C. Etude en diffusion de neutrons aux petits angles.....	71
IV. Greffages post-synthèse	79
A. Association avec la chimiothérapie : greffage de la doxorubicine.....	79

B.	Greffage de protéines : BSA et lactoferrine.....	83
1.	La BSA comme protéine modèle	83
2.	La lactoferrine pour cibler le cerveau.....	89
3.	Analyse en diffusion de neutrons.....	91
V.	Conclusions et perspectives.....	93
	Bibliographie.....	98

Le but de ce chapitre est de décrire les procédés de synthèse des nano-objets utilisés dans le projet, ainsi que les techniques employées pour les caractériser de la manière la plus complète possible. Une première partie introductive exposera la stratégie de synthèse. Les deux principales étapes de synthèse et les caractérisations qui les accompagnent seront ensuite abordées successivement : la synthèse des ligands polymères, suivie de la synthèse des nanoparticules d'or. Une dernière partie s'intéressera aux greffages post-synthèse d'un agent de chimiothérapie et de protéines.

I. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

Avant d'aborder les aspects expérimentaux de la synthèse des nanoparticules greffées polymères, il semble nécessaire d'explicitier la stratégie adoptée, tant pour la synthèse des polymères que pour celle des nanoparticules d'or. Cette première partie va donc constituer une introduction au chapitre en détaillant et justifiant les choix effectués en termes de méthodologie de synthèse.

Il convient également de rappeler en préambule de ce chapitre que cette thèse se situe dans la continuité des travaux menés par Aurélie Paquirissamy,¹ et que cette stratégie de synthèse avait été en partie développée au cours de sa thèse.

A. MÉTHODE DE SYNTHÈSE DES POLYMÈRES

Dans notre étude, les polymères choisis sont des polyméthacrylates qui sont synthétisés en amont de la synthèse des nanoparticules, par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atomes (*Atom Transfer Radical Polymerization* en anglais, ou ATRP). Ce choix d'une polymérisation radicalaire contrôlée permet d'obtenir des chaînes présentant une faible polymolécularité, un paramètre primordial dans l'optique de synthétiser des nano-objets bien définis. Nous allons rappeler le principe de la polymérisation contrôlée dans un premier temps, avant de détailler celui de l'ATRP, puis d'aborder le cas spécifique des méthacrylates, et enfin d'expliquer le choix des monomères utilisés dans ce projet.

1. Polymérisation radicalaire contrôlée

La polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) est dérivée de la polymérisation radicalaire conventionnelle, qui présente l'avantage d'être facilement mise en œuvre, et ce pour une grande variété de monomères, mais qui produit des chaînes de polydispersité importante, sans contrôle de leur taille ni de leur structure. Cette absence de contrôle s'explique par un trop grand nombre de réactions de transferts et de terminaisons irréversibles. Pour améliorer ce point, une version contrôlée de cette polymérisation a été développée à partir des années 1993-1994 par différentes équipes.^{2,3} Elle repose sur un équilibre dynamique entre une faible concentration d'espèces radicalaires actives

et une grande quantité d'espèces dites « dormantes », réactivables. Elle permet de conserver les avantages de la polymérisation radicalaire (application à une grande variété de monomères, large gamme de température et de solvants utilisables), tout en apportant les avantages d'une polymérisation vivante, c'est-à-dire une polymérisation caractérisée par une propagation continue, sans réactions de transfert ni de terminaison.⁴ Dans le cas de la polymérisation radicalaire, on la qualifie de « contrôlée » plutôt que de « vivante », car des réactions de terminaison et de transfert subsistent, mais en quantité très limitée.

Ainsi, la PRC permet d'obtenir des chaînes de masse molaire contrôlée, avec un indice de polydispersité faible. Trois critères doivent être remplis pour attester du contrôle de la polymérisation : ⁴

- L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ est linéaire en fonction du temps (où $[M]$ est la concentration en monomère au temps t et $[M]_0$ la concentration initiale).
- La masse molaire du polymère (M_n) évolue linéairement avec la conversion. Sa variation doit suivre une courbe théorique définie par l'équation suivante :

$$M_n = DP_n * M_{mono} = ([M]_0 - [M]) / [A]_0 \quad (II.1)$$

avec M_{mono} la masse molaire du monomère, $[A]_0$ la concentration initiale en amorceur et DP_n le degré de polymérisation.

- L'indice de polydispersité I_p (M_w/M_n) décroît quand la conversion augmente. Il doit tendre vers une distribution de Poisson ($I_p \approx 1 + 1/DP_n$).

Il existe trois techniques principales de PRC : la RAFT (*Reversible-Addition-Fragmentation chain Transfer*), la NMP (*Nitroxide Mediated Polymerization*) et l'ATRP (*Atom Transfer Radical Polymerization*). Elles se distinguent par leur méthode de désactivation des chaînes dans la réaction d'équilibre : dans le cas de la NMP et de l'ATRP, un agent de terminaison (nitroxide pour la première, halogène pour la seconde) est utilisé pour former une liaison covalente réversible avec les radicaux propagateurs, tandis que la RAFT, elle, est caractérisée par un mécanisme de transfert de chaînes par addition-fragmentation grâce à l'utilisation d'un agent de transfert.

Dans notre étude, c'est la méthode de l'ATRP qui a été utilisée. En effet, des ligands polymères polyméthacrylates avaient déjà été synthétisés au laboratoire via cette technique, produisant de bons résultats : faibles indices de polydispersité, synthèses reproductibles de AuNPs greffées avec ces ligands, faible cytotoxicité des NPs résultantes.¹ L'objectif ici était de s'assurer de la reproductibilité de cette synthèse pour des conditions identiques, et de la décliner pour plusieurs natures de polyméthacrylates. Le mécanisme et la mise en œuvre de cette technique de polymérisation vont donc être rappelés dans le paragraphe suivant.

2. Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)

L'ATRP est la technique la plus utilisée en PRC. Elle a initialement été développée par les équipes de Matyjaszewski et de Sawamoto.^{5,6} Son principe repose sur une succession de réactions réversibles d'oxydo-réduction entre une espèce dormante halogénée (P_n-X) et un catalyseur métallique (M_t^n) chélaté (Figure II.1). L'espèce active formée durant cette réaction (P_n^\bullet) correspond à une chaîne polymère en croissance. Comme l'équilibre de cette réaction est fortement déplacé vers la formation de l'espèce dormante (désactivation), la concentration en espèces radicalaires actives reste faible, assurant ainsi le contrôle de la polymérisation.⁷

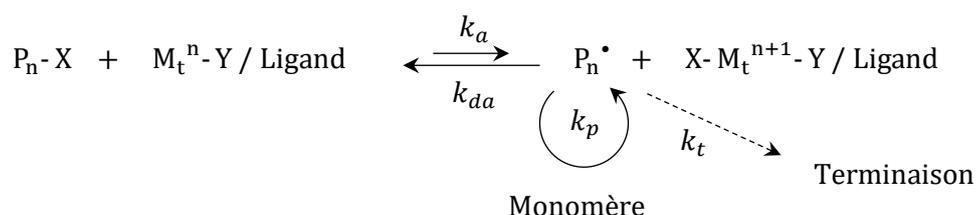


Figure II.1 - Mécanisme réactionnel de l'ATRP⁴

Les différents paramètres de la réaction se révèlent déterminants pour obtenir un bon contrôle de la polymérisation : la nature du métal de transition, du ligand et de l'amorceur, leurs proportions respectives vis-à-vis du monomère, ou encore le solvant et la température de réaction. L'impact de ces différents facteurs a été décrit par Matyjaszewski *et al.* en 2001.⁸ Le catalyseur le plus répandu est le cuivre (I), même si d'autres métaux ont également été proposés. Cela s'explique par son faible coût et sa compatibilité avec de nombreux solvants et monomères. Une large gamme de ligands peut être utilisée pour complexer le cuivre, principalement des composés azotés. On peut citer entre autres la bipyridine ou la pentaméthyl-diéthylène triamine (PMDETA).

La technique de l'ATRP est applicable pour une large gamme de monomères, dont les méthacrylates, et se distingue par la disponibilité commerciale, à bas coût, de ses réactifs. Cependant, son inconvénient majeur réside dans la difficulté à éliminer la totalité du complexe de cuivre. Cet aspect est primordial dans une perspective d'applications biologiques car le cuivre peut induire une certaine toxicité. Une attention toute particulière sera donc portée à la purification de nos polymères.

3. Synthèse de polyméthacrylates par ATRP

La polymérisation des méthacrylates par ATRP est bien connue, elle a déjà été décrite de nombreuses fois dans la littérature. Initialement catalysée par des complexes de ruthénium, l'ATRP du méthacrylate de méthyle (MMA) a montré de bons résultats de contrôle de la polymérisation, mais avec une limitation en termes de masses molaires atteintes et de vitesse de réaction (20-30 heures pour atteindre 80% de conversion).⁶ La méthode a ensuite été améliorée par l'équipe de Matyjaszewski, en

remplaçant le ruthénium par du bromure de cuivre complexé par de la bipyridine.⁹ La possibilité d'utiliser des systèmes catalytiques basés sur les halogénures de cuivre a ensuite été montrée pour une large gamme de monomères méthacrylates : méthacrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEMA),¹⁰ méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA),¹¹ méthacrylate de n-butyle (MAnBu),^{12,13} méthacrylates d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA) et de poly(éthylène glycol) (PEGMA).¹⁴ Une grande variété d'halogénures de cuivre, de ligands, d'amorceurs, de solvants et de conditions expérimentales a été testée pour effectuer la polymérisation des différents monomères.

La synthèse directe de l'acide polyméthacrylique (MAA), elle, n'est pas réalisable par ATRP, car les acides carboxyliques du monomère peuvent complexer le métal de transition, ce qui diminue sa capacité de désactivation des chaînes, l'empêchant alors d'assurer ses fonctions catalytiques. Deux stratégies ont été développées pour obtenir du PMAA par ATRP : polymérisation d'un acide méthacrylique protégé,¹⁵ ou polymérisation du méthacrylate de sodium.¹⁶ Cette dernière stratégie présente toutefois une conversion lente et se trouve limitée à des petites masses molaires (au-delà d'une valeur visée de 10 kg/mol, les indices de polydispersité augmentent fortement). Pour la première stratégie, les monomères utilisés sont le méthacrylate de *tert*-butyle (MAtBu) et le méthacrylate de benzyle, tous deux de bons groupes partants pouvant générer le MAA. Le *tert*-butyle, en particulier, est facilement hydrolysable en milieu acide^{17,18} ou pyrolysable à température modérée (200°C).¹⁹

4. Choix des monomères

Concernant le choix des monomères, l'objectif est de constituer une bibliothèque de ligands polymères présentant des propriétés physico-chimiques différentes, afin d'étudier par la suite l'influence de celles-ci sur les performances des nanoparticules. L'utilisation des méthacrylates est donc tout à fait appropriée, car on peut facilement synthétiser des homopolymères et copolymères à partir des différents monomères dérivés du MAA, de manière à faire varier les propriétés des ligands. Sachant que les objets sont destinés à une application médicale, il est également nécessaire d'utiliser une gamme de polymères hydrosolubles et peu toxiques. Ces deux paramètres ont donc fait partie des critères pour choisir les proportions des copolymères, car tous les méthacrylates n'ont pas les mêmes propriétés en termes de solubilité en milieu aqueux et de biocompatibilité, comme nous le verrons ci-après.

Dans le cadre de cette thèse, deux paramètres ont pu être déclinés : la taille des ligands polymères (dans le cas du PMAA), ainsi que leur nature, par combinaison des monomères méthacrylates suivants : acide méthacrylique (MAA), méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA), méthacrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEMA), méthacrylate de n-butyle (MAnBu) et méthacrylate de polyéthylène glycol (PEGMA). Leurs structures sont visibles sur la Figure II.2, et leurs propriétés détaillées dans les

paragraphes qui suivent. Chacun de ces monomères a été choisi pour les propriétés qu'il pouvait apporter à la couronne polymère.

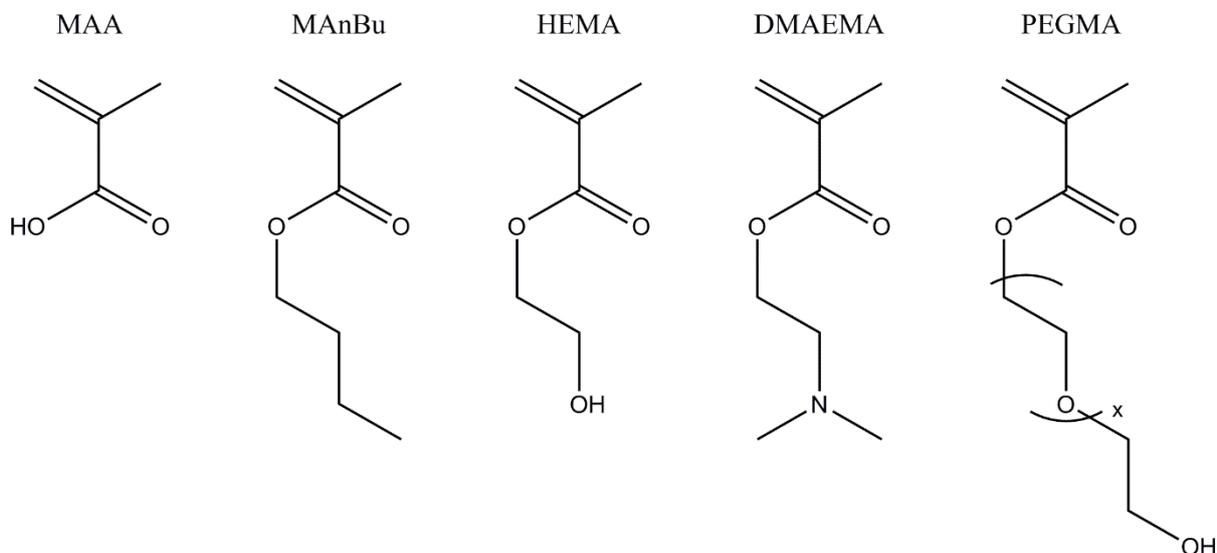


Figure II.2 - Monomères méthacrylates utilisés dans le cadre de ce travail, de gauche à droite : acide méthacrylique (MAA), méthacrylate de n-butyle (MAnBu), méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA), méthacrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEMA) et méthacrylate de polyéthylène glycol (PEGMA)

Le PMAA est un polymère biocompatible fréquemment utilisé pour la délivrance de médicaments. Il est par exemple déjà commercialisé comme excipient pharmaceutique sous le nom d'Eudragit®. La gamme Eudragit® correspond à des copolymères de méthacrylates et/ou acrylates qui sont utilisés pour assurer un relargage de médicament ciblé et/ou dont la cinétique est maîtrisée.^{20,21} Outre le PMAA, le PDMAEMA et le PMAnBu font également partie des polymères utilisés dans cette gamme d'excipients. Le PMAA a aussi été utilisé comme couronne polymère pour stabiliser et assurer l'hydrosolubilité de nanoparticules métalliques ou de *quantum dots*.²²⁻²⁴ Il a également été exploité dans la synthèse d'hydrogels et de nanoparticules, polymères ou hybrides, pour la délivrance d'agents thérapeutiques variés, tels que l'insuline, la doxorubicine, ou le cisplatine (les deux derniers étant des agents de chimiothérapie).²⁵⁻³² Sa sensibilité au pH (densité de charge qui augmente quand le pH augmente, avec un pKa de 5,5³³) a notamment été utilisée à plusieurs reprises.^{30,34} De manière générale, il est souvent exploité pour ses fonctions acides carboxyliques, sur lesquelles des greffages peuvent être effectués.^{23,28,31,35} D'autre part, il a été montré que ce polymère favorise l'internalisation de nanoparticules dans les cellules.³⁶ Il a donc fait figure de premier choix, et les résultats obtenus au laboratoire ont confirmé ce choix.

Le PHEMA est un polymère considéré comme biocompatible, très peu toxique.³⁷ Il est hydrophile mais son hydrosolubilité dépend de sa masse molaire. En effet, seuls les polymères de degré de polymérisation inférieur à 20 sont solubles dans l'eau ; au-delà, la solubilité n'est que partielle et un gonflement du polymère est observé.³⁸ Dans certaines conditions, il peut également adopter un

comportement thermosensible.³⁸ Le PHEMA est déjà utilisé en tant qu'hydrogel pour différentes applications médicales, commercialisées ou non, telles que les lentilles de contact,³⁹⁻⁴¹ les résines de médecine dentaire,⁴² la délivrance de médicaments,^{43,44} les pansements⁴⁵ ou les implants pour l'ingénierie tissulaire.^{46,47} Il est souvent utilisé dans des copolymères à blocs, pour assurer le bloc hydrophile.^{48,49} Dans le cadre de notre projet, en le copolymérisant avec le PMAA, il peut permettre de moduler sa charge négative, tout en conservant les propriétés hydrophiles et biocompatibles de la couronne. Sa fonction hydroxyle fournit en outre un point d'accroche sur lequel effectuer un greffage ultérieur.

Le PDMAEMA est fréquemment utilisé pour sa propriété de sensibilité au pH (densité de charge qui augmente quand le pH diminue), en particulier pour la délivrance de médicaments, sous la forme d'hydrogels, de micelles polymères ou de couronne polymère sur NPs métalliques.⁵⁰⁻⁵² Il possède également une très bonne capacité d'internalisation dans les cellules, ce qui explique qu'il soit beaucoup étudié dans le cadre de la transfection de gènes.⁵³⁻⁵⁶ Son caractère partiellement chargé à pH physiologique (pKa autour de 7 - 7,5⁵⁷) lui permet en effet de former des nanocomplexes en condensant l'ADN via des interactions électrostatiques, de manière à former des particules de taille nanométrique.⁵⁶ Cette propriété de pénétration des cellules est très intéressante pour notre étude, de même que la présence de charges positives, pour comparaison au PMAA chargé négativement. Cependant, le PDMAEMA peut également se révéler toxique pour les cellules, et il sera nécessaire de trouver un équilibre entre capacité de transfection et toxicité, en jouant sur la masse molaire des chaînes ou en le copolymérisant.

Le PMAAnBu a lui aussi été exploité dans le cadre d'applications médicales, pour recouvrir les stents par exemple,^{58,59} en tant que composant de ciments osseux⁶⁰ et de matériaux pour l'ingénierie tissulaire,⁶¹ ou plus généralement pour constituer la partie hydrophobe de micelles ou hydrogels polymères utilisés pour améliorer la délivrance de médicaments hydrophobes.⁶²⁻⁶⁶ Il a été choisi dans ce projet pour apporter un caractère plus hydrophobe aux polymères synthétisés, dans le but d'étudier l'impact de la balance hydrophobicité/hydrophilicité sur l'efficacité des NPs. L'hydrophobicité pourrait permettre d'améliorer les interactions des NPs avec les membranes cellulaires.⁶⁷ Cependant, dans le cas du PMAAnBu, il a été montré que ces interactions pouvaient induire une cytotoxicité.⁶⁸ Là encore, un équilibre devra être trouvé pour maintenir une toxicité faible.

Le PEGMA a lui aussi été exploité dans divers systèmes particuliers, en particulier pour ses propriétés thermosensibles.⁶⁹⁻⁷¹ Surtout, il se rapproche du polymère référence utilisé dans le domaine des nanoparticules, le polyéthylène glycol (PEG),⁷² et permet de comparer une structure de PEG linéaire avec une structure à branches. Il a déjà été démontré dans la littérature que le PEGMA est peu toxique

et permet, tout comme le PEG, de limiter l'association non spécifique de nanoparticules avec les protéines ou certaines cellules, en particulier celles du sang.⁷³⁻⁷⁵ Cette propriété est intéressante à exploiter pour assurer la stabilité des nanoparticules en milieu biologique, en particulier dans une perspective d'injection intraveineuse des nanoparticules.

Ces cinq monomères ont donc été choisis pour synthétiser les polymères destinés à former la couronne greffée sur les NPs. La gamme de ligands polymères obtenue à partir de l'ensemble de ces monomères a ensuite été utilisée pour synthétiser les nanoparticules d'or suivant une méthode directe décrite dans la partie qui suit.

B. MÉTHODE DE SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR

La synthèse de nanoparticules d'or greffées de chaînes polyméthacrylates a déjà été rapportée dans la littérature. Les trois méthodes décrites dans le chapitre 1 (§ III.B.3) ont été étudiées : *grafting to*, *grafting from*, et synthèse directe. Différents méthacrylates ont été utilisés pour former des homopolymères ou des copolymères statistiques ou à blocs. On peut citer entre autres le méthacrylate de méthyle (MMA), le MAA, le DMAEMA et le HEMA.

En *grafting to*, le greffage se fait souvent par l'intermédiaire d'un atome de soufre provenant soit des fonctions dithioesters naturellement présentes à l'extrémité des chaînes polymères synthétisées par RAFT, soit des fonctions thiols résultant de la réduction de ces mêmes dithioesters.^{23,76} Le greffage procède par échange de ligands avec celui utilisé lors de la synthèse des AuNPs. Comme évoqué dans le Chapitre 1, la fiabilité de cet échange de ligands est sujette à débat, ce qui peut être problématique considérant la toxicité des citrates résiduels.

En *grafting from*, aucun échange de ligands n'est effectué, puisque la polymérisation est réalisée directement à la surface des NPs. La technique de l'ATRP est souvent privilégiée par rapport aux autres méthodes de polymérisation. Une monocouche auto-assemblée (*Self-Assembled Monolayer* en anglais, ou SAM) d'amorceur est créée dans un premier temps à la surface des AuNPs (liaison Au-S à nouveau), puis l'ATRP est effectuée à partir de cet amorceur greffé.^{77,78} Les SAMs étant peu stables en solvant organique à température élevée, les conditions de l'ATRP se trouvent cependant limitées. Historiquement, le *grafting from* a été la première méthode testée dans ce projet, en adaptant la synthèse de nanoparticules de platine greffées de PMAA développée au sein du laboratoire.^{79,80} Cependant, les résultats ont montré que cette méthode n'était pas transposable à l'or, ce qui peut s'expliquer par une stabilité moindre de la liaison Au-S par rapport à Pt-S.

Dans ce projet, nous avons plutôt fait le choix de nous orienter vers une synthèse par méthode directe. Ce type de synthèse a d'abord été développée dans le cas des méthacrylates présentant une fonction

amine (dont le PDMAEMA), qui ont la capacité de réduire les ions AuCl_4^- , en plus de jouer le rôle de stabilisants.⁸¹⁻⁸⁵ Les AuNPs greffées sont ainsi obtenues en une seule étape, sans ajout d'agent réducteur. Pour les autres polyméthacrylates, la synthèse directe peut s'effectuer avec des ligands polymères contenant une fonction thioéther, disulfure ou thiol, comme pour la méthode de *grafting to*.⁸⁶⁻⁹⁰ Le protocole s'inspire de la méthode de Brust-Schiffrin,⁹¹ qui consiste à réduire l'acide tétrachloraurique en présence de ligands thiols qui jouent le rôle de stabilisants. Les atomes d'or agissent comme centres de nucléation, mais la compétition entre la réduction des sels d'or et leur stabilisation par les thiols permet de limiter la croissance des nanoparticules d'or. Les nanoparticules ainsi obtenues présentent une taille réduite (diamètre inférieur à 10 nm).^{86,91}

L'équipe de Brust a été la première à appliquer cette méthode avec des ligands polymères, notamment avec des PMAA contenant une fonction thioéther en bout de chaîne.^{86,87} D'autres travaux ont ensuite montré la possibilité d'utiliser des polyméthacrylates synthétisés par ATRP et contenant un pont disulfure : la scission de ce dernier produit deux ligands fonctionnalisés par des thiols qui peuvent jouer le rôle de stabilisants des AuNPs.⁸⁸⁻⁹⁰ En plus de permettre l'obtention de nanoparticules greffées polymères en une seule étape, l'utilisation de polymères comme ligands semble également assurer une polydispersité des nanoparticules plus étroite, par rapport à d'autres ligands thiols.⁸⁶ L'hypothèse formulée par l'équipe de Brust est la suivante : durant la synthèse, les ligands polymères constituent autour des noyaux métalliques en croissance une couche protectrice qui empêche la fusion de deux particules tout en restant perméable aux ions tétrachloroaurate. Cet effet protecteur s'expliquerait à la fois par l'encombrement stérique des polymères, mais aussi par des répulsions électrostatiques dans le cas de polymères pouvant présenter des charges, comme l'acide polyméthacrylique (PMAA) par exemple. Il a d'ailleurs été montré par la même équipe que le ligand PMAA était un très bon stabilisant comparé à d'autres polymères, car il permet d'obtenir des échantillons plus monodisperses.⁸⁷

C'est cette méthode de synthèse directe que nous avons choisie dans le cadre de notre projet. Elle permet à la fois d'utiliser des polymères caractérisés en amont de la synthèse des nanoparticules (avantage par rapport au *grafting from*), mais également d'obtenir une chimie de surface mieux contrôlée qu'en *grafting to* en évitant l'étape d'échange de ligands, nécessaire après toute synthèse réalisée via une réduction par des citrates. Elle est en outre tout à fait compatible avec la synthèse de polyméthacrylates par ATRP, en utilisant un amorceur contenant un pont disulfure, comme l'ont montré les équipes de Matsuura⁸⁸ et Bach.⁹⁰ Nous avons donc cherché à appliquer cette stratégie de l'amorceur disulfure dans le cas de la polymérisation et copolymérisation du méthacrylate de *tert*-butyle (MAtBu) pour obtenir des polymères qui, une fois hydrolysés, peuvent être utilisés comme ligands pour la synthèse des AuNPs.⁹² Cette voie de synthèse directe permet ainsi d'obtenir des nanoparticules d'or directement greffées de chaînes polymères synthétisées par PRC et caractérisées

au préalable. D'autre part, la petite taille des NPs formées devrait permettre de favoriser l'internalisation dans le noyau des cellules.⁹³⁻⁹⁵ Il a en outre été montré que les surfaces des petites NPs (diamètre < 5 nm) étaient plus réactives, et que cela pouvait favoriser certains mécanismes de surface en radiosensibilisation.⁹⁶

Ainsi, la stratégie choisie consiste à synthétiser des nanoparticules d'or par méthode directe en utilisant des ligands polyméthacrylates obtenus par ATRP. Les différents choix effectués ont été guidés par la volonté d'obtenir des nano-objets bien définis et contrôlés, en un minimum d'étapes, et dont les propriétés physico-chimiques peuvent être déclinées, tout en gardant un caractère hydrosoluble et biocompatible indispensable pour les applications envisagées. Pour commencer, la synthèse des ligands polymères et leur caractérisation via diverses techniques vont être décrites.

II. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES LIGANDS POLYMÈRES

L'objectif était de synthétiser différents ligands polymères à partir des monomères méthacrylates identifiés dans la partie précédente. Afin d'obtenir une gamme de ligands aux propriétés différentes, deux paramètres ont été déclinés : la taille du ligand, et sa nature chimique. La synthèse de l'amorceur va être décrite dans un premier temps. Puis, le protocole de synthèse des ligands par ATRP ainsi que les techniques de caractérisation utilisées seront décrits de manière générale, avant d'exposer successivement les résultats obtenus pour les deux objectifs énoncés. L'ensemble des protocoles expérimentaux sont détaillés dans la partie expérimentale, située en Annexe A.

A. SYNTHÈSE DE L'AMORCEUR

Notre choix s'étant porté sur une synthèse par ATRP de polyméthacrylates, il a été nécessaire de synthétiser au préalable un amorceur d'ATRP comportant un pont disulfure qui pourra être réduit lors de la synthèse des nanoparticules pour apporter les fonctions thiols.⁹⁷ Le 2-bromoisobutyrate disulfure (DS-Br), utilisé dans les travaux de Matsuura *et al.*⁸⁸ et Bach *et al.*,⁹⁰ a été choisi pour ce projet. Il est obtenu par estérification entre les groupements hydroxyles du 2,2-dithioéthanol et la fonction bromure d'acyle du bromure de 2-bromo-isobutyryle (Figure II.3). La réaction est effectuée dans le THF, en présence de pyridine, pendant 24 heures. Le produit obtenu est d'abord purifié par filtration puis par une succession de lavages et enfin par séparation sur colonne de silice. A partir de cet amorceur DS-Br, plusieurs polymères et copolymères ont été synthétisés.

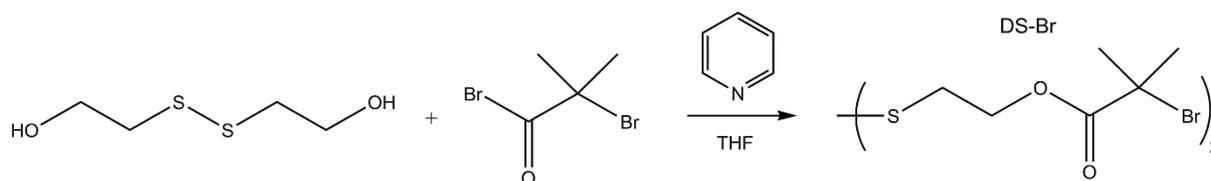


Figure II.3 - Synthèse de l'amorceur 2-bromoisobutyrate disulfure (DS-Br)

B. SYNTHÈSE PAR ATRP DES LIGANDS MÉTHACRYLATES

1. Protocole général

La synthèse des ligands polymères par ATRP est effectuée à partir de l'amorceur DS-Br, en présence du système catalytique constitué du bromure de cuivre (Cu^IBr) couplé au ligand pentaméthyl-diéthylène triamine (PMDETA). La réaction est réalisée à 60°C dans le DMF sous atmosphère inerte. Le rapport $\text{Cu}^I\text{Br}/\text{PMDETA}/\text{DS-Br}$ est fixé à 2/2/1 pour l'ensemble des synthèses. Un suivi gravimétrique effectué tout au long de la réaction permet de calculer le taux de conversion obtenu, sauf dans le cas des ligands constitués de PEGMA, car celui-ci ne peut être évaporé. La polymérisation est arrêtée au bout de quelques heures, et le cuivre est éliminé du milieu réactionnel par précipitations successives du ligand polymère puis par passage sur colonne d'alumine.

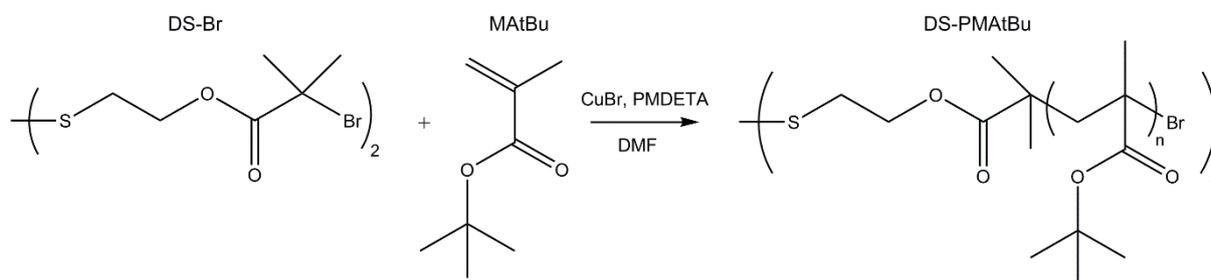


Figure II.4 - Polymérisation du méthacrylate de tert-butyle par ATRP

Dans le cas du PDMAEMA, la synthèse et la purification sont réalisées différemment, selon le protocole de Pantoustier *et al.*⁹⁸ qui consiste en une synthèse en *bulk* à 25°C avec un ratio $\text{Cu}^I\text{Br}/\text{PMDETA}/\text{DS-Br}$ fixé à 1/2/1. L'originalité de la méthode réside surtout dans l'étape de purification, qui exploite la sensibilité du PDMAEMA au pH. Ainsi, le polymère pris en masse est d'abord dissous dans une solution acide (pH 2) avant d'être précipité en augmentant le pH jusqu'à 12 et en chauffant le milieu à 65°C . Cette procédure est répétée plusieurs fois jusqu'à élimination complète des résidus de cuivre, qui eux restent solubles. Elle permet d'éviter l'utilisation de solvants et d'une colonne d'alumine.

Pour les polymères qui contiennent du MAtBu, une deuxième étape d'hydrolyse est ensuite nécessaire afin d'obtenir le MAA. Elle s'effectue par l'action de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le chloroforme (Figure II.5). La réaction dure sur plusieurs jours, jusqu'à ce que l'on observe une précipitation du polymère qui traduit l'hydrolyse complète des fonctions esters du MAtBu.

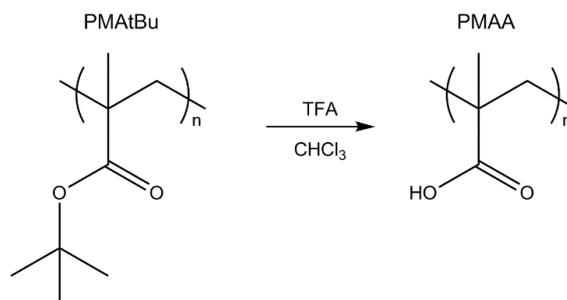


Figure II.5 - Réaction d'hydrolyse du PMAtBu en PMAA

Les polymères et copolymères statistiques obtenus sont caractérisés par diverses techniques. La RMN ¹H permet de valider la structure chimique du polymère, d'estimer l'efficacité de l'hydrolyse, ainsi que de quantifier, dans le cas des copolymères, les proportions des différents monomères utilisés. Les masses molaires et les indices de polydispersité des ligands sont obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), effectuée dans le THF pour les composés contenant du MAtBu et dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 9 pour les composés hydrolysés. Les SEC utilisées étant couplées à la diffusion de lumière multi-angles (*Multi-Angle Light Scattering* en anglais, ou MALS - voir détails en Annexe A), la mesure des masses molaires est absolue et ne nécessite pas de calibration avec des polymères standards, ce qui permet de gagner en fiabilité.

On notera également que les masses molaires indiquées correspondent aux masses molaires totales des polymères synthétisés, soit au double de celles des chaînes greffées correspondantes, du fait de la double polymérisation qui se fait autour du pont disulfure. Ainsi, un polymère de 20 kg/mol donnera des chaînes greffées sur les NPs d'environ 10 kg/mol. Cela a pu être vérifié en analysant des chaînes greffées après dissolution du cœur d'or avec une solution de *gold etchant* (iodure de potassium et diiode) : la masse molaire obtenue correspondait bien à la moitié de celle mesurée pour le ligand initial.

2. Variation de la longueur de la couronne PMAA

Le premier objectif était de synthétiser des polymères de même nature mais de masses molaires différentes pour étudier l'impact de la longueur des chaînes greffées sur le comportement des nanoparticules en milieu biologique. Le PMAA a été choisi pour cette étude car sa synthèse avait déjà été effectuée au laboratoire (DS01 dans le Tableau II.1) et car les Au-PMAA avaient donné de bons résultats *in vitro*.

La stratégie initiale a été de simplement augmenter le degré de polymérisation théorique en introduisant une plus grande quantité de monomères dans le système. Mais cette augmentation du degré de polymérisation n'a pas permis d'obtenir des masses molaires beaucoup plus importantes (DS02, DS03 et DS04 dans le Tableau II.1), probablement car le système catalytique se retrouvait trop dilué.

Les synthèses ont alors été reprises en diminuant également le pourcentage volumique de solvant, afin de reconcentrer le système catalytique. Cela a permis d'augmenter les taux de conversion. Ainsi, en passant de 32% à 10% de solvant pour un même degré de polymérisation théorique (60 kg/mol environ), la masse molaire M_n des chaînes a été augmentée de 22 à 55 kg/mol (Tableau II.1). L'indice de polydispersité reste inférieur à 1,2, ce qui montre un bon contrôle de la polymérisation.

Tableau II.1 - Résumé des caractéristiques des ligands DS-PMAA synthétisés : conditions de synthèse et résultats obtenus par analyse en SEC-MALS

Polymère	Mn théorique visée (kg/mol)	%v de solvant (DMF)	Taux de conversion (%)	Analyse SEC avant hydrolyse (THF)		Taux d'hydrolyse (%)	Analyse SEC après hydrolyse (phosphate)		Nombre de monomères (calculé après hydrolyse)
				Mn (kg/mol)	Ip		Mn (kg/mol)	Ip	
DS-PMAA (DS01)	40	32	70	/	/	98	21,1	1,3	242
DS-PMAA (DS02)	40	32	51,8	21,9	1,1	98,4	14,8	1,2	169
DS-PMAA (DS03)	120	32	26,5	20,2	1,1	98,4	13,9	1,2	158
DS-PMAA (DS04)	200	32	16	29,0	1,1	98,4	19,7	1,2	226
DS-PMAA (DS05)	120	20	28,9	32	1,1	98,3	22,1	1,1	253
DS-PMAA (DS06)	120	4,5	36,0	39,5	1,2	98,3	26,2	1,2	301
DS-PMAA (DS07)	106	10	58,4	55,3	1,2	98,0	37,1	1,2	428

L'analyse en RMN ^1H des DS-PMAAtBu et DS-PMAA a permis de déterminer l'efficacité de la réaction d'hydrolyse. Sur la Figure II.6, on retrouve bien pour les deux composés les pics 1 et 2 caractéristiques du squelette polyméthacrylate, correspondant respectivement aux groupements CH_2 et CH_3 du motif unitaire. Le pic 2 est pris comme référence, avec une intégration fixée à 3. La comparaison des spectres avant et après hydrolyse permet de montrer que l'hydrolyse a bien eu lieu, du fait de la disparition du pic 3 correspondant aux méthyles du groupement *tert*-butyle. L'efficacité de l'hydrolyse a pu être évaluée en comparant les valeurs d'intégration de ce pic avant et après hydrolyse. Des efficacités supérieures à 98% ont été obtenues pour l'ensemble des DS-PMAA synthétisés (Tableau II.1).

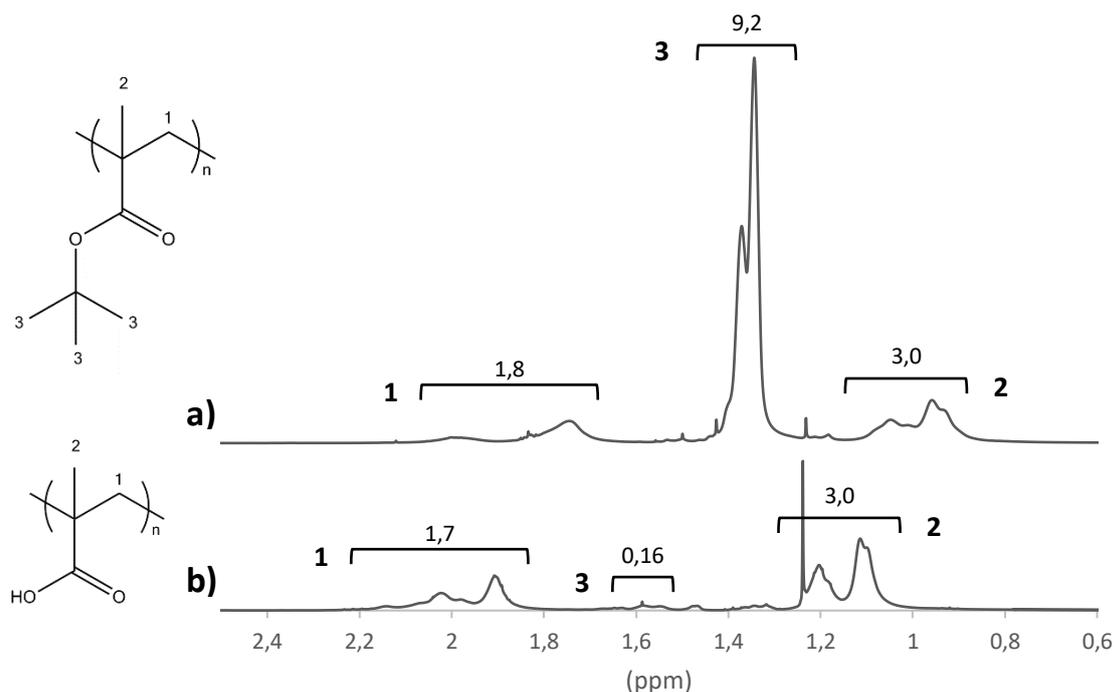


Figure II.6 - Spectres RMN ^1H des ligands (a) DS-PMAAtBu et (b) DS-PMAA dans le cas du DS04

Les ligands DS-PMAA ont été à nouveau caractérisés en SEC après leur hydrolyse, ce qui a permis de montrer qu'on conservait des faibles indices de polydispersité pour la gamme de M_n obtenus allant de 15 à 37 kg/mol.

3. Variation de la nature de la couronne

Le deuxième objectif était de faire varier la nature des ligands polyméthacrylates, afin d'obtenir des propriétés physico-chimiques différentes en surface des AuNPs. Les monomères décrits plus hauts ont donc été combinés pour former les ligands suivants : DS-P(HEMA-MAA) (50/50), DS-P(MAnBu-MAA) (20/80 et 40/60), DS-PDMAEMA, DS-P(DMAEMA-MAA) (10/90) et DS-P(PEGMA-MAA) (10/90). Les copolymères sont tous des copolymères statistiques et les rapports indiqués correspondent aux proportions de monomères introduites lors de la polymérisation.

Comme dit précédemment, les ligands ont été ensuite caractérisés par RMN ^1H . Tous les spectres (avant et après hydrolyse) sont visibles en Annexe B. Pour l'ensemble des copolymères, on retrouve bien les deux pics 1 et 2 caractéristiques du squelette polyméthacrylate, et l'hydrolyse des unités monomères de MAtBu est observable grâce la disparition du pic 3 mentionné précédemment. A l'inverse, on retrouve après hydrolyse les pics caractéristiques des groupements pendants des esters des autres unités monomères. Cela montre qu'ils n'ont pas été affectés par l'hydrolyse. C'est le résultat que l'on attendait, car le *tert*-butyle est un meilleur groupe partant. Les efficacités d'hydrolyse du MAtBu sont d'ailleurs supérieures à 97%.

A partir de ces spectres RMN, il a également été possible d'estimer les proportions réelles des deux monomères en calculant le rapport des intégrations de pics caractéristiques de chacun des monomères (Tableau II.2). Pour l'ensemble des copolymères, les pourcentages obtenus sont très proches des proportions théoriques, c'est-à-dire les proportions de monomères introduites lors de la polymérisation.

L'analyse SEC a pu être réalisée dans le THF sur l'ensemble des copolymères avant hydrolyse, excepté le DS-P(HEMA-MAA). Dans le cas du DS-PDMAEMA, la mesure a été réalisée en ajoutant 3% (v/v) de triéthylamine à la phase de THF. Les DS-P(DMAEMA-MAA) et DS-P(PEGMA-MAA) ont également été analysés par SEC en tampon phosphate après hydrolyse. Les autres copolymères n'étaient pas suffisamment solubles dans cette phase aqueuse. Pour les deux DS-P(MAnBu-MAA), leur masse molaire finale a donc été calculée à partir des taux d'hydrolyse estimés en RMN.

Les indices de polydispersité mesurés en SEC avant et après hydrolyse restent inférieurs à 1,3, ce qui montre là encore un bon contrôle de la polymérisation, même lorsque deux natures de monomères sont copolymérisées. La seule exception est le copolymère contenant du PEGMA, qui présente un indice de polydispersité de 3,0 avant hydrolyse et 1,9 après hydrolyse. Ces valeurs très élevées peuvent provenir des incertitudes liées à la détermination de l'indice de polydispersité par la technique du MALS. Toutefois, on peut noter que l'obtention de larges distributions a déjà été rapportée pour d'autres copolymères statistiques comprenant du PEGMA.⁹⁹ Les auteurs ont montré qu'utiliser le catalyseur Cu^ICl à la place de Cu^IBr permet d'obtenir de meilleurs indices de polydispersité.

Tableau II.2 - Résumé des caractéristiques des ligands méthacrylates synthétisés : conditions de synthèse et résultats obtenus par analyse en SEC-MALS

Polymère	Mn théorique visée (kg/mol)	%, de DMF / T (°C)	Taux de conversion (%)	Analyse SEC avant hydrolyse (THF)		Taux d'hydrolyse (%) (RMN)	Analyse SEC après hydrolyse (phosphate)		Nombre de monomères (calculé après hydrolyse)	% autre monomère (RMN)
				Mn (kg/mol)	Ip		Mn (kg/mol)	Ip		
DS-PDMAEMA	40	0% 25°C	98,0	43,8	1,2	/	/	/	277	/
DS-P(DMAEMA-MAA) (10/90)	40	32% 60°C	48,2	20,5	1,3	98,0	15,9	1,3	168	10,0
DS-P(MAnBu-MAA) (20/80)	40	17% 60°C	77,4	34,5	1,3	97,8	21,0 (RMN)	/	241	22,5
DS-P(MAnBu-MAA) (40/60)	40	13% 60°C	95,5	57,8	1,2	97,7	35,4 (RMN)	/	404	44,0
DS-P(PEGMA-MAA) (10/90)	40	32% 60°C	/	49,7	3,0	98,1	44,2	1,9	392	9,5
DS-P(HEMA-MAA) (50/50)	15	38% 60°C	45	/	/	95,3	/	/	/	48,0

Dans cette partie, nous avons montré comment, en jouant sur les paramètres de la synthèse et sur les monomères utilisés, nous avons pu obtenir plusieurs ligands polyméthacrylates de tailles et de natures différentes. La technique ATRP a permis d'assurer un bon contrôle de la polymérisation, caractérisé par les faibles indices de polydispersité mesurés. L'ensemble des ligands synthétisés constitue ainsi une bibliothèque de polyméthacrylates aux propriétés physico-chimiques variées.

III. ÉLABORATION DES NANOPARTICULES D'OR GREFFÉES POLYMÈRES

Après avoir obtenu une gamme de ligands polymères, la deuxième étape consiste à synthétiser les nanoparticules d'or greffées. La méthode de synthèse sera décrite dans un premier temps, ainsi que leur caractérisation par diverses techniques. Une attention particulière sera ensuite portée aux méthodes de purification des NPs. Enfin, une dernière partie détaillera l'étude de ces nano-objets par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA - *Small-Angle Neutron Scattering* en anglais, ou SANS).

A. SYNTHÈSE ET PURIFICATION

La stratégie de synthèse par méthode directe ou *in situ* a déjà été détaillée dans la première partie de ce chapitre. Il s'agit de réduire les sels d'or directement en présence des ligands polymères qui viennent d'être décrits dans la partie précédente. Ceux-ci vont alors jouer le rôle de stabilisants et limiter la croissance des NPs en formant des liaisons covalentes Au-S grâce à leur fonction thiol résultant de la réduction du pont disulfure contenu dans les ligands synthétisés.

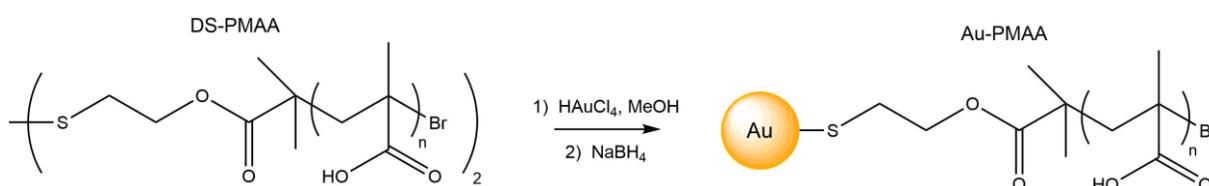


Figure II.7 - Synthèse des nanoparticules d'or greffées polymères Au-PMAA ⁹²

La réaction de synthèse est décrite sur la Figure II.7 dans le cas du ligand DS-PMAA. Les sels d'or H₂AuCl₄ et le polymère sont tout d'abord dissous dans du méthanol et agités pendant 30 minutes. Puis le tétrahydruroborate de sodium (NaBH₄), qui joue ici le rôle de réducteur, est introduit dans le milieu. La réduction des sels d'or est alors instantanée, et on observe un brusque changement de couleur du jaune au rouge très foncé qui témoigne de la formation des NPs. En effet, les propriétés de résonance plasmon des AuNPs leur confèrent cette couleur rouge. Après 24 heures d'agitation, les AuNPs sont récupérées et purifiées.

La purification des NPs est une étape importante du protocole de synthèse, la difficulté résidant dans l'élimination des ligands polymères non greffés. En effet, leur solubilité est très proche de celle des NPs, puisque ces mêmes ligands sont présents sur la surface de celles-ci. Les travaux de thèse d'Aurélien Paquirissamy avaient déjà mis en évidence que les cycles de lavage/centrifugation utilisés ne permettaient pas d'éliminer tout le polymère libre.¹ Nous avons donc cherché à optimiser cette étape du protocole.

La première stratégie a été d'identifier un mélange de solvants qui permettrait de faire précipiter sélectivement les NPs. En utilisant un mélange éther/éthanol (40/60), il a par exemple été possible de séparer une partie du polymère libre DS-PMAA resté en solution alors que les Au-PMAA avaient précipité après centrifugation. Mais ce résultat n'a pas été reproduit sur d'autres NPs, limitant donc l'usage de ce protocole.

L'application de l'ultrafiltration, via l'utilisation de tubes concentrateurs pour centrifugeuse, a été testée dans un deuxième temps. Ce dispositif, très utilisé en biologie moléculaire pour concentrer les acides nucléiques ou les protéines, comporte une membrane présentant un certain seuil de coupure. Lors de la centrifugation, les molécules d'un poids moléculaire supérieur à ce seuil ne peuvent pas passer à travers la membrane et restent donc dans la partie supérieure du tube. Dans notre cas, en choisissant un seuil de coupure de 100 kDa, le but est de laisser passer les ligands non greffés (entre 15 et 40 kg/mol environ) tout en retenant les NPs, dont le poids moléculaire est bien supérieur. Lors des expériences réalisées, les NPs n'ont effectivement pas traversé la membrane (pas de couleur rouge observée dans le filtrat).

L'efficacité de cette méthode a été évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG), une technique qui permet de déterminer le pourcentage de matière organique (%_wMO) présente dans l'échantillon, et donc la quantité de polymère dans notre cas. Les courbes obtenues pour les Au-PMAA(10,6-B) sont présentées sur la Figure II.8. Trois mesures ont été effectuées : avant la purification, après 6 cycles de centrifugation avec le tube concentrateur 100 kDa et après 10 cycles. On remarque que le %_wMO diminue à mesure que le nombre de centrifugations augmente, passant de 76% à 32% après 10 cycles. On a donc réussi à éliminer une partie du polymère libre.

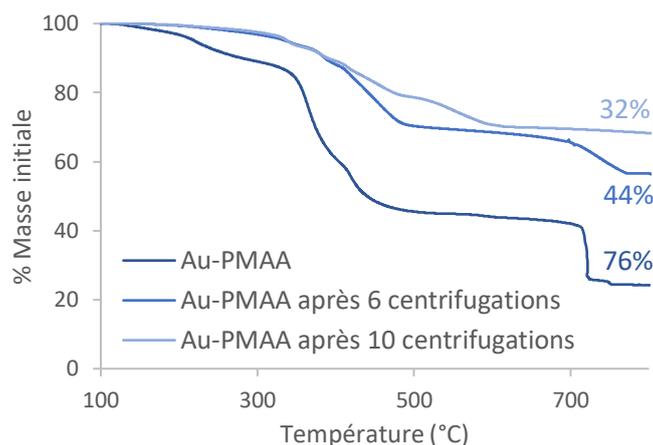


Figure II.8 - Analyses thermogravimétriques des nanoparticules Au-PMAA(10,6-B) avant et après les centrifugations effectuées avec les tubes concentrateurs 100 kDa

On peut également analyser la présence de polymère libre en raisonnant sur les densités de greffage. Le %_wMO initial, très élevé, correspondrait à une densité de greffage de 1,7 chaînes/nm² pour la masse molaire de 10,6 kg/mol considérée pour ce ligand. Or, cette valeur est supérieure à celles attendues pour une méthode de synthèse directe avec des polymères de masse molaire comparable.¹⁰⁰ Les résultats obtenus en SANS lors de travaux précédents sur des objets similaires, indiquaient d'ailleurs une densité de greffage de 0,16 chaînes/nm².^{1,92} Le %_wMO mesuré après les 10 cycles de centrifugation correspondrait, lui, à une densité bien plus cohérente de 0,26 chaînes/nm². Ainsi, s'il n'est pas exclu que du polymère libre soit encore présent dans l'échantillon, la méthode de centrifugation en tube concentrateur semble permettre d'en éliminer une partie.

Ce protocole a donc été préféré aux lavages et simples centrifugations en solvants organiques utilisés précédemment, afin de purifier au mieux les NPs synthétisées. Cependant, les résultats présentés ci-dessus n'ont pu être reproduits sur l'ensemble des lots de NPs, et la plupart des purifications effectuées n'ont pas permis d'abaisser le %_wMO aussi nettement. Tout d'abord, on peut supposer que certains ligands ne peuvent passer la membrane, à cause d'interactions avec celle-ci, ou bien parce que leur taille ne leur permet pas. En effet, le seuil de coupure de 100 kDa est indicatif, et a été déterminé pour des protéines. Il n'est donc pas forcément représentatif dans le cas de ligands polymères. D'autre part, les tests présentés sur la Figure II.8 correspondent à des conditions diluées, qu'il n'est pas possible d'atteindre dans le cas de la purification d'un lot entier de NPs sans multiplier les étapes de manière considérable. Ainsi, en conditions plus concentrées, il est possible que les ligands libres soient en interactions plus fortes avec les NPs, et que la purification s'effectue moins efficacement. L'élimination du polymère libre ne semble donc pas réalisable à plus grande échelle par cette méthode. Une piste serait d'utiliser la filtration tangentielle, qui permettrait de travailler en conditions diluées sur de plus gros volumes.

Cette présence de ligands libres sera à prendre en compte dans certains aspects du projet, en particulier dans le cadre des greffages post-synthèse, pour lesquels l'impact sera discuté dans la partie de ce chapitre consacrée à ce sujet (§ IV page 79). Pour les tests *in vitro*, le risque était que le polymère libre induise une toxicité supplémentaire, ou que son internalisation soit en compétition avec celle des AuNPs. Ces deux aspects ont donc été étudiés pour les Au-PMAA(10,6-B) avant et après centrifugations : aucune différence significative n'a été observée (Annexe E).

Ces méthodes de synthèse et purification ont été utilisées pour synthétiser différentes NPs (listées dans le Tableau II.4) avec les ligands polymères décrits dans la partie précédente. Plusieurs techniques de caractérisation ont ensuite été mises en œuvre pour déterminer à la fois les propriétés du cœur métallique et celles de la couronne polymère.

B. CARACTÉRISATION DU CŒUR D'OR

Les NPs ont tout d'abord été caractérisées par spectroscopie UV-visible, afin d'identifier le pic plasmon caractéristique des AuNPs, dont la position est notamment dépendante de la taille du cœur d'or et de la nature des ligands.¹⁰¹ Les spectres sont présentés en Annexe C, et la position du pic plasmon est indiquée dans le Tableau II.4 (page 71) pour chaque synthèse de NPs.

Des mesures de potentiel zêta ont également été effectuées dans un tampon phosphate à pH 7,5 (voir détails en Annexe A). Les valeurs rapportées (Tableau II.4) correspondent à la moyenne d'au moins trois mesures, et l'écart-type rend compte de la distribution moyenne. Pour toutes les NPs avec une couronne contenant du PMAA, les valeurs obtenues sont négatives. Ce résultat était attendu car les acides carboxyliques doivent être en grande partie déprotonés, le pKa du PMAA étant estimé à 5,5.³³ Les Au-PDMAEMA sont au contraire caractérisées par un potentiel Zêta négatif. Là encore, le résultat est cohérent car on s'attend à la protonation d'une partie des groupements NH₃, expliquée par une valeur de pKa qui se trouve autour de 7-7,5.⁵⁷

Le cœur métallique a ensuite été caractérisé par trois techniques principales : la spectrométrie de masse avec plasma à couplage induit (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* en anglais, ou ICP-MS), la microscopie électronique en transmission (*Transmission Electron Microscopy* en anglais, ou TEM) et la diffusion des rayons X aux petits angles (*Small-Angle X-ray Scattering* en anglais, ou SAXS). Les observations en TEM ont été effectuées sur la plateforme Imagerie-Gif de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC). L'ensemble des résultats sont résumés dans le Tableau II.4.

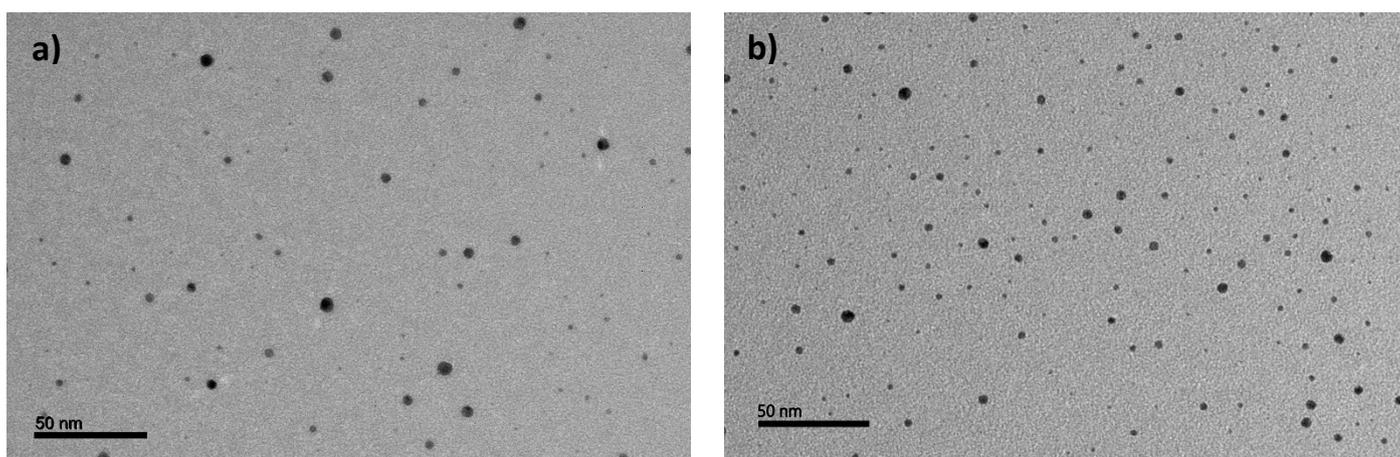
1. Caractérisation par ICP-MS

L'ICP-MS est une technique d'analyse élémentaire, qui permet, dans le cadre de notre étude, de mesurer le pourcentage massique d'or ($\%_{wAu}$) présent dans les NPs. L'analyse est réalisée sur des solutions diluées de NPs préalablement dissoutes dans de l'eau régale (mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique en proportions 50/50). Le protocole est détaillé en Annexe A. En connaissant avec précision la concentration initiale en NPs (par pesée), les concentrations d'or mesurées permettent de remonter au pourcentage d'or. Les erreurs indiquées correspondent aux incertitudes liées à la mesure. Les $\%_{wAu}$ sont très variables d'un type de NP à l'autre, ce qui montre un impact de la nature et la longueur du polymère sur la synthèse des AuNPs. La proportion de polymère libre restant influence également le résultat.

Cette connaissance des $\%_{wAu}$ pour les différentes synthèses réalisées permettra par la suite de travailler à concentration en or constante pour les tests *in vitro*.

2. Caractérisation par TEM

Le TEM est une technique de microscopie qui présente une résolution nanométrique, elle est donc bien adaptée à l'observation de nano-objets. Quelques images des NPs obtenues en TEM sont présentées sur la Figure II.9. Les grilles ont été préparées en déposant un faible volume de solution de NPs dans l'eau (voir détails en Annexe A). Sur ces images, seuls les cœurs d'or sont visibles. En effet, le numéro atomique élevé (79) de l'or génère un bon contraste, contrairement aux polymères organiques, qui sont en outre dégradés par le faisceau d'électrons. D'après ces images, les cœurs semblent présenter une morphologie sphérique. D'autre part, aucune agrégation n'est observée sur ces images, ce qui montre la bonne dispersion des NPs synthétisées dans l'eau.



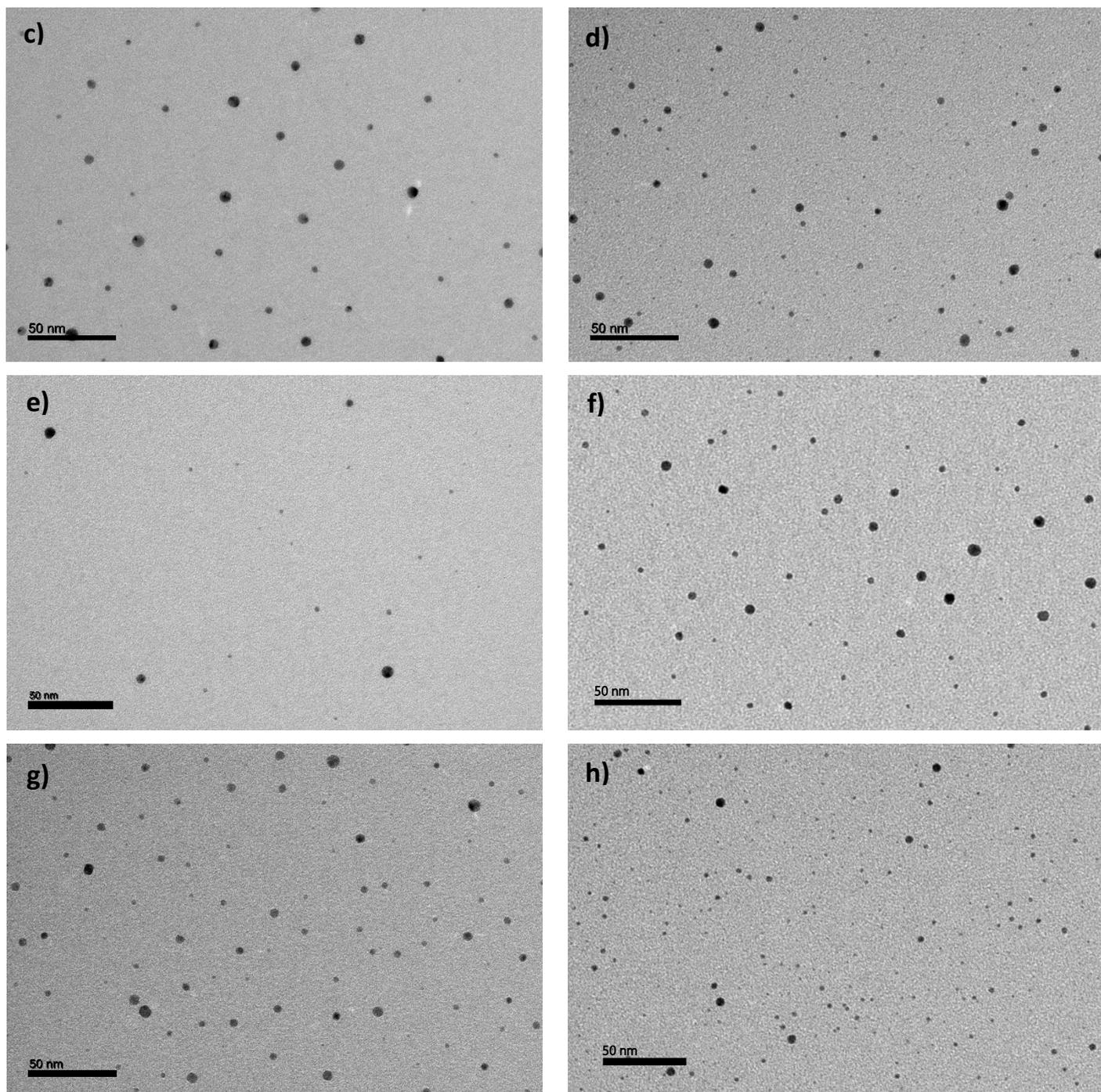
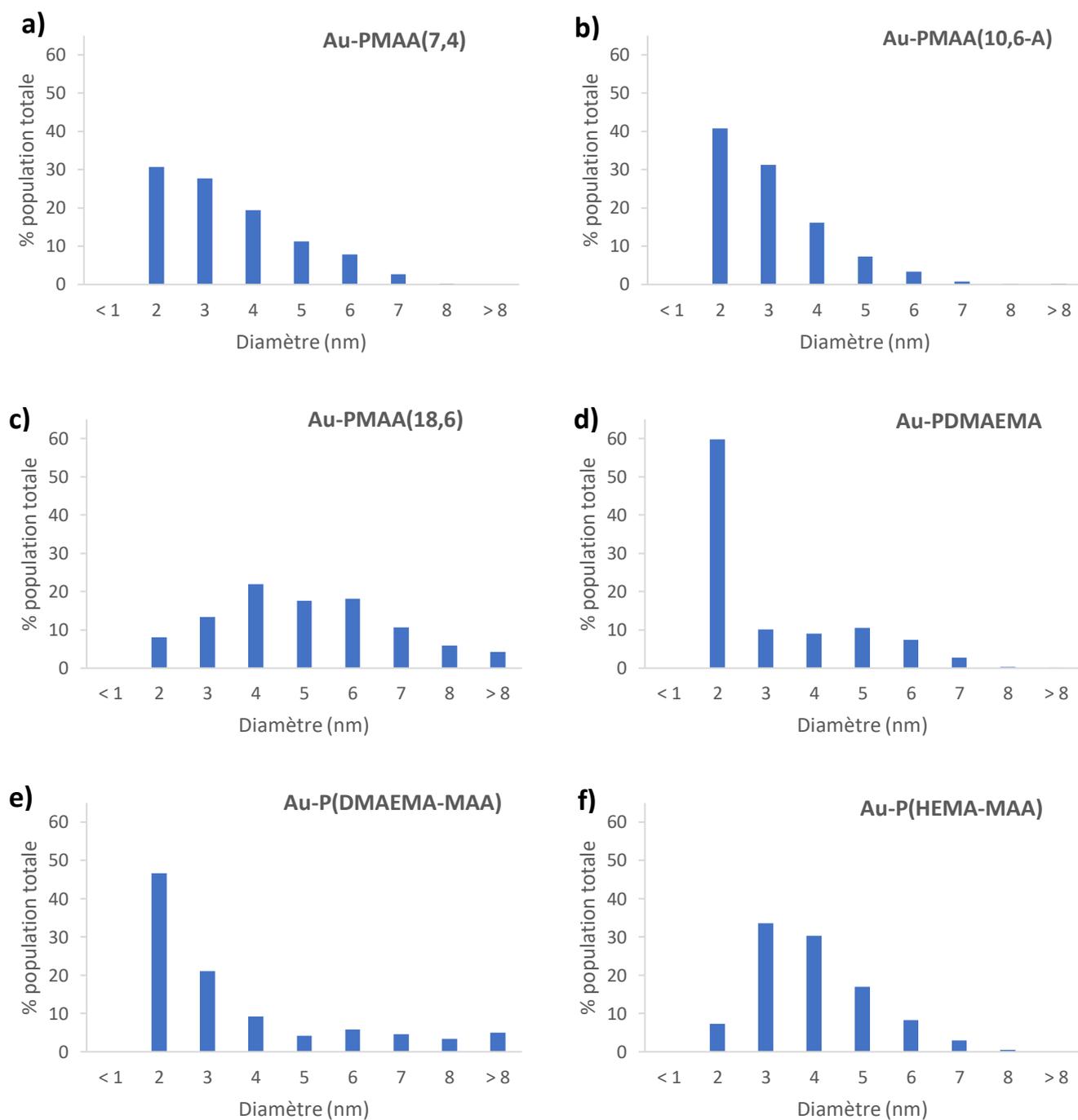


Figure II.9 - Images TEM des AuNPs greffées polymères (a) Au-PMAA(7,4), (b) Au-PMAA(10,6-A), (c) Au-PMAA(18,6), (d) Au-PDMAEMA, (e) Au-P(DMAEMA-MAA), (f) Au-P(HEMA-MAA), (g) Au-P(MAnBu-MAA) et (h) Au-P(PEGMA-MAA)

L'analyse de ces clichés avec le logiciel ImageJ a permis d'estimer les diamètres des cœurs métalliques. Pour chaque type d'objets, plusieurs centaines de NPs ont été analysées afin d'avoir un échantillon statistiquement représentatif. Les diagrammes de distribution obtenus sont présentés sur la Figure II.10. Un diamètre moyen et un écart-type ont également été calculés pour chaque synthèse à partir de ces données (Tableau II.4, page 71).



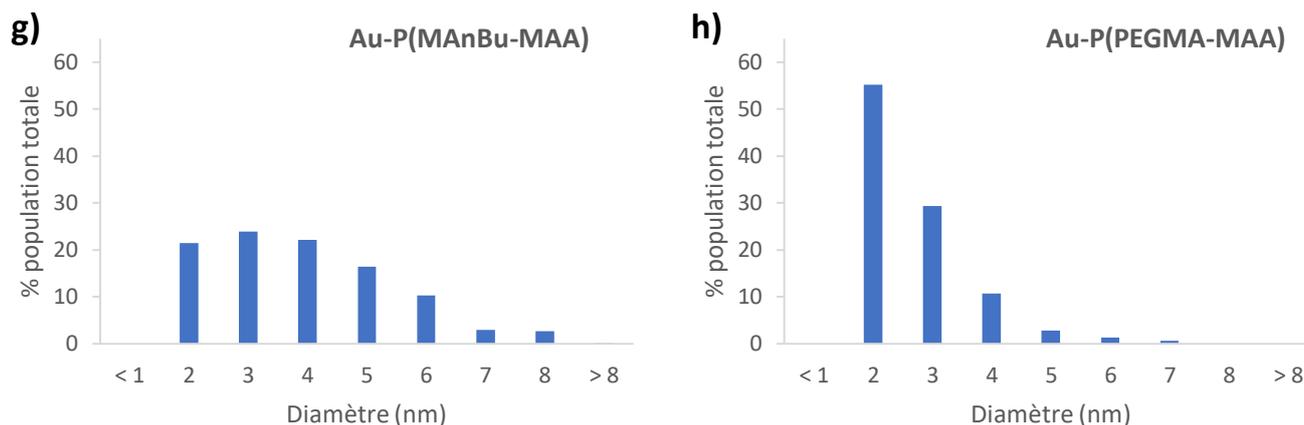


Figure II.10 - Diagrammes de distribution des diamètres des cœurs métalliques obtenus par analyse des images TEM : (a) Au-PMAA(7,4), (b) Au-PMAA(10,6-A), (c) Au-PMAA(18,6), (d) Au-PDMAEMA, (e) Au-P(DMAEMA-MAA), (f) Au-P(HEMA-MAA), (g) Au-P(MAnBu-MAA) et (h) Au-P(PEGMA-MAA)

Dans cette étude en TEM, si les observations qualitatives sont fiables, il faut toutefois considérer les résultats numériques avec précaution, car l'analyse d'images peut entraîner des biais de mesures liés à la méthode, à l'échantillonnage et à l'expérimentateur. On néglige notamment les NPs de petite taille (diamètre < 1 nm), difficiles à visualiser sur les images de TEM. C'est pourquoi une analyse des cœurs métalliques a également été réalisée en SAXS, afin d'obtenir une mesure directe du diamètre moyen.

3. Caractérisation par SAXS

Le SAXS est une technique de caractérisation structurale basée sur l'interaction élastique des rayons X avec les électrons de la matière. Cette technique permet de déterminer la forme, la taille et la distribution en taille des particules, mais aussi les interactions entre particules et leur organisation.¹⁰² Cette étude a été menée en collaboration avec Fabienne Testard (LIONS, NIMBE). Les analyses ont été réalisées en laboratoire et sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL (proposal 20181790), sur des solutions de NPs préparées dans l'eau à une concentration d'or de 220 µg/mL. Les paramètres des mesures sont détaillés en Annexe A.

Ici, seule la contribution du cœur en or est *a priori* visible sur le signal diffusé car la densité de longueur de diffusion des polymères est proche de celle de l'eau (Tableau II.3). Les diagrammes de diffusion obtenus pour les Au-PMAA(10,6-B) et les Au-P(HEMA-MAA) sont présentés sur la Figure II.11, tandis que les autres, d'allure similaire, sont rassemblées en Annexe D. Les résultats obtenus pour les Au-PMAA(10,6-A) et Au-P(DMAEMA-MAA) n'ont pas été considérés car une instabilité des suspensions (décantation) a été observée sous faisceau (expériences réalisées sur la ligne SWING). Le cas particulier des Au-P(PEGMA-MAA), dont le signal diffère de manière notable, sera discuté en fin de paragraphe.

Tableau II.3 - Densités de longueur de diffusion des rayons X pour l'or, les monomères utilisés et l'eau aux énergies utilisées

Composé	$\rho_{\text{SAXS}} (10^6 \text{ \AA}^{-2})$	
	8 keV (laboratoire)	16 keV (SWING)
Au	124,89	126,58
MAA	9,24	9,21
HEMA	9,83	9,80
DMAEMA	8,69	8,67
MAnBu	8,35	8,33
PEGMA (Mn = 360)	10,23	10,20
Eau	9,47	9,43

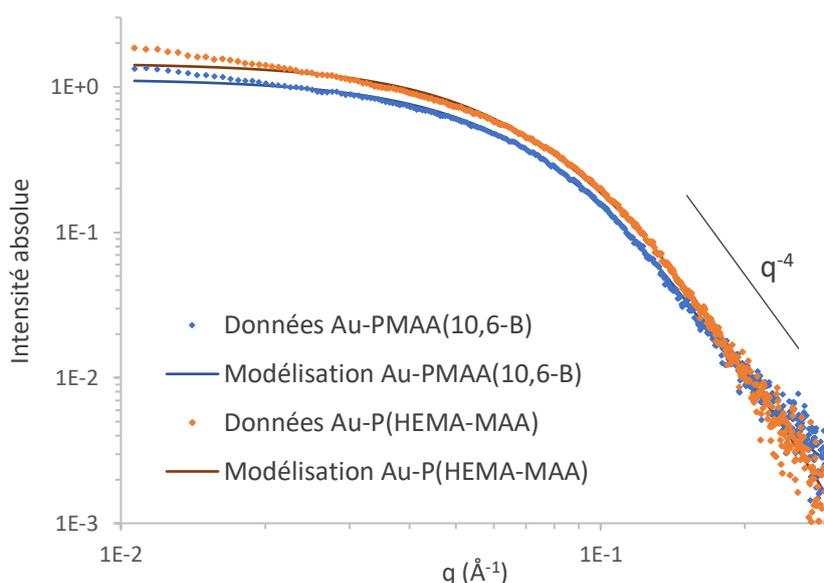


Figure II.11 - Analyses SAXS des Au-PMAA(10,6-B) et Au-P(HEMA-MAA) : courbes $I=f(q)$ et ajustement par un modèle de sphère

Qualitativement, on peut déjà noter pour toutes les NPs (sauf Au-P(PEGMA-MAA)) que la décroissance en q^{-4} dans le domaine des q intermédiaires indique une interface nette, comme dans le cas des sphères. En outre, l'absence d'oscillations confirme la polydispersité des objets. Ces deux observations corroborent donc les analyses effectuées en TEM. Les diagrammes de diffusion ont été ajustés avec un modèle de distribution log-normale de sphères, ce qui permet de remonter au rayon moyen des NPs et à la distribution en taille. Ce modèle permet d'approcher au mieux les courbes obtenues, comme on peut le voir sur la Figure II.11. On peut cependant remarquer que les données divergent du modèle aux petits angles, ce qui pourrait traduire une faible agrégation des NPs ou une légère anisotropie. Le diamètre moyen et la polydispersité de la loi log-normale obtenus pour chaque NP sont résumés dans le Tableau II.4.

Concernant les Au-P(PEGMA-MAA), la décroissance observée en SAXS est proche de $q^{-2,5}$. Le modèle de sphère n'est donc pas applicable. Cela pourrait indiquer que le signal des ligands n'est pas

négligeable dans ce cas, puisque les observations en TEM n'ont pas montré de différence avec les autres NPs. Il faudrait choisir un modèle qui prend en compte la conformation du polymère.

Les analyses des diamètres réalisées en TEM et en SAXS montrent des résultats très similaires, notamment en termes de diamètres moyens (Tableau II.4). Les valeurs obtenues (entre 2 et 5 nm) sont tout à fait en accord avec les petites tailles attendues pour la méthode de synthèse choisie, comme cela a été décrit dans la première partie de ce chapitre.^{86,91,92} On peut néanmoins souligner que les Au-PMAA(18,6) et Au-P(DMAEMA-MAA) sont caractérisées par un cœur un peu plus gros que celui des autres NPs, et les Au-P(PEGMA-MAA) par un cœur plus petit. La nature branchée du PEGMA pourrait générer un encombrement stérique plus important qui limite la croissance des cœurs déjà formés. Concernant la distribution, le fait que la loi log-normale donne la meilleure approximation est assez cohérent avec l'allure asymétrique des distributions obtenues en TEM. Une bonne correspondance est d'ailleurs observée entre les histogrammes obtenus à partir des images TEM et les distributions log-normales obtenues par modélisation des données SAXS, comme illustré sur la Figure II.12 dans le cas des Au-PMAA(7,4).

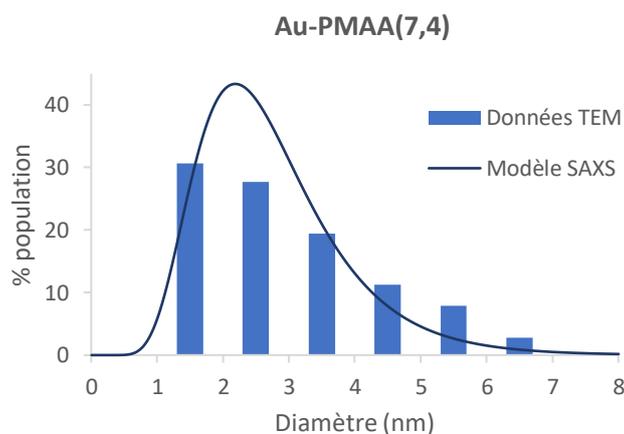


Figure II.12 - Comparaison des distributions obtenues par TEM et SAXS pour les Au-PMAA(7,4)

Une bonne reproductibilité des caractéristiques des NPs a été démontrée lorsqu'une même synthèse était répétée. Notamment, les résultats des caractérisations des Au-PMAA(10,6) semblent similaires, non seulement pour les deux lots présentés ici, mais également pour un lot précédemment synthétisé au laboratoire.¹ Bien qu'elles ne soient pas présentées ici, plusieurs synthèses de Au-PDMAEMA et Au-PMAA(18,6) ont en outre été effectuées, produisant toujours des NPs de tailles semblables à celles rapportées dans le Tableau II.4 pour les lots équivalents.

Tableau II.4 - Résumé des caractéristiques des AuNPs synthétisées
(PD = polydispersité de la loi log-normale)

Nom de l'échantillon	Polymère utilisé	Mn polymère (kg/mol)	Potentiel zêta (mV)	Localisation pic plasmon (nm)	%wAu (ICP-MS)	Diamètre moyen cœur (nm) (TEM)	Diamètre moyen cœur (nm) (SAXS)
Au-PMAA(7,4)	DS-PMAA 7,4 kg/mol	7,4	-19,4 ± 21,3	512	11,9 ± 0,1	2,9 ± 1,4	2,7 PD = 0,39
Au-PMAA(10,6-A)	DS-PMAA 10,6 kg/mol	10,6	-37,9 ± 10,0	513	10,9 ± 0,2	2,8 ± 1,0	/
Au-PMAA(10,6-B)	DS-PMAA 10,6 kg/mol	10,6	-44,5 ± 6,6	514	9,5 ± 0,3	3,1 ± 1,5	3,2 PD = 0,37
Au-PMAA(18,6)	DS-PMAA 18,6 kg/mol	18,6	-23,0 ± 10,5	524	19,8 ± 0,3	4,6 ± 1,9	4,0 PD = 0,40
Au-PDMAEMA	DS-PDMAEMA	21,9	9,5 ± 4,4	516	5,5 ± 0,2	2,6 ± 1,6	3,7 PD = 0,40
Au-P(DMAEMA-MAA)	DS-P(DMAEMA-MAA) (10/90)	8,0	-33,6 ± 8,3	530	56,5 ± 0,9	3,1 ± 2,5	/
Au-P(HEMA-MAA)	DS-P(HEMA-MAA) (50/50)	/	-31,5 ± 9,0	516	12,6 ± 0,2	3,5 ± 1,2	3,0 PD = 0,40
Au-P(MAnBu-MAA)	DS-P(MAnBu-MAA) (20/80)	10,5	-17,7 ± 10,6	518	19,1 ± 0,4	3,4 ± 1,6	3,2 PD = 0,42
Au-P(PEGMA-MAA)	DS-P(PEGMA-MAA) (10/90)	22,1	-22,3 ± 12,9	519	4,5 ± 0,1	2,1 ± 0,9	/

On notera que ce sont les diamètres moyens obtenus en SAXS qui seront considérés dans la suite de ce manuscrit pour les échantillons dont l'analyse a pu être effectuée, car l'analyse est représentative de la totalité de l'échantillon, contrairement aux observations en TEM.

Les cœurs d'or ont pu être caractérisés en combinant trois techniques différentes. Il a ainsi été montré qu'on avait des morphologies et des tailles comparables d'une synthèse à l'autre. La nature et la longueur des ligands polymères semblent toutefois avoir un impact sur la formation du cœur d'or, puisqu'on note des variations reproductibles dans les diamètres mesurés. Afin de compléter la caractérisation de ces nano-objets, en particulier de leur couronne polymère, nous avons ensuite effectué une étude en diffusion de neutrons aux petits angles.

C. ÉTUDE EN DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES

L'étude en diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA, ou SANS en anglais), a été réalisée au Laboratoire Léon Brillouin, en collaboration avec Giulia Fadda. Le SANS est une technique de diffusion dont le principe, assez similaire à celui du SAXS, repose sur l'interaction élastique des neutrons avec les noyaux de la matière (Annexe D). Le SANS est particulièrement adapté à l'observation de la couronne polymère, car il permet de sonder des échelles allant de 0,5 à 50 nm, mais également parce qu'il est possible de jouer sur le contraste avec le solvant pour distinguer préférentiellement un

constituant de l'objet par rapport à l'autre (ici, par exemple, la couronne polymère plutôt que le cœur d'or). En effet, contrairement au SAXS, les atomes d'hydrogène et de deutérium possèdent des longueurs de diffusion neutronique cohérente très différentes ($b_H = -0,374 \cdot 10^{-12}$ cm et $b_D = +0,667 \cdot 10^{-12}$ cm). Pour observer un polymère hydrogéné, on peut donc travailler en solvant deutéré, afin d'obtenir un contraste maximal. Pour illustrer cette notion de contraste, les densités de longueur de diffusion cohérente des différents composés utilisés dans cette étude sont résumées dans le Tableau II.5.

Tableau II.5 - Densités de longueur de diffusion neutronique cohérente ρ des composés utilisés

Composé	ρ (10^{10} cm ⁻²)
H ₂ O	-0,56
D ₂ O	6,36
Au	4,48
PMAA	1,12
HEMA	0,99
PDMAEMA	0,64
PMAAnBu	0,47
P(PEGMA)	0,77

On peut noter que la densité de longueur de diffusion de l'or est proche de celle de l'eau deutérée. Puisque l'objectif est ici d'étudier la couronne polymère, nous avons donc choisi de travailler avec l'eau deutérée comme solvant, afin de rendre négligeable le signal provenant du cœur d'or. Nous aurions également pu travailler dans un mélange D₂O/H₂O (73%/27%) pour éteindre totalement le signal de l'or, mais les intensités diffusées par les polymères auraient alors été plus faibles (moins bon contraste avec le solvant). Nous reviendrons sur l'impact du signal du cœur par la suite.

Plusieurs solutions de concentrations différentes ont été préparées dans le D₂O pour chaque type de NP (de 3 à 15 mg/mL de NPs). Les mesures ont été effectuées sur trois configurations différentes, permettant de couvrir une large gamme de q ($3 \cdot 10^{-3}$ à $3,5 \cdot 10^{-1}$ Å⁻¹). Les détails des conditions de mesures et des solutions analysées sont donnés en Annexe A. Des exemples de signaux typiquement obtenus pour nos AuNPs greffées polymères sont présentés sur la Figure II.13, dans le cas des Au-PMAA-10,6-B) et Au-PMAA(18,6). Les données avant et après soustraction du signal incohérent γ sont comparées. Les autres courbes sont visibles en Annexe D.

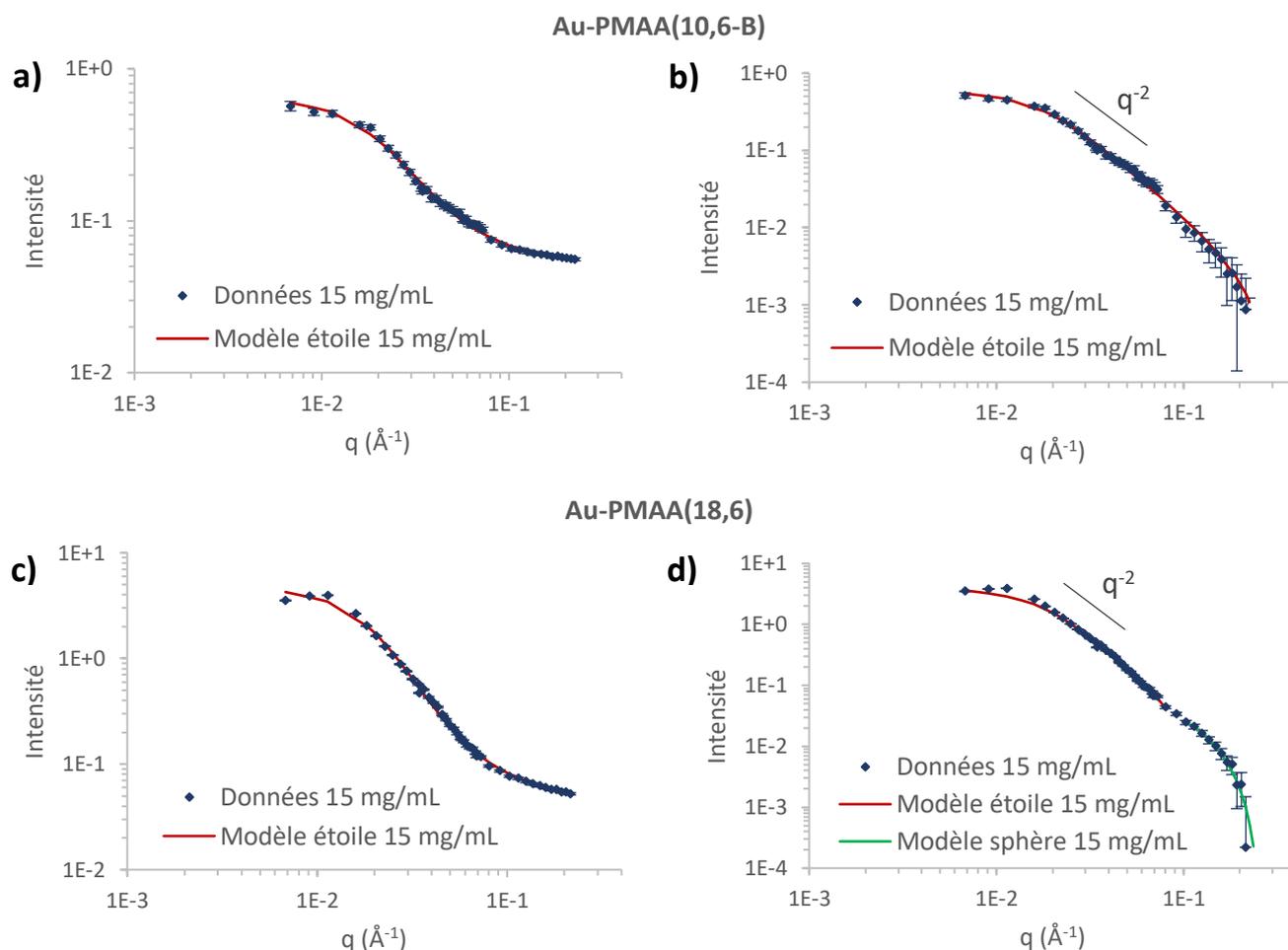


Figure II.13 - Analyses SANS des solutions de NPs dans le D_2O : courbes $I=f(q)$ et ajustement par différents modèles (a) et (b) Au-PMAA(10,6-B), (c) et (d) Au-PMAA(18,6) (a) et (c) Courbes avant soustraction du signal incohérent ; (b) et (d) Courbes après soustraction du signal incohérent

Pour les deux types de NPs présentées sur la Figure II.13, on note sur la gamme de q intermédiaires une décroissance en q^{-2} qui est caractéristique des chaînes polymères libres en solution. Cela indique que la couronne polymère observée est peu compacte. Cette observation est valable pour l'ensemble des NPs étudiées, exceptées les Au-P(PEGMA-MAA), qui présentent une décroissance en $q^{-1,3}$.

On observe pour les Au-PMAA(18,6) une oscillation aux grands angles qui n'est pas présente pour les Au-PMAA(10,6-B). Ce signal correspond a priori au cœur d'or, qui est plus gros dans le cas des Au-PMAA(18,6). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons ajusté le signal sur cette gamme de q par un modèle de sphère similaire à celui utilisé en SAXS (Figure II.13 d). Le diamètre obtenu est de 3,7 nm, contre 4,0 nm d'après les résultats de SAXS, ce qui confirme que le cœur d'or est bien à l'origine de l'oscillation. Ce signal du cœur impacte les modélisations, car il est non négligeable sur les données dont on a soustrait le signal incohérent. Afin de limiter cet impact, nous avons préféré réaliser l'ensemble de notre étude sur les données avant soustraction. Le signal du cœur d'or est alors masqué

par la constante à grands q . Pour les NPs qui ne présentent pas de signal du cœur, nous avons vérifié au préalable que les résultats des modélisations sont similaires avant et après soustraction.

Afin d'illustrer les comportements typiquement obtenus pour nos AuNPs greffées polymères, des exemples de signaux sont présentés ci-dessous : Au-PMAA(10,6-B) sur la Figure II.14a, Au-PMAA(7,4) sur la Figure II.14b, et Au-P(MAnBu-MAA) sur la Figure II.14c.

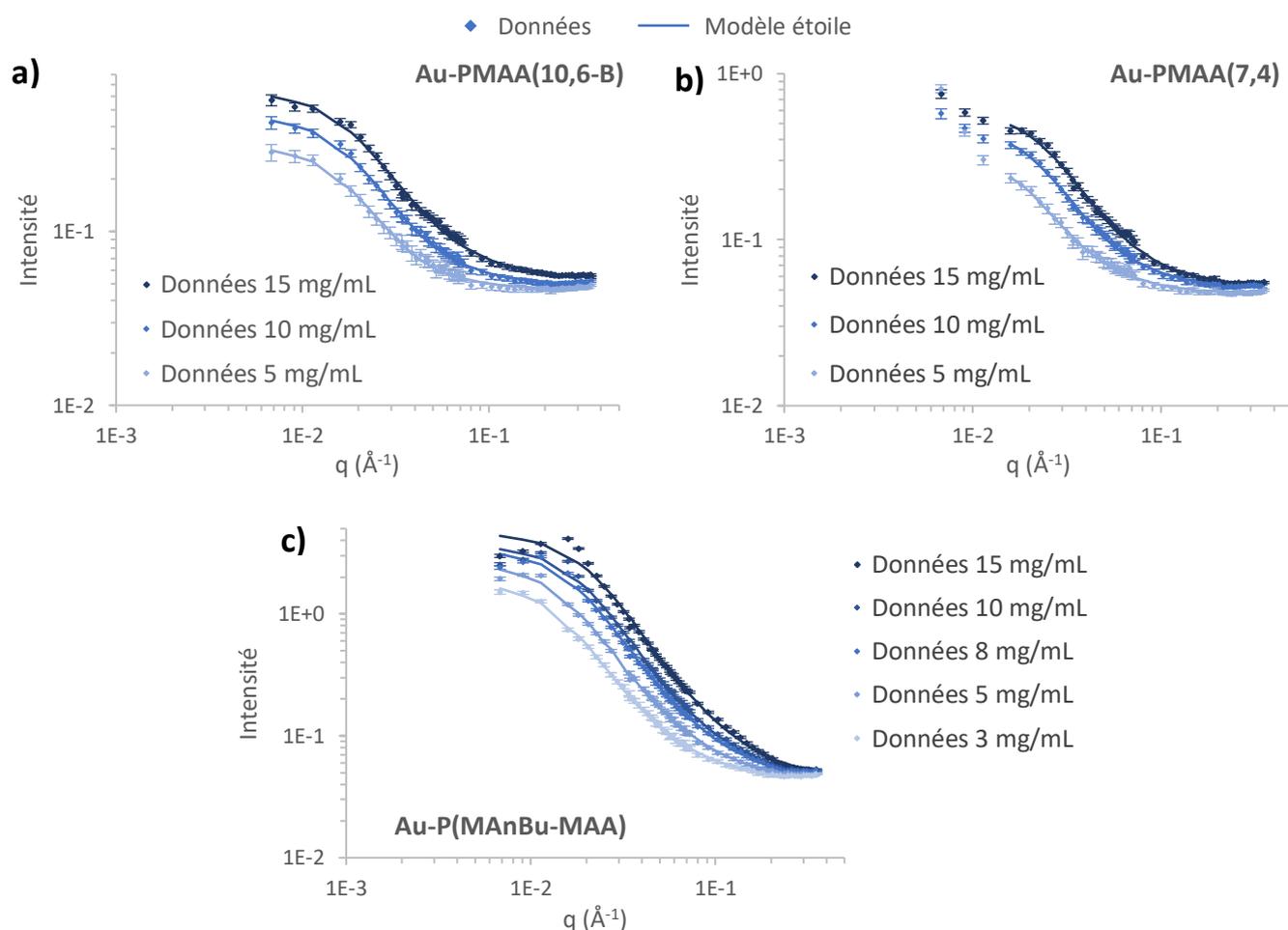


Figure II.14 - Analyses SANS des solutions de NPs dans le D_2O : courbes $I=f(q)$ pour plusieurs concentrations et ajustement par un modèle de polymère en étoile
 (a) Au-PMAA(10,6-B), (b) Au-PMAA(7,4) et (c) Au-P(MAnBu-MAA)

L'allure des courbes est similaire pour toutes les NPs (sauf les Au-P(PEGMA-MAA)) sur l'ensemble de la gamme, excepté aux petits angles ($q < 0,02 \text{ \AA}^{-1}$). Dans ce domaine, les comportements observés diffèrent d'une synthèse à l'autre. Certaines NPs présentent un plateau (Figure II.14 a et c) qui traduit des objets de taille finie, donc non agrégés. D'autres montrent au contraire une remontée du signal sur cette même gamme, ce qui indique une agrégation des objets (Figure II.14b). Enfin, un pic de structure est observé sur certains signaux, comme celui visible sur la Figure II.14c. La présence d'un tel pic montre l'existence d'interactions entre les objets. L'ensemble des comportements observés qualitativement sont résumés dans le Tableau II.6.

Tableau II.6 - Résumé des observations qualitatives issues de l'analyse des NPs par SANS

NP analysée	Agrégation (remontée aux petits angles)	Pic de structure
Au-PMAA(7,4)	Oui Forte remontée, plateau visible	Non
Au-PMAA(10,6-A)	Non	Non
Au-PMAA(10,6-B)	Non	Non
Au-PMAA(18,6)	Non	Oui A forte concentration
Au-PDMAEMA	Oui Forte remontée, sans plateau	Non
Au-P(DMAEMA-MAA)	Oui Forte remontée, sans plateau	Non
Au-P(HEMA-MAA)	Non	Non
Au-P(MAnBu-MAA)	Non	Oui A forte concentration
Au-P(PEGMA-MAA)	Oui Faible remontée, plateau visible	Non

Pour déterminer la taille des objets, nous avons tout d'abord utilisé l'approximation de Guinier, qui considère que lorsque q^{-1} est très grand par rapport à la taille de l'objet (soit $qR_g < 1$), le facteur de forme ne dépend plus de la forme de l'objet mais uniquement de son rayon de giration. Dans cette gamme de q , appelée domaine Guinier, le facteur de forme peut donc s'écrire selon l'expression suivante :

$$P(q) \approx \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (\text{II. 2})$$

On peut ainsi modéliser les courbes par cette expression dans la gamme de q concernée, ce qui permet de remonter au rayon de giration des objets. Les valeurs obtenues pour chaque type de NP sont résumées dans le Tableau II.7. Cette modélisation n'a pas été appliquée pour les échantillons qui présentaient une remontée aux petits angles sans plateau visible, car elle n'est alors plus valable. Pour les autres échantillons, on trouve des rayons de giration de 4 à 10 nm environ.

Afin de prendre en compte l'ensemble du diagramme de diffusion et ainsi avoir accès à d'autres caractéristiques de la couronne, comme la densité des chaînes greffées, nous avons ensuite cherché à appliquer un modèle. En considérant la petite taille du cœur d'or par rapport à la longueur des chaînes polymères, la géométrie qui semble le mieux correspondre est le modèle d'étoile, développé par Benoît.¹⁰³ Le facteur de forme correspondant s'écrit :

$$P(q) = \frac{2}{fv^2} \left[v - 1 + \exp(-v) + \frac{f-1}{2} (1 - \exp(-v))^2 \right] \quad (II.3)$$

$$\text{où } v = \frac{\langle R_g^2 \rangle q^2 f}{3f - 2}$$

avec R_g le rayon de giration et f le nombre de branches de l'étoile. Le modèle suppose qu'il n'y a aucune interaction intra-branche ou inter-branches.

Ce modèle d'étoile a permis un bon ajustement des courbes, comme on peut le voir sur la Figure II.14, où les modélisations des différentes concentrations de NPs sont représentées avec les données correspondantes. Le modèle n'a cependant pas pu être appliqué aux Au-PDMAEMA et Au-P(DMAEMA-MAA) car aucun plateau n'est visible aux petits angles, ni aux Au-P(PEGMA-MAA), qui présente une allure de signal différente des autres. On a pu déterminer pour toutes les autres NPs le rayon de giration et le nombre de branches de l'étoile, qui représente ici le nombre de chaînes polymères greffées par NP (Tableau II.7). On peut noter que les rayons de giration obtenus par l'approximation de Guinier sont généralement plus faibles que ceux déterminés par le modèle d'étoile, mais suivent des tendances similaires d'une NP à l'autre. A partir du nombre de branches et du rayon du cœur déterminé précédemment en SAXS ou TEM, une densité de greffage a en outre pu être calculée.

En effectuant la modélisation sur chaque concentration analysée, on obtient cependant des écarts sur les valeurs résultantes, notamment un rayon de giration qui augmente lorsque la concentration diminue. Cette évolution pourrait traduire un repliement des chaînes polymères à forte concentration, par effet d'encombrement stérique entre les NPs. Puisque les concentrations utilisées ici sont bien supérieures à celles appliquées dans les tests biologiques (0,5 mg/mL de NPs environ au maximum), l'échantillon le plus représentatif serait le plus dilué. Toutefois, les intensités mesurées sont plus faibles pour cet échantillon, ce qui implique une augmentation des incertitudes sur la modélisation. C'est donc l'analyse de la concentration intermédiaire qui a été retenue comme référence pour chaque type de NP, et dont les résultats sont résumés dans le Tableau II.7. L'ensemble des résultats de modélisation pour toutes les NPs et toutes les concentrations sont disponibles en Annexe D.

On perçoit ainsi les limites du modèle d'étoile, qui ne prend en compte ni les interactions pouvant exister au sein des ligands d'une même NP, ni celles entre les ligands de plusieurs NPs, qui ne sont plus

négligeables à forte concentration. L'apparition de pics de structure tels que celui visible sur la Figure II.14c peut typiquement fausser la modélisation. C'est pourquoi nous avons choisi de considérer les concentrations les plus faibles dans le cas des Au-PMAA(18,6) et Au-P(MAnBu-MAA), qui présentent tous deux des pics de structure à forte concentration. Ces deux NPs génèrent par ailleurs un signal de forte intensité, limitant ainsi les incertitudes sur la modélisation à basse concentration.

Tableau II.7 - Résumé des caractéristiques structurales obtenues par analyse des NPs par SANS : approximation de Guinier et modèle d'étoile

NP analysée	Concentration utilisée (mg/mL)	R_g Guinier (nm)	R_g Etoile (nm)	Nombre de branches	Densité de greffage (chaînes/nm ²)
Au-PMAA(7,4)	10	/	7,4 ± 0,4	3,8 ± 0,5	0,16
Au-PMAA(10,6-A)	10	7,3 ± 0,9	8,5 ± 0,3	3,7 ± 0,4	0,15
Au-PMAA(10,6-B)	10	7,3 ± 1,0	8,5 ± 0,4	3,6 ± 0,5	0,11
Au-PMAA(18,6)	5	10,4 ± 1,0	11,5 ± 0,2	7,4 ± 0,4	0,14
Au-PDMAEMA	/	/	/	/	/
Au-P(DMAEMA-MAA)	/	/	/	/	/
Au-P(HEMA-MAA)	5	12,1 ± 0,3	13,0 ± 0,6	3,5 ± 0,4	0,12
Au-P(MAnBu-MAA)	3	9,8 ± 1,1	11,5 ± 0,3	4,2 ± 0,2	0,13
Au-P(PEGMA-MAA)	10	3,7 ± 0,3	/	/	/

A partir des valeurs rassemblées dans le Tableau II.7, on peut tout d'abord remarquer que la reproductibilité de la synthèse est à nouveau mise en évidence par la similarité des paramètres obtenus pour les deux lots de Au-PMAA(10,6). D'autre part, si l'on compare les trois longueurs de PMAA, on observe bien une augmentation progressive du rayon de giration lorsque la masse molaire du ligand polymère augmente. Les Au-PMAA(7,4) sont cependant les seules qui ont tendance à s'agréger, ce qui pourrait s'expliquer par une stabilisation des objets moins efficace, du fait de la plus petite taille des chaînes polymères en surface. Concernant le nombre de branches, la valeur élevée obtenue pour les Au-PMAA(18,6) peut s'expliquer par la taille plus importante du cœur d'or. Cela se traduit d'ailleurs sur les densités de greffage, qui sont très proches pour l'ensemble des Au-PMAA.

Concernant les copolymères, les Au-P(HEMA-MAA) et Au-P(MAnBu-MAA) présentent des rayons de giration et des densités de greffage similaires à ceux des Au-PMAA. Les Au-P(PEGMA-MAA) semblent quant à elles caractérisées par un petit rayon de giration, ce qui est assez inattendu, considérant la nature branchée du PEGMA et le grand nombre de monomères par ligand (voir Tableau II.2, page 60). Cette petite taille pourrait s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène entre les fonctions éthers des chaînes PEG et les acides carboxyliques du PMAA. Plusieurs études portant sur ce type de copolymère P(PEGMA-MAA) ont en effet montré un phénomène de complexation à pH acide.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Les zones complexées deviennent ainsi hydrophobes (Figure II.15). La petite taille des Au-P(PEGMA-

MAA) pourrait donc s'expliquer par un repliement important des chaînes, dû à ce phénomène de complexation.

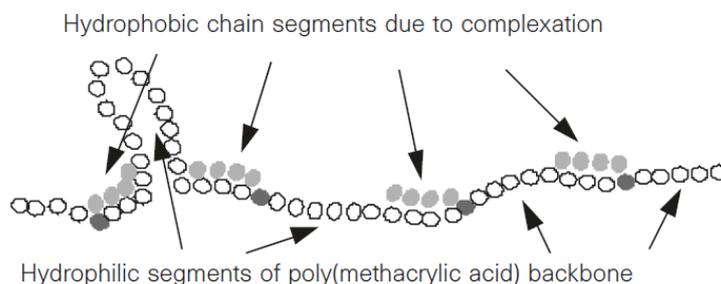


Figure II.15 - Schématisation du phénomène de complexation à pH acide du copolymère P(PEGMA-MAA)¹⁰⁴

Concernant les pics de structure visibles sur les Au-P(MAnBu-MAA), on peut formuler l'hypothèse que la présence de monomères hydrophobes dans les ligands entraîne une structuration des objets au contact de l'eau. L'apparition de pics de structure aux fortes concentrations de Au-PMAA(18,6) semble plus complexe à expliquer, d'autant qu'elle ne concerne pas les autres Au-PMAA. Cela pourrait provenir d'une interaction accrue des NPs due à une longueur de chaîne plus importante, ou du cœur plus gros qui serait plus difficile à stabiliser. On peut noter que ces phénomènes de structuration à forte concentration ne sont pas détectables en UV-visible, puisqu'aucun déplacement ou élargissement de pic n'est observé d'une concentration à l'autre, comme on pourrait s'y attendre.¹⁰⁷

L'étude en SANS a ainsi permis de caractériser la couronne polymère de nos NPs. L'utilisation d'un modèle d'étoile semble appropriée pour de tels objets et a permis d'obtenir directement le nombre de ligands polymères greffés par NP. Les densités de greffage mesurées sont très proches de celles obtenues précédemment au laboratoire sur des objets similaires.¹ La taille globale des NPs a également pu être déterminée, avec des rayons de giration allant de 3,5 à 13 nm.

Le cœur d'or et la couronne polymère ont donc été caractérisés finement pour chaque NP synthétisée, notamment par des techniques de diffusion de rayonnements aux petits angles. Outre l'utilité de connaître ces paramètres pour la suite du travail, la bonne reproductibilité du protocole de synthèse a pu être mise en évidence.

IV. GREFFAGES POST-SYNTHÈSE

La couronne polymère fournissant un excellent point d'accroche, elle a été exploitée pour greffer différents composés sur les NPs : un agent de chimiothérapie et des protéines. L'objectif, dans le premier cas, est de coupler chimiothérapie et propriétés radiosensibilisantes des NPs, tandis que le greffage de protéines pourrait permettre de cibler certaines tumeurs.

La méthode de greffage sur les chaînes PMAA par formation d'une liaison amide a été utilisée dans les deux cas. Ce type de couplage entre une amine et un acide carboxylique est une réaction classiquement utilisée pour greffer différents composés. Elle nécessite l'utilisation d'agents de couplage, qui permettent de former un ester activé. Le duo EDC/NHS (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide/N-hydroxysuccinimide) est un des plus utilisés lorsque le greffage est effectué en phase aqueuse car ces deux molécules sont solubles dans l'eau.^{108,109} Cette méthode est ainsi souvent exploitée pour greffer des biomolécules. Dans le cas des protéines et peptides, elle nécessite que les séquences contiennent des lysines, qui est le seul acide aminé présentant une fonction amine primaire sur sa chaîne latérale.

Cette approche a déjà été mise en œuvre par le passé au laboratoire pour greffer des enzymes sur des nano-objets analogues (nanoparticules de platine greffées de PMAA).^{80,110} La méthode développée a été reprise ici dans le cas de deux protéines, et a également été appliquée au greffage de la doxorubicine.

A. ASSOCIATION AVEC LA CHIMIOTHÉRAPIE : GREFFAGE DE LA DOXORUBICINE

La doxorubicine, également appelée adriamycine, est un médicament de chimiothérapie fréquemment utilisé dans le traitement de nombreux cancers, qui fait partie de la famille des anthracyclines. Sa structure est représentée sur la Figure II.16. D'après la base de données publique des médicaments, son utilisation est indiquée pour les carcinomes du sein, les cancers du poumon, de la vessie, des ovaires, de l'estomac, les sarcomes des os et tissus mous, les leucémies aiguës et chroniques, les lymphomes, ou encore les tumeurs solides de l'enfant.¹¹¹ Actuellement, les principales limitations à son utilisation sont l'émergence d'une résistance au médicament chez les cellules tumorales, et surtout son effet cardiotoxique important.¹¹²

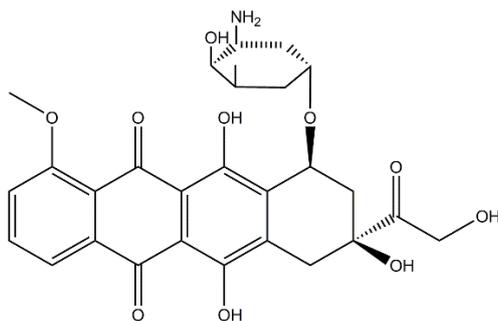


Figure II.16 - Structure chimique de la doxorubicine

Malgré son utilisation fréquente, les mécanismes de toxicité de la doxorubicine ne sont pas encore bien compris aujourd'hui. Parmi les voies identifiées, on distingue notamment la production de radicaux libres qui peuvent entraîner un stress oxydatif et des altérations de la membrane ou de l'ADN, ainsi que l'intercalation des molécules de doxorubicine dans l'ADN, phénomène induisant la torsion de ce dernier et la déstabilisation des nucléosomes.^{112,113}

La doxorubicine est souvent utilisée comme agent de chimiothérapie modèle dans la littérature du *drug delivery*.¹¹⁴ Elle a notamment été associée par encapsulation, adsorption, intercalation ou par greffage covalent à différents types de nanoparticules : métalliques,^{114,115} polymères,¹¹⁶⁻¹¹⁸ liposomes,^{119,120} etc. Dans le cas des liaisons covalentes, plusieurs techniques ont été rapportées, dont le greffage par formation d'une liaison amide,^{121,122} que nous avons choisi ici. Les autres types de liaisons ont été exploitées pour leur capacité de scission à pH acide : hydrolyse des liaisons hydrazone,^{23,123,124} imine¹¹⁵ et ester,¹²⁵ ou réduction par une enzyme des ponts disulfure.¹²⁶ Cette propriété est souvent recherchée dans le cadre du traitement du cancer,¹²⁷ et ce pour deux raisons distinctes : d'une part, les tumeurs sont caractérisées par un pH plus acide que les zones saines,¹²⁸ et d'autre part, les nanoparticules sont souvent internalisées dans des organelles cellulaires à caractère acide, les lysosomes.^{129,130} Ainsi, une liaison hydrolysable à pH acide peut favoriser la délivrance de la doxorubicine au sein de la tumeur¹³¹ mais aussi permettre sa libération à l'intérieur des cellules.¹²³

Dans notre étude, puisque nous disposons d'acides carboxyliques sur les ligands PMAA greffés, la méthode par couplage acide/amine permet d'effectuer le greffage en une seule réaction. Au contraire, les greffages impliquant des liaisons sensibles au pH nécessitent souvent de nombreuses étapes préliminaires. En outre, cela permettra d'utiliser la méthode développée pour le greffage d'enzymes sur des NPs, comme dit précédemment.^{80,110}

La réaction est effectuée sur les Au-PMAA(10,6-B) dans un tampon phosphate de pH 7,8 à température ambiante. Elle est réalisée en deux temps (Figure II.17) : activation des acides carboxyliques avec EDC/NHS pendant 2 heures avec un rapport COOH/NHS/EDC fixé à 5/1/1, puis ajout de la doxorubicine.

La quantité introduite correspond à une molécule de doxorubicine pour 40 fonctions acides environ, ou encore 3,8 molécules par chaîne PMAA. Après 24 heures de réaction, les réactifs résiduels sont éliminés par dialyse avec un seuil de coupure de 3,5 kDa.

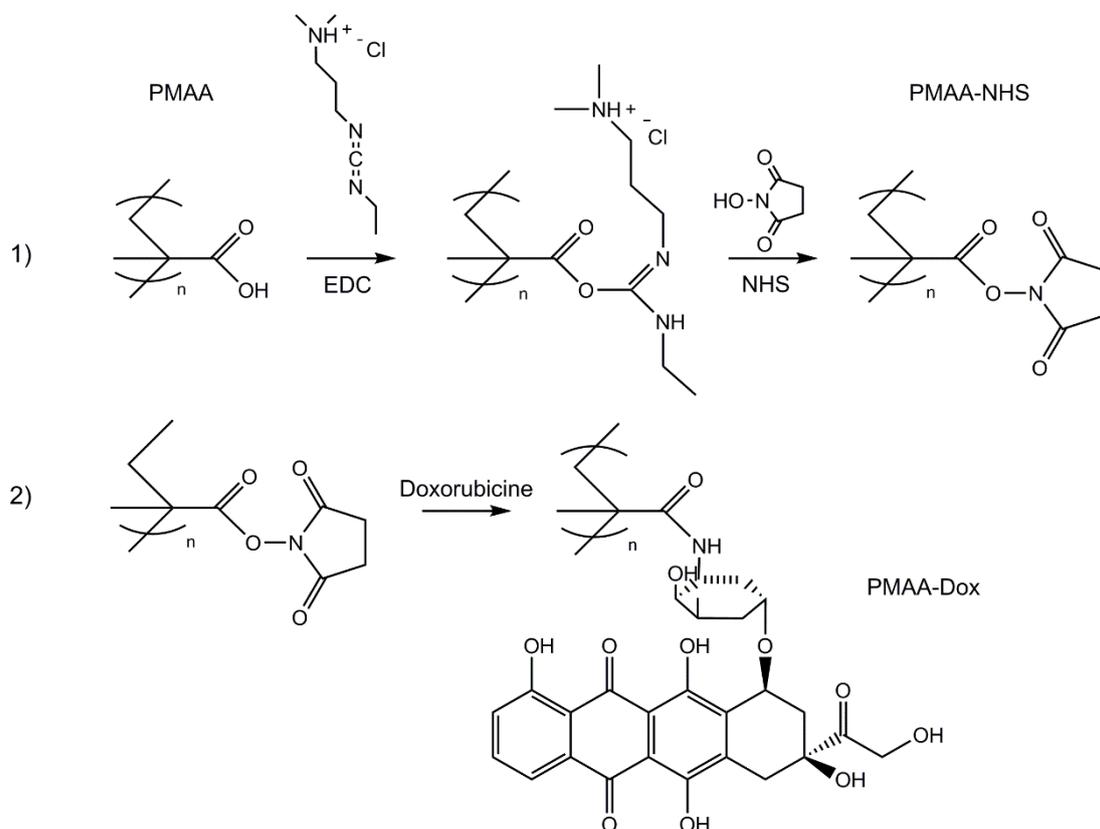


Figure II.17 - Greffage de la doxorubicine sur le PMAA par formation d'une liaison amide via un couplage EDC/NHS

La quantité de doxorubicine greffée a pu être évaluée par spectroscopie UV-visible car la doxorubicine, de couleur rouge, possède des pics d'absorption caractéristiques à 234 nm et 500 nm (spectre sur la Figure II.18).¹³² Une courbe d'étalonnage a été effectuée en préparant une gamme de solutions de doxorubicine avec des concentrations allant de 1 à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Afin de prendre en compte le signal des NPs, les solutions contiennent également une concentration constante de Au-PMAA égale à celle des Au-PMAA-Dox dans la solution à analyser. La courbe d'étalonnage obtenue, ainsi que les spectres des Au-PMAA sans et avec doxorubicine, libre ou greffée, sont présentés sur la Figure II.18. La comparaison des spectres de Au-PMAA et Au-PMAA-Dox permet de mettre en évidence la présence de la doxorubicine, avec l'apparition de ses pics caractéristiques. Le spectre est par ailleurs très similaire à celui de la solution Au-PMAA + Dox libre. Il est cependant possible que la présence de la doxorubicine ait un impact sur le pic plasmon des NPs.

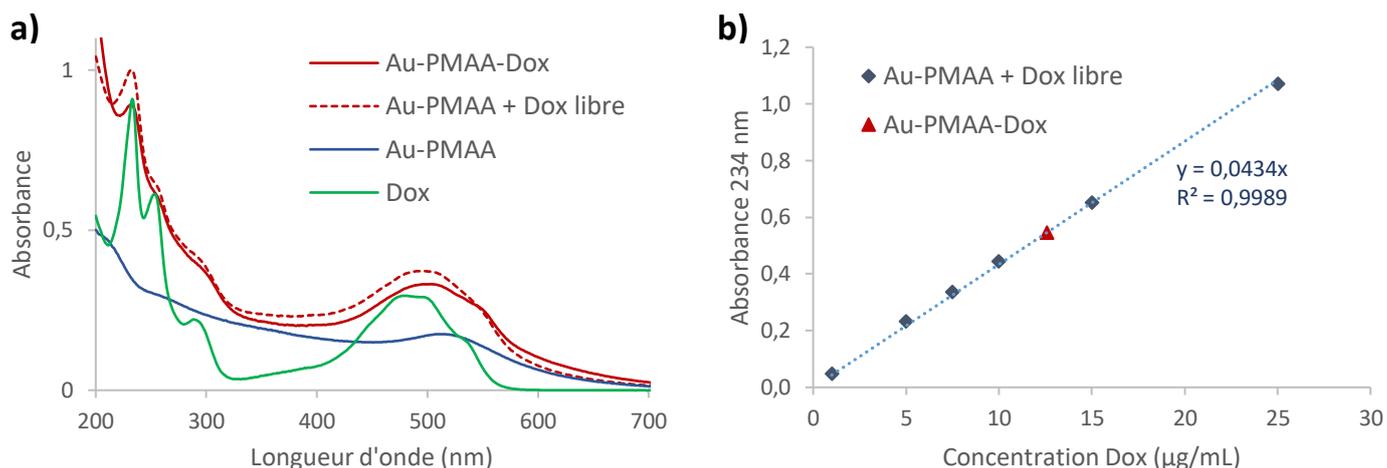


Figure II.18 - Caractérisation en UV-visible du greffage de la doxorubicine : (a) Spectres d'absorbance de Au-PMAA-Dox (0,13 mg/mL), Au-PMAA + Dox libre (0,13 mg/mL Au-PMAA + 15 µg/mL Dox), Au-PMAA (0,13 mg/mL) et Dox (15 µg/mL) ; (b) Courbe d'étalonnage obtenue pour Au-PMAA + Dox et positionnement de Au-PMAA-Dox sur cette courbe

A partir d'une régression linéaire de la courbe d'étalonnage, et en tenant compte de la dilution de la solution analysée, la concentration de Dox greffée a pu être estimée à 12,6 µg/mL, pour une concentration en Au-PMAA de 0,13 mg/mL. Le taux de greffage est évalué à 75%, ce qui montre une bonne efficacité de la méthode par couplage EDC/NHS. A partir de ces résultats, la proportion de doxorubicine greffée a pu être estimée à 2,9 Dox/chaîne polymère. Si l'on suppose que le greffage s'est effectué de manière équivalente sur les chaînes libres et les chaînes greffées, en considérant les résultats obtenus en SANS, on obtient donc une quantité moyenne de 10 molécules de doxorubicine par NP. Par la suite, il pourrait être intéressant d'augmenter le ratio initial doxorubicine/chaîne PMAA, afin de déterminer si le taux de greffage reste identique pour des ratios plus élevés, ou bien si la quantité qu'il est possible de greffer est limitée.

Ainsi, la méthode de greffage par couplage EDC/NHS semble bien adaptée au greffage sur les chaînes PMAA de petites molécules présentant une fonction amine. Elle a permis d'associer un agent anticancéreux avec nos NPs, ouvrant la possibilité de combiner leurs propriétés respectives en chimiothérapie et radiosensibilisation, à condition que le greffage ne nuise pas aux propriétés cytotoxiques de la doxorubicine, ce qui sera vérifié dans le chapitre suivant. De manière générale, le greffage pourrait être appliqué à d'autres agents thérapeutiques, dans la perspective d'améliorer la solubilité en phase aqueuse de médicaments par exemple. En effet, de nombreux médicaments sont hydrophobes (plus de 40% des molécules avec autorisation de mise sur le marché¹³³). La méthode est également tout à fait adaptée au greffage de biomolécules, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

B. GREFFAGE DE PROTÉINES : BSA ET LACTOFERRINE

Dans la littérature du traitement du cancer, le greffage de biomolécules en surface de nanoparticules a fait l'objet de nombreuses publications, pour des applications de biocapteurs,^{110,134} de ciblage actif de nanothérapeutiques,¹³⁵ ou de vectorisation de biomolécules possédant elles-mêmes des propriétés thérapeutiques.¹³⁶ Dans ce travail, nous avons étudié le greffage de deux protéines, l'albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumine en anglais*, ou BSA) et la lactoferrine.

1. La BSA comme protéine modèle

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au greffage de la BSA, qui est une protéine couramment utilisée en biologie et qui a servi ici de protéine modèle. Le but était ainsi d'évaluer l'efficacité et la qualité du greffage obtenu via la même méthode que celle utilisée pour la doxorubicine. La BSA contient en effet dans sa séquence peptidique 59 lysines, par lesquelles le greffage peut s'effectuer. Le protocole appliqué est identique à celui décrit précédemment, mais une quantité moindre de BSA (une protéine pour 12 chaînes PMAA) a été introduite dans le milieu réactionnel, car la protéine possède une taille bien plus importante que la doxorubicine (la masse molaire de la BSA est de 66 kg/mol alors que celle du médicament est de 544 g/mol). La structure de la BSA est représentée sur la Figure II.19. Elle est modélisée par un ellipsoïde de révolution prolate, de dimensions 14,1 x 4,2 nm,¹³⁷ ce qui la rend de taille comparable aux NPs sur lesquelles on cherche à la greffer. Pour des raisons d'encombrement stérique, il ne sera donc pas possible d'en greffer un nombre important par NP.

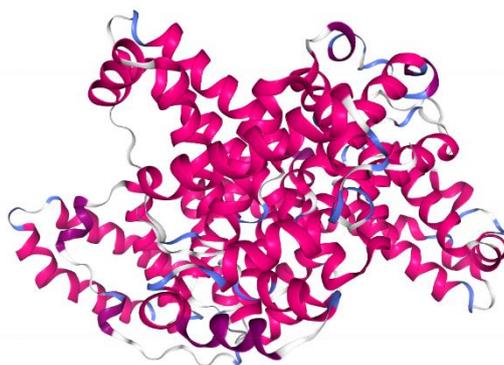


Figure II.19 - Structure 3D de la BSA ^{138,139}

Les couleurs correspondent aux différents éléments de la structure secondaire : hélices α en rose, feuillets β en jaune, coudes en bleu.

Une fois la réaction de greffage effectuée, la purification est réalisée en deux temps : dialyses avec un seuil de coupure de 3,5 kDa comme pour la doxorubicine, afin d'éliminer les molécules de NHS et EDC restantes, puis utilisation d'un tube concentrateur avec un seuil de coupure de 100 kDa pour éliminer la BSA non greffée. Il a été vérifié au préalable par spectroscopie UV-visible que ce seuil permettait de

laisser passer la BSA lorsqu'elle était seule en solution. On note toutefois une petite perte de signal après centrifugation, probablement due à l'adsorption d'une partie des protéines sur la membrane.

Deux techniques d'analyse ont été testées pour évaluer la quantité de BSA greffées : spectroscopie UV-visible (absorbance à 280 nm et test colorimétrique de Bradford) et dichroïsme circulaire.

a. Caractérisation du greffage par spectroscopie UV-visible

La première stratégie a été d'utiliser à nouveau l'identification de pics d'absorption caractéristiques en spectroscopie UV-visible. Le spectre d'absorbance de la BSA présente en effet un pic à 280 nm, caractéristique de la plupart des protéines car lié à la présence de 3 acides aminés possédant des cycles aromatiques : tryptophane, tyrosine et phénylalanine.¹⁴⁰ Cependant, aucun pic marqué n'est visible dans cette zone sur le spectre des Au-PMAA-BSA (Figure II.20), on y discerne uniquement un épaulement qui ne permet en aucun cas de valider la présence de BSA ni de remonter à une quantité de protéine. La solution (appelée filtrat) passée à travers la membrane du tube concentrateur lors de la purification a également été analysée, et son spectre ne présente pas non plus de pic à 280 nm (Figure II.20). Il n'y a donc pas de protéine dans ce filtrat. Ce résultat laisse donc supposer que la BSA est restée dans l'échantillon contenant les NPs, soit sous forme greffée, soit en forte interaction avec elles, mais que sa faible quantité ne permet pas de la détecter avec certitude en UV-visible, à cause d'un signal des NPs élevé aux basses longueurs d'onde.

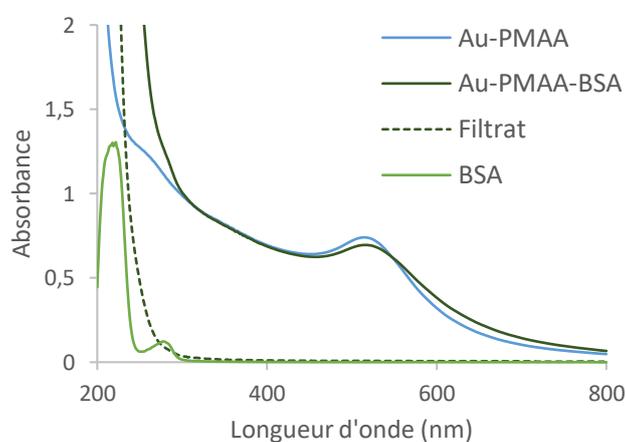


Figure II.20 - Caractérisation en UV-visible du greffage de la BSA : Spectres d'absorbance de Au-PMAA-BSA (0,5 mg/mL), Au-PMAA (0,5 mg/mL), du filtrat (non dilué), et de la BSA (concentration équivalente à celle utilisée pour le greffage)

Puisqu'aucune quantification n'a été possible via la simple mesure des spectres UV-visible, la deuxième stratégie a été d'utiliser une méthode de quantification indirecte des protéines, ici la méthode Bradford,¹⁴¹ également basée sur des mesures d'absorbance et classiquement utilisée en biologie pour quantifier une protéine. Le principe de ce test repose sur l'interaction du Bleu de Coomassie G-250 avec les protéines, plus précisément avec leurs acides aminés basiques. Cette complexation provoque un changement de couleur qui traduit le passage du composé d'une forme anionique rouge à une

forme cationique bleue. La mesure de l'absorbance à 595 nm permet donc de remonter à la quantité de protéine présente dans l'échantillon à partir d'une courbe d'étalonnage.^{141,142} Dans notre cas, le test a d'abord été réalisé directement sur les NPs greffées, mais on observe une précipitation des NPs lorsqu'elles sont mises en contact avec la solution contenant le colorant. Le filtrat a également été analysé, mais la concentration en BSA est trop faible pour être correctement quantifiée. Qualitativement, ce test semble toutefois confirmer la présence de BSA greffée, puisqu'une coloration bleue a été observée à la surface des NPs.

b. Caractérisation du greffage par dichroïsme circulaire

Une stratégie alternative a donc été développée pour doser la BSA, en utilisant le signal de dichroïsme circulaire (DC) qui lui est propre. La technique d'analyse du DC se base sur la propriété des molécules chirales à absorber différemment les lumières polarisées circulairement droite et gauche. Celle-ci est mesurée par l'ellipticité θ (exprimée en millidegrés) de la polarisation en sortie de l'échantillon. Dans le cas des protéines, c'est leur structure secondaire qui va principalement être à l'origine de leur signal en dichroïsme circulaire. Les hélices α et les feuillets β vont par exemple générer des spectres très différents. Ainsi, les hélices α sont caractérisées par la présence de trois bandes, deux négatives à 222 et 208 nm, et une positive à 190 nm, qui correspondent toutes à des transitions électroniques du lien peptidique.^{143,144}

La BSA est une protéine majoritairement constituée d'hélices α (représentées en rose sur la Figure II.19), et l'on retrouve bien les différentes bandes caractéristiques dans son spectre de DC (Figure II.21a).¹⁴⁵ Lorsqu'on ajoute dans le milieu des Au-PMAA, qui ne génèrent aucun signal elles-mêmes, la forme du spectre est conservée mais l'intensité des bandes est légèrement diminuée (Figure II.21a). Cette différence d'intensité témoigne de l'existence d'interactions entre la protéine libre et les NPs, elle sera discutée dans la suite de cette partie. Les Au-PMAA-BSA ont également été analysées en DC, et leur spectre présente lui aussi les bandes caractéristiques de la BSA, contrairement au filtrat, qui ne produit aucun signal (Figure II.21b). Ce résultat confirme ceux obtenus en UV-visible : étant donné que le filtrat ne contient pas de BSA (ou trop peu pour être détectée), la quasi-totalité de la BSA introduite lors du greffage est donc greffée ou en interaction suffisamment forte avec les NPs pour ne pas être éliminée par centrifugation.

De manière générale, on peut noter que le bruit observé avant 200 nm (visible sur l'encart de la Figure II.21b en particulier) traduit l'application d'une tension élevée au niveau du photomultiplicateur, qui s'explique souvent par la compensation d'une forte absorbance.¹⁴⁴ Cette observation est cohérente avec les spectres UV-visible du filtrat et des échantillons contenant des NPs, pour lesquels l'absorbance semble augmenter en-dessous de 250 nm (Figure II.20). Cette forte absorption pourrait provenir des

acides carboxyliques du ligand PMAA.¹⁴⁴ Seule la gamme au-delà de 200 nm sera donc considérée pour la suite des analyses de dichroïsme circulaire.

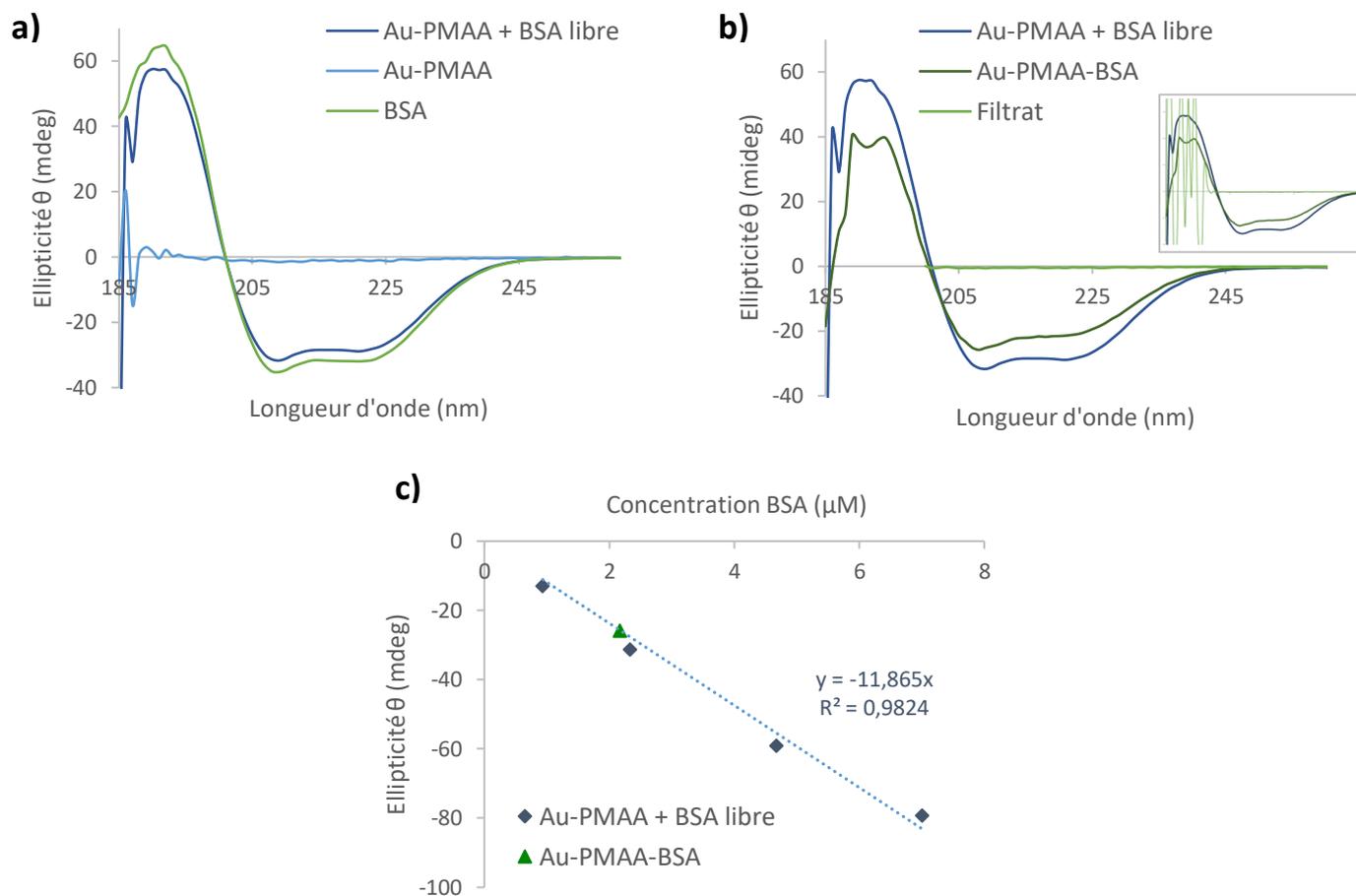


Figure II.21 - Caractérisation en dichroïsme circulaire du greffage de la BSA :

(a) Spectres DC de Au-PMAA + BSA libre (0,55 mg/mL Au-PMAA + 2,5 μM BSA), Au-PMAA (1,1 mg/mL) et BSA (2,5 μM) ;
 (b) Spectres DC de Au-PMAA + BSA libre (0,55 mg/mL Au-PMAA + 2,5 μM BSA), Au-PMAA-BSA (0,55 mg/mL) et du filtrat (ce dernier est coupé en-dessous de 200 nm pour plus de clarté) - Encart : dézoom pour visualiser la totalité du spectre du filtrat;
 (c) Courbe d'étalonnage obtenue en dichroïsme circulaire pour Au-PMAA + BSA libre et positionnement de Au-PMAA-BSA sur Estimationcette courbe

A partir du signal de la BSA en DC, on a cherché à estimer la quantité présente dans l'échantillon Au-PMAA-BSA. Cette méthode avait déjà été utilisée par Li *et al.* pour estimer la quantité de protéines adsorbées ou conjuguées à plusieurs types de NPs.¹⁴⁶ Dans notre cas, la courbe d'étalonnage a été effectuée avec une concentration variable de BSA et une concentration en Au-PMAA gardée constante, afin de prendre en compte l'impact de la présence des NPs sur le signal. La quantité de Au-PMAA à mettre en présence a été déterminée à partir des mesures réalisées en ICP-MS, qui ont permis d'obtenir le %_wAu de l'échantillon Au-PMAA-BSA. Pour réaliser l'étalonnage, la bande à 208 nm a été préférée à celle à 222 nm car elle est plus intense. La courbe obtenue est présentée sur la Figure II.21c. A partir de la régression linéaire effectuée, on a pu estimer une concentration de BSA de 2,2 μM pour une concentration de NPs de 0,55 mg/mL. Ces résultats correspondent à une proportion d'une BSA greffée toutes les 15 chaînes PMAA. Il est cependant difficile de traduire cette valeur en un nombre de

BSA par NP, car l'encombrement stérique des NPs a pu favoriser le greffage de la protéine sur les chaînes libres.

Dans tous les cas, cette quantification reste une estimation, car il est possible que le greffage induise une réduction du signal dichroïque par rapport à l'interaction non-covalente qui caractérise le système utilisé pour la courbe d'étalonnage (Au-PMAA + BSA libre). En effet, la quantité de BSA détectée dans l'échantillon correspond à 75% de la quantité initialement introduite. Sachant qu'aucun signal n'a été détecté dans le filtrat, trois hypothèses peuvent être formulées : une partie de la BSA non greffée est restée adsorbée sur la membrane du tube concentrateur ; ou bien le greffage entraîne une réduction du signal en DC, et donc une sous-estimation de la quantité de BSA greffée ; ou encore les 25% restants sont bien présents dans l'échantillon mais sous forme déstructurée, donc non visibles en DC.

Au-delà de la quantification des protéines greffées, cette étude en dichroïsme circulaire permet également de s'intéresser à l'impact sur la structure secondaire de la BSA des interactions non-covalentes et covalentes entre la protéine et les NPs. Le cas des interactions non-covalentes nous intéresse aussi car il constitue ici notre référence pour la quantification. De plus, la BSA étant un composant majeur du sérum utilisé pour compléter les milieux de culture cellulaire, cela permet d'obtenir un premier aperçu de l'impact des NPs sur un système biologique représentatif.

Dans la littérature, les études en DC concernent surtout des mélanges NPs-protéines, elles se situent donc dans le cas d'interactions non-covalentes. Certaines rapportent une diminution de l'intensité du signal DC, en particulier pour la BSA adsorbée sur des AuNPs par interactions électrostatiques.¹⁴⁷ Slocik *et al.* observent eux aussi un signal réduit, à la fois pour des peptides liés de manière covalente et non-covalente à des AuNPs. Ils émettent deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : un changement conformationnel du peptide et/ou un transfert d'énergie du peptide à la NP. Cette deuxième hypothèse semble confirmée par leur modélisation théorique du système.¹⁴⁸ D'autres études avec la HSA (*Human Serum Albumine*) ont au contraire montré que l'interaction (non-covalente) protéine/AuNPs n'induisait aucun changement dans le spectre DC, et donc dans la structure secondaire de la protéine.^{146,149} Ces différences d'observations pourraient provenir de la variation de taille des NPs, comme le montrent Jiang *et al.* dans leur étude. Ils observent en effet une diminution de l'intensité du signal DC de la protéine cytochrome c lorsqu'elle interagit avec des AuNPs de 16 nm de diamètre, mais une augmentation avec des AuNPs de 2-4 nm de diamètre.¹⁵⁰

Dans notre cas, comme cela a été dit précédemment, on observe une diminution du signal dichroïque de la BSA lors de l'ajout des NPs dans le milieu. Un résultat qui semble aller à l'encontre de la classification établie par Jiang *et al.*, car si l'on raisonne en termes de taille, le diamètre réduit du cœur

d'or de nos NPs devrait les classer dans la même catégorie que celles de 2-4 nm décrites dans leur étude. Cependant, l'article concerne des AuNPs recouvertes de citrates et la présence sur nos NPs de la couronne de polymère rend la comparaison difficile. En outre, plusieurs études ont également rapporté l'existence d'interactions entre la BSA ou la HSA et des polymères présentant des acides carboxyliques.^{151,152} Ainsi, la BSA libre peut aussi bien interagir avec le cœur d'or qu'avec les chaînes polymères. Dans le cas de la BSA greffée, on peut remarquer que l'allure de son spectre DC est très similaire à celui de Au-PMAA + BSA libre, mais que le rapport $\theta_{222}/\theta_{208}$ se trouve légèrement modifié (Tableau II.8). Cela confirme que l'effet de la présence des NPs n'est pas identique pour les deux échantillons, et que la structure secondaire de la BSA subit des modifications fines lors du greffage.

Pour tenter de mieux comprendre les effets du greffage et de l'interaction non-covalente entre BSA et NPs, une analyse plus approfondie des spectres a été réalisée par la méthode intitulée *Beta Structure Selection* (BeStSel), développée par Micsonai *et al.*^{153,154} et mise à disposition en ligne.¹⁵⁵ Cette méthode repose sur la comparaison du spectre analysé avec une base de données de spectres de références. Elle permet d'estimer les proportions de huit éléments que l'on retrouve dans les structures secondaires, en particulier les hélices α . Les proportions obtenues pour les différents spectres sont résumées dans le Tableau II.8. On peut observer que la structure de la BSA en interaction non-covalente avec les NPs est bien conservée, mais que le greffage semble induire une diminution de la quantité d'hélices α .

Cependant, cette conservation apparente de la structure n'exclut pas la possibilité d'avoir des protéines déstructurées dans l'échantillon, qui ne seraient pas prises en compte par l'analyse BeStSel. En effet, celle-ci se base sur une indication de la concentration, ici estimée par DC. Les protéines non visibles en DC ne sont donc pas prises en compte dans les pourcentages indiqués dans le Tableau II.8. On peut ainsi voir une des limites de ce type d'analyse de structure dépendante de la concentration.

Tableau II.8 - Caractéristiques structurales obtenues par analyse BeStSel des spectres de dichroïsme circulaire de la BSA greffée et libre

	Concentration BSA (μM)	$\theta_{222}/\theta_{208}$	% hélices α	dont normales	dont déformées	%feuillets β	% coude	% désordonné
BSA	2,5	0,91	59,9	41,4	18,5	1,7	9,7	28,6
Au-PMAA + BSA libre	2,5	0,91	59,3	40,3	19,0	1,0	11,5	28,2
Au-PMAA-BSA	2,2	0,82	49,6	31,1	18,5	2,4	12,1	35,9

Nous avons également effectué des analyses DC avec des rampes en température, afin de déterminer l'effet du greffage sur la stabilité de la structure des protéines. L'évolution en fonction de la température du signal dichroïque de la bande à 208 nm est visible sur la Figure II.22 pour la BSA greffée

et celle non greffée en présence de NPs. L'évolution du signal à 222 nm est identique et n'est pas représentée ici. Pour les deux échantillons analysés, on peut remarquer une diminution attendue de l'intensité de la bande au fur et à mesure que la température augmente, ce qui traduit une déstructuration progressive de la protéine. On note cependant que le signal de la BSA greffée diminue dans des proportions moindres que celui de la protéine non greffée. Cela traduit une stabilisation de la structure secondaire par le greffage, qui pourrait s'expliquer par une perte de mouvement de la BSA.

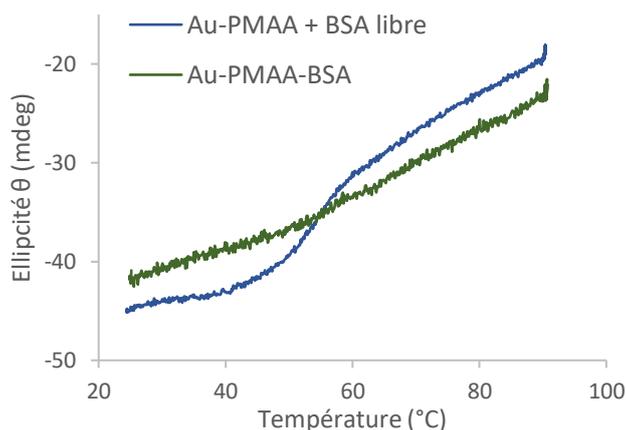


Figure II.22 - Evolution du signal DC (208 nm) en fonction de la température pour Au-PMAA + BSA libre (1,0 mg/mL Au-PMAA + 2,5 μ M BSA) et Au-PMAA-BSA (1,0 mg/mL)

La méthode de couplage EDC/NHS a donc permis le greffage de la BSA sur les Au-PMAA. Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire montrent que la structure secondaire de la protéine est en grande partie conservée. L'analyse en DC a également permis d'évaluer la quantité de BSA dans l'échantillon. Cette méthode de greffage va maintenant pouvoir être appliquée à une protéine d'intérêt.

2. La lactoferrine pour cibler le cerveau

La lactoferrine (Lf) est une protéine capable de lier le fer, appartenant à la famille des transferrines. Sa structure 3D est représentée sur la Figure II.23. Lf est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques, tels que les réactions anti-inflammatoire et immunitaire.¹⁵⁶ La présence de récepteurs spécifiques à Lf a été identifiée dans différents endroits de l'organisme, en particulier dans les cellules endothéliales du cerveau et les cellules de gliomes*.^{156,157} Il a également été montré que Lf avait la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (*Blood Brain Barrier* en anglais, ou BBB).^{158,159} Grâce à ces propriétés, Lf est exploitée en tant que ligand pour cibler les cancers du cerveau. Ainsi, plusieurs publications ont déjà rapporté la combinaison de Lf avec des NPs de différentes natures (polymères, magnétiques, liposomes),^{158,160-165} voire la synthèse de nanoparticules de Lf,¹⁵⁹ montrant

* Gliome : type de tumeur cérébrale.

toutes des résultats prometteurs concernant le passage de la BBB et le ciblage du cerveau. Un brevet a également été déposé en 2017 concernant des complexes lactoferrine-NPs métalliques (dont AuNPs) pour des applications de photothermie ou traitement photodynamique.¹⁶⁶ A notre connaissance, aucune étude combinant radiosensibilisation et ciblage via Lf n'a par contre été publiée.

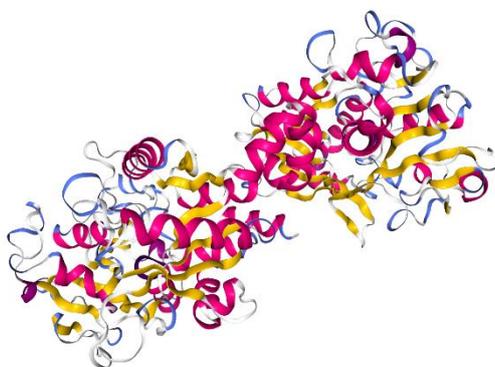


Figure II.23 - Structure 3D de la lactoferrine^{139,167}

Les couleurs correspondent aux différents éléments de la structure secondaire : hélices α en rose, feuillets β en jaune, coudes en bleu.

La lactoferrine contient 54 lysines, sur lesquelles le greffage peut s'effectuer. La méthode de greffage est similaire à celle détaillée précédemment pour la BSA. Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire sont présentés sur la Figure II.24, tandis que ceux de l'analyse BeStSel sont résumés dans le Tableau II.9.

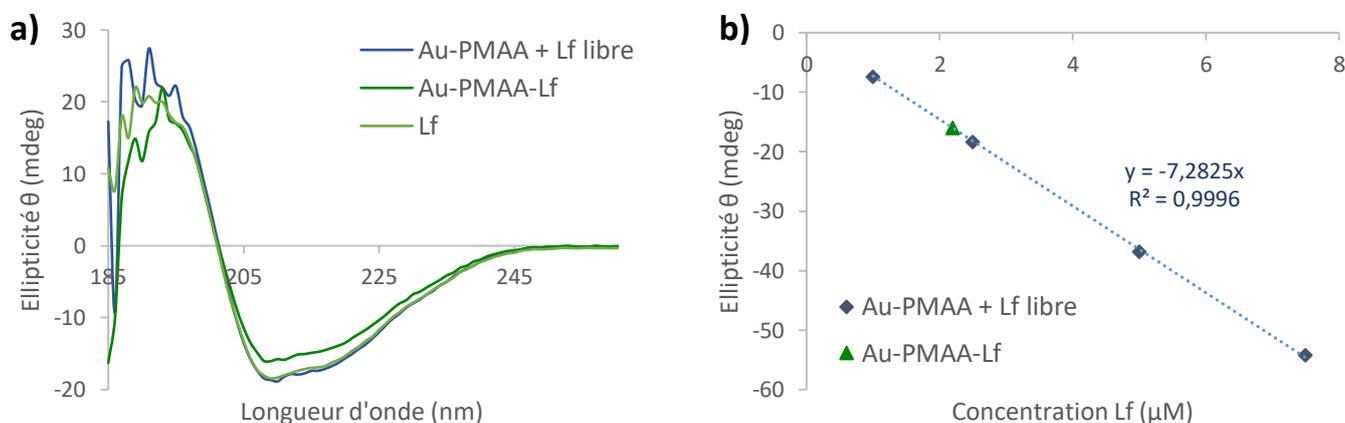


Figure II.24 - Caractérisation en dichroïsme circulaire du greffage de la lactoferrine :

(a) Spectres DC de Au-PMAA + Lf libre (0,42 mg/mL Au-PMAA + 2,5 μ M Lf), Au-PMAA-Lf (0,42 mg/mL) et Lf (2,5 μ M) ;
 (b) Courbe d'étalonnage obtenue en dichroïsme circulaire pour Au-PMAA + Lf libre et positionnement de Au-PMAA-Lf sur cette courbe

On peut noter dans un premier temps que Lf possède une structure secondaire différente de celle de la BSA (structure 3D représentée sur la Figure II.23). Elle comporte notamment une part plus faible d'hélices α mais plus de feuillets β (en jaune sur la Figure II.23).¹⁶⁸ Ce résultat est confirmé par l'analyse BeStSel, mais est également visible sur son spectre dichroïque, avec un pic à 222 nm beaucoup moins marqué. Contrairement à la BSA, l'interaction des NPs avec Lf libre ne modifie pas son spectre

dichroïque. On peut donc supposer que la structure secondaire de la protéine n'est nullement affectée, comme le confirme l'analyse BeStSel. Dans le cas de Lf greffée, on observe une petite diminution de la proportion de feuillets β , mais la structure semble globalement très proche.

Tableau II.9 - Caractéristiques structurales obtenues par analyse BeStSel des spectres de dichroïsme circulaire de la lactoferrine greffée et libre

	Concentration Lf (μM)	$\theta_{222}/\theta_{208}$	% hélices α	dont normales	dont déformées	%feuillets β	% coude	% désordonné
Lf	2,5	0,78	19,3	11,2	8,1	29,9	12,5	38,3
Au-PMAA + Lf libre	2,5	0,78	19,6	12,5	7,0	29,2	12,6	38,5
Au-PMAA-Lf	2,2	0,77	20,0	12,2	7,8	21,3	13,4	45,3

La quantité de Lf greffée a pu être estimée de la même manière que pour la BSA. La concentration calculée est de 2,2 μM de Lf pour 0,42 mg/mL de NPs. Cela correspond à une proportion d'une Lf greffée toutes les 15 chaînes PMAA. Les comportements observés semblent donc similaires pour les deux protéines, même si Lf possède une masse molaire plus élevée.

3. Analyse en diffusion de neutrons

Les NPs greffées de protéines ont également été analysées en SANS, afin d'observer l'impact du greffage sur la géométrie des objets. Les densités de longueur de diffusion cohérente de la BSA et de Lf sont respectivement égales à $3,9 \cdot 10^{10}$ et $3,4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$.^{169,170} Elles tiennent compte des possibles échanges entre les hydrogènes labiles des protéines et les deutériums du solvant. Comme pour l'étude des NPs non greffées présentée précédemment, trois concentrations ont été mesurées pour chacune des deux Au-PMAA-protéines. Les protéines seules ont également été analysées pour comparaison. Les courbes obtenues sont présentées sur la Figure II.25.

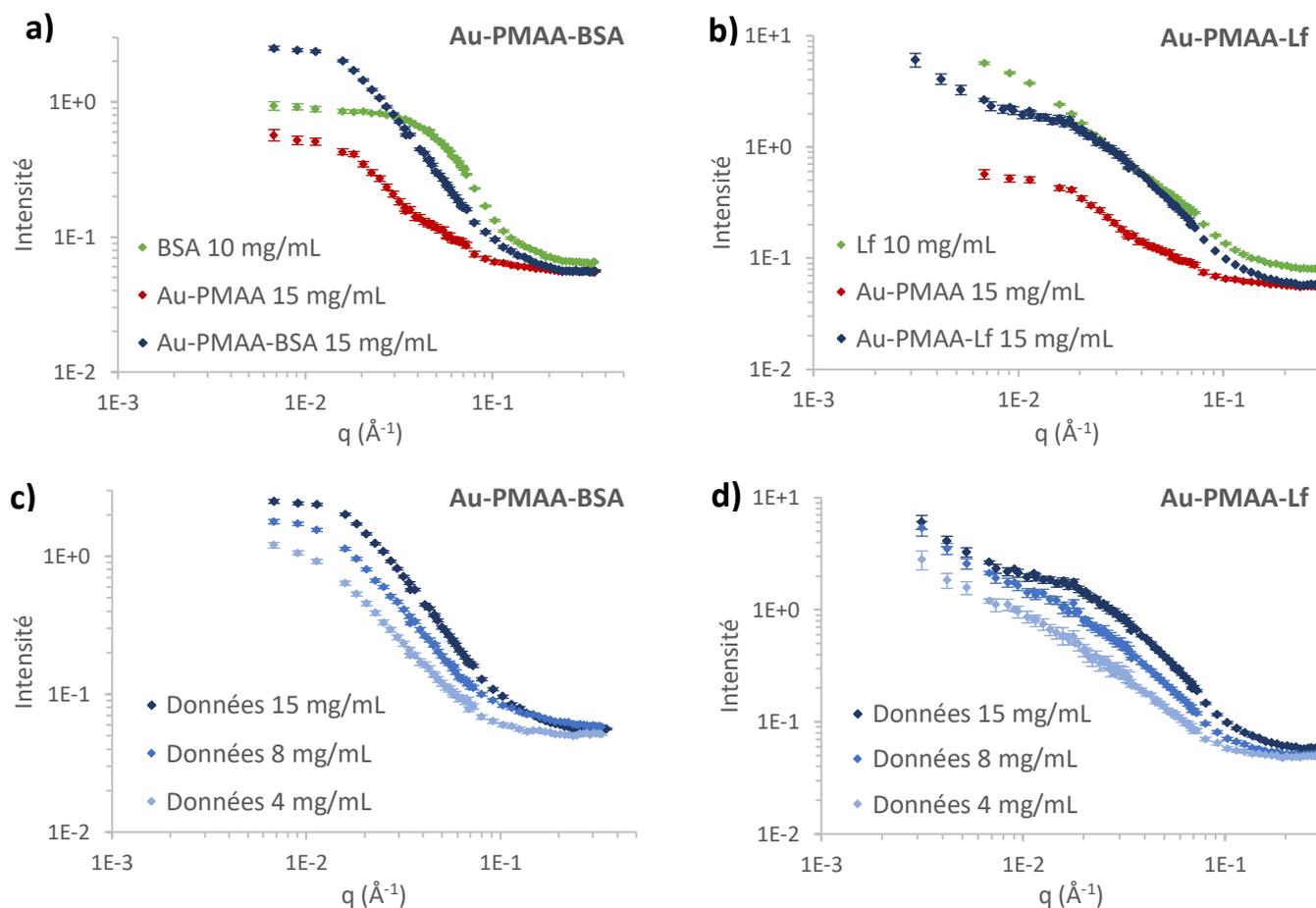


Figure II.25 - Analyses SANS des solutions de Au-PMAA-protéines dans le D₂O
 Courbes $I=f(q)$ de Au-PMAA, Au-PMAA-protéine et protéine seule pour (a) BSA et (b) Lactoferrine
 Courbes $I=f(q)$ pour plusieurs concentrations de (c) Au-PMAA-BSA et (d) Au-PMAA-Lf

L'observation des courbes des Au-PMAA-protéines montre une forte augmentation de l'intensité du signal diffusé par rapport aux Au-PMAA, pour la BSA comme pour Lf (Figure II.25 c et d, respectivement). Notamment, l'intensité plus élevée aux petits angles indique une augmentation de la masse molaire de la couronne, ce qui confirme le greffage des protéines. Même avec une faible proportion greffée, l'analyse en SANS permet donc de valider la présence de protéines. Cela s'explique par la masse molaire élevée de celles-ci : le greffage d'une BSA sur une couronne PMAA correspond par exemple à une augmentation de 175% de la masse molaire totale, ce qui se traduit de manière nette sur l'intensité diffusée.

La conservation de l'allure générale des courbes après greffage montre que la géométrie des objets a été globalement préservée. Dans le cas des Au-PMAA-BSA, la présence d'un plateau aux petits angles pour les trois concentrations indique que la dispersion reste stable et non agrégée dans tous les cas, contrairement aux Au-PMAA-Lf, pour qui une remontée aux petits angles est observée. Cette remontée est déjà présente dans le signal de la lactoferrine seule, et peut témoigner d'une agrégation initiale de la protéine. La lactoferrine native a en effet tendance à s'agréger lorsqu'elle est exposée à des températures supérieures à 65°C, surtout lorsqu'elle est à pH neutre.¹⁷¹ Celle que nous utilisons ici

étant obtenue à partir de lait de vache, il est tout à fait possible qu'elle ait subi ce type de traitement thermique, au cours d'une pasteurisation par exemple, ce qui pourrait expliquer sa forme agrégée.

Cette méthode de greffage par couplage EDC/NHS a donc montré de bons résultats, tant pour la BSA que pour la lactoferrine. Une assez bonne efficacité de greffage a été obtenue, tout en conservant en grande partie la structure secondaire des protéines.

On pourrait cependant reprocher à cette méthode le manque de sélectivité du point d'accroche sur la protéine. En effet, si celle-ci comporte plusieurs lysines, le greffage peut avoir lieu à différents endroits de la structure. Pour des protéines présentant un site de liaison, un greffage sur ce site risquerait de le dénaturer ou du moins d'en empêcher l'accès. Dans le cas de la lactoferrine par exemple, cela pourrait poser problème puisqu'on cherche à exploiter sa capacité à se lier à certains récepteurs situés dans les cancers du cerveau.

Enfin, il n'est pas exclu qu'on lie plusieurs protéines entre elles durant le processus de greffage, ou qu'une même protéine se retrouve greffée à deux NPs. Le premier phénomène est toutefois limité par la phase d'activation des acides carboxyliques qui est réalisée sur les NPs seules, avant l'ajout des protéines dans le milieu. Ces deux phénomènes pourraient expliquer qu'on ait observé la précipitation spontanée d'une petite partie des NPs durant le greffage. La stabilisation notable de la BSA greffée aux hautes températures, observée en DC, pourrait en outre provenir de l'existence de plusieurs sites de greffage sur une même protéine, ce qui entraînerait une immobilisation accrue.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les méthodes de synthèse et de caractérisation développées dans ce chapitre ont permis d'obtenir une gamme bien définie de nanoparticules d'or greffées d'une couronne polyméthacrylate. Grâce la diversité des monomères utilisés, des objets aux propriétés physico-chimiques de surface différentes (charge, balance hydrophobe/hydrophile) ont pu être synthétisés, tout en conservant une taille et une forme similaires d'une NP à l'autre. Leur caractérisation a fait l'objet d'une attention toute particulière. Outre les techniques classiques souvent utilisées pour étudier les objets hybrides (thermogravimétrie, microscopie électronique), nous avons également conduit des expériences de diffusion des rayonnements (SAXS et SANS), afin d'obtenir des informations précises sur les caractéristiques de nos objets. Grâce à cet important travail de caractérisation, nous avons pu montrer que les NPs étaient décrites par une géométrie d'étoile, constituées d'un petit cœur d'or (diamètre moyen compris entre

2 et 5 nm) et de quelques chaînes polymères greffées en surface, donnant un rayon de giration total allant de 3,5 à 13 nm. Le greffage par couplage EDC/NHS a par ailleurs permis de greffer sur la couronne PMAA un agent de chimiothérapie modèle, ainsi que deux protéines, montrant la possibilité d'ajouter des fonctionnalités supplémentaires aux NPs.

Les méthodes de synthèse choisies ici assurent l'obtention de NPs greffées polymères bien définies en un nombre d'étapes limité. On pourrait toutefois évoquer plusieurs pistes pour encore améliorer la synthèse des ligands polymères. L'utilisation du cuivre comme catalyseur dans la méthode ATRP peut par exemple être considérée comme problématique, d'abord parce que son élimination implique de nombreuses étapes de purification, mais également parce que sa présence dans les objets finaux pourrait générer de la toxicité. En l'occurrence, nous avons pu mettre en évidence qu'une quantité très faible de cuivre était présente dans nos ligands (pourcentage massique $< 10^{-3}$) (chapitre 3 § IV.C). La méthode ARGET ATRP (*Activators ReGenerated by Electron Transfer*), développée par l'équipe de Matyjaszewski, pourrait toutefois être envisagée comme perspective, puisqu'elle nécessite très peu de cuivre (quantité réduite d'un facteur 10^3 à 10^4 par rapport à la technique classique).¹⁷²

Une alternative avantageuse à l'ATRP pourrait être l'utilisation de la RAFT. Cette méthode conserve les avantages d'une polymérisation radicalaire contrôlée, mais elle permettrait de polymériser directement le MAA, sans passer par le MAtBu, ce qui éliminerait l'étape d'hydrolyse. Réduire le nombre d'étapes de synthèse est en effet primordial si l'on envisage une industrialisation. Il faut toutefois souligner que les agents de transfert de la RAFT doivent souvent être synthétisés en amont, ce qui peut impliquer plusieurs étapes. L'utilisation directe du MAA pourrait en outre permettre de réaliser la polymérisation dans l'eau,¹⁷³ et donc de limiter le risque de conserver des traces de solvant organique dans les objets finaux, mais aussi d'adopter un procédé de synthèse plus écologique. Une synthèse dans l'eau ne serait toutefois pas compatible avec tous les ligands utilisés dans cette étude. Dans la littérature, la RAFT a déjà été utilisée pour synthétiser des objets similaires aux nôtres (Au-PMAA et Au-PDMAEMA), mais dans le cadre d'un greffage des ligands polymères par *grafting to*.^{23,76} On pourrait envisager de l'associer à la méthode de synthèse directe des AuNPs, choisie ici, car les dithioesters utilisés comme agents de transfert pourraient être directement réduits en thiols par le tétrahydruroborate de sodium utilisé pour réduire les sels d'or.²³ Il faudrait cependant s'assurer que leur réactivité est comparable à celle des ponts disulfures utilisés dans ce projet.

Sur le plan de la caractérisation, cette étude a démontré l'intérêt d'utiliser des techniques de caractérisation avancées pour mieux comprendre les propriétés des objets. Si la diffusion des

rayonnements (SAXS et SANS) nous a permis de modéliser la géométrie des NPs, certaines caractéristiques ne sont pas encore pleinement comprises, notamment la très petite taille des Au-P(PEGMA-MAA) ou l'apparition de pics de structure aux fortes concentrations pour les Au-P(MAnBu-MAA) et Au-PMAA(18,6). Il serait donc intéressant d'approfondir l'étude de la conformation de ces chaînes polymères, et de leurs possibles réarrangements en surface et/ou structurations inter-objets. La localisation des protéines greffées sur la couronne reste également à déterminer, notamment en termes d'homogénéité de répartition. Dans cette perspective, l'observation en microscopie peut se révéler complémentaire des techniques de diffusion des rayonnements. Pour nos objets, le TEM classique a montré ses limites (étude du cœur d'or uniquement), mais les récents développements en cryo-microscopie électronique (cryoEM) pourraient permettre d'observer directement la couronne polymère,^{174,175} ainsi que les protéines greffées.¹⁷⁶ Les techniques actuelles permettent même d'obtenir des reconstructions 3D des objets analysés, comme illustré sur la Figure II.26. Au-delà de la morphologie des NPs, la cryoEM pourrait également être utilisée pour étudier les interactions avec les systèmes biologiques au niveau moléculaire, comme cela a été fait récemment par Kokkinopoulou *et al.* pour visualiser les protéines adsorbées à la surface de nanoparticules.¹⁷⁷

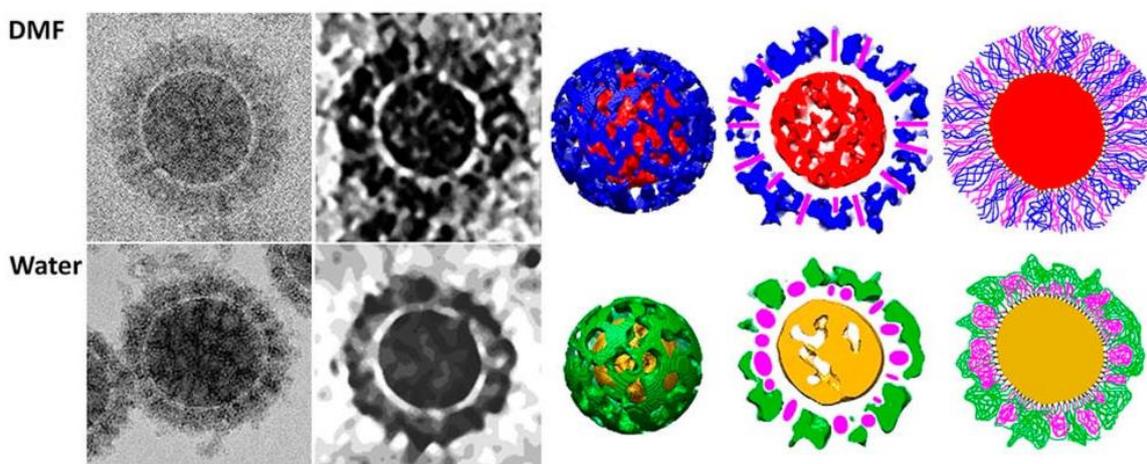


Figure II.26 - Etude en cryoEM de nanoparticules de silice greffées par des copolymères acide polyacrylique/polystyrène. Images de cryoEM et reconstitutions 3D obtenues à partir de tomographes dans deux solvants différents.¹⁷⁸

Concernant les perspectives de synthèse de nouveaux objets, on pourrait envisager d'étendre par la suite la gamme de méthacrylates en réalisant de nouveaux copolymères à partir de ces mêmes monomères, ou bien en utilisant d'autres monomères, en fonction des tendances qui seront observées en termes de comportement en milieu biologique (voir les chapitres suivants). Outre les ligands polymères, le cœur d'or pourrait lui aussi être modifié, en faisant par exemple varier son diamètre, notamment en jouant sur le rapport ligand/Au dans la synthèse des NPs. Une première gamme de NPs

a été réalisée avec les ligands PMAA. On peut observer sur la Figure II.27 l'évolution de leur pic plasmon à mesure que la taille des cœurs d'or augmente.

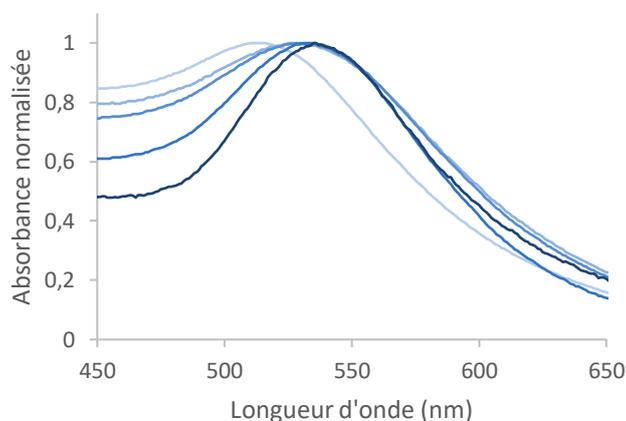


Figure II.27 - Spectres d'absorbance UV-visible de Au-PMAA possédant des cœurs d'or de tailles variées

La nature du cœur métallique pourrait également faire l'objet de modifications. Des tests avaient par exemple été effectués au cours de ce travail sur la synthèse de NPs de platine greffées de PMAA par *grafting from*. Le platine fait en effet partie des métaux connus pour leurs propriétés de radiosensibilisation.¹⁷⁹ Nous avons également envisagé d'étudier des nanoparticules dont le cœur serait un alliage or/argent. Il a en effet été montré que les AgNPs produisaient également un effet radiosensibilisant,¹⁸⁰ parfois plus efficace que les AuNPs.¹⁸¹ Afin de contrer la forte toxicité des AgNPs,¹⁸² l'idée était donc d'associer les deux métaux. Plusieurs articles ont déjà rapporté la synthèse de tels nano-objets,¹⁸³⁻¹⁸⁵ et une publication récente a évoqué la possibilité de les utiliser en radiosensibilisation,¹⁸⁶ mais aucune étude *in vitro* ou *in vivo* n'a été portée à notre connaissance.

Enfin, d'autres greffages post-synthèse pourraient être envisagés. Si l'on reste dans la perspective de traiter les gliomes, comme dans le cadre du greffage de la lactoferrine, nous avons par exemple envisagé d'y associer le témozolomide (TMZ), qui est un agent anti-cancéreux administré aux patients atteints de gliome pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie.¹⁸⁷ Puisqu'il ne possède pas de fonction amine, le couplage EDC/NHS ne peut être appliqué. Nous pourrions cependant exploiter la chimie-click. Concernant le greffage des protéines, la chimie-click pourrait aussi être utilisée, avec des réactions de type thiol-ène sur les cystéines, qui comportent une fonction thiol. Comparée au couplage acide/amine, elle aurait l'avantage d'éviter les couplages intra- ou inter-protéines, car aucun acide aminé ne contient de fonction alcène. Dans la perspective d'augmenter le nombre de protéines greffées sur les NPs, on pourrait également envisager d'effectuer la polymérisation par *grafting from* à partir d'une protéine qu'on aurait fonctionnalisée par un amorceur.^{188,189} En ajoutant un thiol ou un thioester à l'extrémité du polymère ainsi formé, on pourrait obtenir des ligands polymères qui possèdent déjà des protéines greffées en bout de chaîne. Le risque serait cependant que la protéine

agisse elle aussi comme ligand lors de la synthèse des AuNPs, par exemple par l'intermédiaire des thiols qu'elle contient (cystéines).¹⁹⁰

Si la chimie offre des possibilités quasi-infinies en termes de synthèse de nano-objets, la diversité ne doit cependant pas être un but en soi, mais entrer dans une démarche de compréhension des phénomènes. Faire varier les propriétés des NPs doit ainsi permettre de déterminer les paramètres structuraux qui vont permettre d'assurer une fonction spécifique. Cette approche est particulièrement importante dans le cas d'applications médicales, puisque la complexité du vivant rend le comportement des NPs difficile à prédire. L'étude des interactions entre nos NPs et différents systèmes biologiques va ainsi faire l'objet du chapitre suivant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Paquirissamy, A. Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation. (Université Paris-Saclay, 2016).
2. Georges, M. K., Veregin, R. P., Kazmaier, P. M. & Hamer, G. K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules* **26**, 2987–2988 (1993).
3. Greszta, D., Mardare, D. & Matyjaszewski, K. 'Living' radical polymerization. 1. Possibilities and limitations. *Macromolecules* **27**, 638–644 (1994).
4. Matyjaszewski, K. & Davis, T. P. *Handbook of radical polymerization*. (John Wiley & Sons, 2003).
5. Matyjaszewski, K. & Wang, J. Controlled living radical polymerization - atom-transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5614–5615 (1995).
6. Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M. & Higashimura, T. Polymerization of methyl methacrylate with the carbon tetrachloride/dichlorotris-(triphenylphosphine) ruthenium (II)/methylaluminum bis (2, 6-di-tert-butylphenoxide) initiating system: possibility of living radical polymerization. *Macromolecules* **28**, 1721–1723 (1995).
7. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **45**, 4015–4039 (2012).
8. Matyjaszewski, K. & Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem. Rev.* **101**, 2921–2990 (2001).
9. Grimaud, T. & Matyjaszewski, K. Controlled/"Living" Radical Polymerization of Methyl Methacrylate by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **30**, 2216–2218 (1997).
10. Zhang, X., Xia, J. & Matyjaszewski, K. Controlled/"Living" Radical Polymerization of 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate. *Macromolecules* **31**, 5167–5169 (1998).
11. Beers, K. L., Boo, S., Gaynor, S. G. & Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate. *Macromolecules* **32**, 5772–5776 (1999).
12. Gaynor, S. G., Qiu, J. & Matyjaszewski, K. Controlled/"living" radical polymerization applied to water-borne systems. *Macromolecules* **31**, 5951–5954 (1998).
13. Haddleton, D. M. *et al.* Atom Transfer Polymerization of Methyl Methacrylate Mediated by Alkylpyridylmethanimine Type Ligands, Copper(I) Bromide, and Alkyl Halides in Hydrocarbon Solution. *Macromolecules* **32**, 2110–2119 (1999).
14. Wang, X.-S. & Armes, S. P. Facile Atom Transfer Radical Polymerization of Methoxy-Capped Oligo(ethylene glycol) Methacrylate in Aqueous Media at Ambient Temperature. *Macromolecules* **33**, 6640–6647 (2000).
15. Zhang, X., Xia, J. H. & Matyjaszewski, K. Atom-transfer radical polymerization of protected methacrylic acids. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **218**, U543–U543 (1999).
16. Ashford, E. J., Naldi, V., O'Dell, R., Billingham, N. C. & Armes, S. P. First example of the atom transfer radical polymerisation of an acidic monomer: direct synthesis of methacrylic acid copolymers in aqueous media. *Chem. Commun.* **0**, 1285–1286 (1999).
17. Matyjaszewski, K. *et al.* Polymers at Interfaces: Using Atom Transfer Radical Polymerization in the Controlled Growth of Homopolymers and Block Copolymers from Silicon Surfaces in the Absence of Untethered Sacrificial Initiator. *Macromolecules* **32**, 8716–8724 (1999).
18. Boyes, S. G., Akgun, B., Brittain, W. J. & Foster, M. D. Synthesis, Characterization, and Properties of Polyelectrolyte Block Copolymer Brushes Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization and Their Use in the Synthesis of Metal Nanoparticles. *Macromolecules* **36**, 9539–9548 (2003).
19. Treat, N. D., Ayres, N., Boyes, S. G. & Brittain, W. J. A Facile Route to Poly(acrylic acid) Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **39**, 26–29 (2006).
20. Joshi, M. Role of eudragit in targeted drug delivery. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **5**, 58–62 (2013).

21. Thakral, S., Thakral, N. K. & Majumdar, D. K. Eudragit®: a technology evaluation. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 131–149 (2013).
22. Soenen, S. J. *et al.* The effect of nanoparticle degradation on poly(methacrylic acid)-coated quantum dot toxicity: The importance of particle functionality assessment in toxicology. *Acta Biomater.* **10**, 732–741 (2014).
23. Yilmaz, G., Demir, B., Timur, S. & Becer, C. R. Poly(methacrylic acid)-Coated Gold Nanoparticles: Functional Platforms for Theranostic Applications. *Biomacromolecules* **17**, 2901–2911 (2016).
24. Basti, H. *et al.* Surface modification of γ -Fe₂O₃ nanoparticles by grafting from poly-(hydroxyethylmethacrylate) and poly-(methacrylic acid): Qualitative and quantitative analysis of the polymeric coating. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **490**, 222–231 (2016).
25. Tatavarti, A. S., Mehta, K. A., Augsburg, L. L. & Hoag, S. W. Influence of methacrylic and acrylic acid polymers on the release performance of weakly basic drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J. Pharm. Sci.* **93**, 2319–2331 (2004).
26. Sant, V. P., Smith, D. & Leroux, J.-C. Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkyl acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. *J. Controlled Release* **104**, 289–300 (2005).
27. Sajeesh, S. & Sharma, C. P. Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int. J. Pharm.* **325**, 147–154 (2006).
28. Chen, D. *et al.* Modification of magnetic silica / iron oxide nanocomposites with fluorescent polymethacrylic acid for cancer targeting and drug delivery. *J. Mater. Chem.* **20**, 6422–6429 (2010).
29. Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Maharramov, A. & Ramazanov, M. A. Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan–Poly(methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* **48**, 403–407 (2011).
30. Yang, P. *et al.* Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials* **35**, 2079–2088 (2014).
31. Jin, S. *et al.* Biodegradation and Toxicity of Protease/Redox/pH Stimuli-Responsive PEGlated PMAA Nanohydrogels for Targeting Drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 19843–19852 (2015).
32. Voulgari, E. *et al.* Synthesis, characterization and in vivo evaluation of a magnetic cisplatin delivery nanosystem based on PMAA-graft-PEG copolymers. *J. Controlled Release* **243**, 342–356 (2016).
33. Sharma, A., Smith, J. D., Walters, K. B. & Rick, S. W. Constant pH simulations of pH responsive polymers. *J. Chem. Phys.* **145**, 234906 (2016).
34. Zhang, J. & Peppas, N. A. Synthesis and Characterization of pH- and Temperature-Sensitive Poly(methacrylic acid)/Poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks. *Macromolecules* **33**, 102–107 (2000).
35. Li, Y., Wan, J., Zhang, Z., Guo, J. & Wang, C. Targeted Soft Biodegradable Glycine/PEG/RGD-Modified Poly(methacrylic acid) Nanobubbles as Intelligent Theranostic Vehicles for Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 35604–35612 (2017).
36. Rinkenauer, A. C. *et al.* Comparison of the uptake of methacrylate-based nanoparticles in static and dynamic in vitro systems as well as in vivo. *J. Controlled Release* **216**, 158–168 (2015).
37. Kakwere, H. & Perrier, S. Design of complex polymeric architectures and nanostructured materials/hybrids by living radical polymerization of hydroxylated monomers. *Polym. Chem.* **2**, 270–288 (2011).
38. Weaver, J. V. M. *et al.* Stimulus-Responsive Water-Soluble Polymers Based on 2-Hydroxyethyl Methacrylate. *Macromolecules* **37**, 2395–2403 (2004).

39. Montheard, J.-P., Chatzopoulos, M. & Chappard, D. 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields. *J. Macromol. Sci. Part C* **32**, 1–34 (1992).
40. Lloyd, A. W., Faragher, R. G. A. & Denyer, S. P. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* **22**, 769–785 (2001).
41. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
42. Van Landuyt, K. L. *et al.* Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* **28**, 3757–3785 (2007).
43. Jhaveri, S. J. *et al.* Release of Nerve Growth Factor from HEMA Hydrogel-Coated Substrates and Its Effect on the Differentiation of Neural Cells. *Biomacromolecules* **10**, 174–183 (2009).
44. Tang, Q., Yu, J.-R., Chen, L., Zhu, J. & Hu, Z.-M. Poly (dimethyl siloxane)/poly (2-hydroxyethyl methacrylate) interpenetrating polymer network beads as potential capsules for biomedical use. *Curr. Appl. Phys.* **11**, 945–950 (2011).
45. Young, C.-D., Wu, J.-R. & Tsou, T.-L. High-strength, ultra-thin and fiber-reinforced pHEMA artificial skin. *Biomaterials* **19**, 1745–1752 (1998).
46. Çetin, D., Kahraman, A. S. & Gümüşderelioğlu, M. Novel Scaffolds Based on Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Superporous Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **22**, 1157–1178 (2011).
47. Macková, H. *et al.* Reductively Degradable Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Hydrogels with Oriented Porosity for Tissue Engineering Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 10544–10553 (2017).
48. Kwon Oh, J. Polylactide (PLA)-based amphiphilic block copolymers : synthesis, self-assembly , and biomedical applications. *Soft Matter* **7**, 5096–5108 (2011).
49. Yuan, L. *et al.* PEG-b-PtBA-b-PHEMA well-defined amphiphilic triblock copolymer: Synthesis, self-assembly, and application in drug delivery. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **50**, 4579–4588 (2012).
50. Zhou, L. *et al.* Synthesis, characterization, and controllable drug release of pH-sensitive hybrid magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 2799–2804 (2009).
51. Zhang, B. *et al.* Reducibly degradable hydrogels of PNIPAM and PDMAEMA: Synthesis, stimulus-response and drug release. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **48**, 3604–3612 (2010).
52. Car, A. *et al.* pH-Responsive PDMS-b-PDMAEMA Micelles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules* **15**, 3235–3245 (2014).
53. van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H., Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J. Controlled Release* **53**, 145–153 (1998).
54. Zhu, C. *et al.* Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA–PCL–PDMAEMA triblock copolymers. *Biomaterials* **31**, 2408–2416 (2010).
55. Zhang, P. & Liu, W. ZnO QD@PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging. *Biomaterials* **31**, 3087–3094 (2010).
56. Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S. & Greiner, A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater. Today* **15**, 388–393 (2012).
57. Rawlinson, L.-A. B. *et al.* Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules* **11**, 443–453 (2010).
58. Castro, D. & Pacetti, S. Poly(butylmethacrylate) and rapamycin coated stent - US Patent US20070198081A1. (2007).

59. Yuan, Y., Liu, C. & Yin, M. Plasma polymerized n-butyl methacrylate coating with potential for re-endothelialization of intravascular stent devices. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 2187–2196 (2008).
60. Revell, P. A., Braden, M. & Freeman, M. A. R. Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials* **19**, 1579–1586 (1998).
61. Butler, M. J. & Sefton, M. V. Poly(butyl methacrylate-co-methacrylic acid) tissue engineering scaffold with pro-angiogenic potential in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A* **82A**, 265–273 (2007).
62. Okuyama, Y., Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T. & Sakurai, Y. Swelling controlled zero order and sigmoidal drug release from thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate) hydrogel. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **4**, 545–556 (1993).
63. Chung, J. E. *et al.* Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J. Controlled Release* **62**, 115–127 (1999).
64. Soma, D. *et al.* Intraperitoneal administration of paclitaxel solubilized with poly(2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci.* **100**, 1979–1985 (2009).
65. Sun, F., Wang, Y., Wei, Y., Cheng, G. & Ma, G. Thermo-triggered drug delivery from polymeric micelles of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)-b-poly(n-butyl methacrylate) for tumor targeting. *J. Bioact. Compat. Polym.* **29**, 301–317 (2014).
66. Puranik, A. S., Pao, L. P., White, V. M. & Peppas, N. A. Synthesis and characterization of pH-responsive nanoscale hydrogels for oral delivery of hydrophobic therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **108**, 196–213 (2016).
67. Kobayashi, K., Wei, J., Iida, R., Ijiro, K. & Niikura, K. Surface engineering of nanoparticles for therapeutic applications. *Polym. J.* **46**, 460–468 (2014).
68. Fujisawa, S., Atsumi, T. & Kadoma, Y. Cytotoxicity of methyl methacrylate (MMA) and related compounds and their interaction with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes as a model for biomembranes. *Oral Dis.* **6**, 215–221 (2000).
69. Lutz, J.-F. *et al.* One-Pot Synthesis of PEGylated Ultrasmall Iron-Oxide Nanoparticles and Their in Vivo Evaluation as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Biomacromolecules* **7**, 3132–3138 (2006).
70. Wang, W. *et al.* Biodegradable Thermoresponsive Microparticle Dispersions for Injectable Cell Delivery Prepared Using a Single-Step Process. *Adv. Mater.* **21**, 1809–1813 (2009).
71. Wang, Z.-K. *et al.* Preparation of biocompatible nanocapsules with temperature-responsive and bioreducible properties. *J. Mater. Chem.* **21**, 15950–15956 (2011).
72. Cruje, C. & Chithrani, B. D. Polyethylene Glycol Density and Length Affects Nanoparticle Uptake by Cancer Cells. *J. Nanomedicine Res.* **1**, (2014).
73. Ma, H., Hyun, J., Stiller, P. & Chilkoti, A. “Non-Fouling” Oligo(ethylene glycol)- Functionalized Polymer Brushes Synthesized by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* **16**, 338–341 (2004).
74. Ma, H., Wells, M., Beebe, T. P. & Chilkoti, A. Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization of Oligo(ethylene glycol) Methyl Methacrylate from a Mixed Self-Assembled Monolayer on Gold. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 640–648 (2006).
75. K. Mann, S. *et al.* Tuning the properties of pH responsive nanoparticles to control cellular interactions in vitro and ex vivo. *Polym. Chem.* **7**, 6015–6024 (2016).
76. Hotchkiss, J. W., Lowe, A. B. & Boyes, S. G. Surface Modification of Gold Nanorods with Polymers Synthesized by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Chem. Mater.* **19**, 6–13 (2007).

77. Ohno, K., Koh, K., Tsujii, Y. & Fukuda, T. Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Well-Defined, High-Density Polymer Brushes by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Macromolecules* **35**, 8989–8993 (2002).
78. Mandal, T. K., Fleming, M. S. & Walt, D. R. Preparation of Polymer Coated Gold Nanoparticles by Surface-Confined Living Radical Polymerization at Ambient Temperature. *Nano Lett.* **2**, 3–7 (2002).
79. Carrot, G., Gal, F., Cremona, C., Vinas, J. & Perez, H. Polymer-Grafted-Platinum Nanoparticles: From Three-Dimensional Small-Angle Neutron Scattering Study to Tunable Two-Dimensional Array Formation. *Langmuir* **25**, 471–478 (2009).
80. Gal, F., Perez, H., Noel, V. & Carrot, G. Water-soluble polymer-grafted platinum nanoparticles for the subsequent binding of enzymes. synthesis and SANS. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **50**, 289–296 (2012).
81. Ishii, T., Otsuka, H., Kataoka, K. & Nagasaki, Y. Preparation of Functionally PEGylated Gold Nanoparticles with Narrow Distribution through Auto-reduction of Auric Cation by α -Biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]. *Langmuir* **20**, 561–564 (2004).
82. Yuan, J.-J., Schmid, A., Armes, S. P. & Lewis, A. L. Facile Synthesis of Highly Biocompatible Poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine)-Coated Gold Nanoparticles in Aqueous Solution. *Langmuir* **22**, 11022–11027 (2006).
83. Feng, C. *et al.* Size-controllable gold nanoparticles stabilized by PDEAEMA-based double hydrophilic graft copolymer. *Polymer* **50**, 3990–3996 (2009).
84. Li, L.-Y. *et al.* Thermal and pH-sensitive gold nanoparticles from H-shaped block copolymers of (PNIPAM/PDMAEMA)-b-PEG-b-(PNIPAM/PDMAEMA). *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **48**, 5018–5029 (2010).
85. Scaravelli, R. C. B. *et al.* Direct synthesis of coated gold nanoparticles mediated by polymers with amino groups. *J. Colloid Interface Sci.* **397**, 114–121 (2013).
86. Hussain, I. *et al.* Size-Controlled Synthesis of Near-Monodisperse Gold Nanoparticles in the 1–4 nm Range Using Polymeric Stabilizers. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16398–16399 (2005).
87. Wang, Z. *et al.* Design of Polymeric Stabilizers for Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles in Water. *Langmuir* **23**, 885–895 (2007).
88. Matsuura, K., Ohno, K., Kagaya, S. & Kitano, H. Carboxybetaine Polymer-Protected Gold Nanoparticles: High Dispersion Stability and Resistance against Non-Specific Adsorption of Proteins. *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 862–873 (2007).
89. Edwards, E. W., Chanana, M., Wang, D. & Möhwald, H. Stimuli-Responsive Reversible Transport of Nanoparticles Across Water/Oil Interfaces. *Angew. Chem.* **120**, 326–329 (2008).
90. Bach, L. G., Islam, M. R., Jeong, Y. T., Gal, Y. S. & Lim, K. T. Synthesis and characterization of chemically anchored adenosine with PHEMA grafted gold nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 2816–2822 (2012).
91. Brust, M., Fink, J., Bethell, D., J. Schiffrin, D. & Kiely, C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1655–1656 (1995). doi:10.1039/C39950001655
92. Le Goas, M. *et al.* Irradiation Effects on Polymer-Grafted Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 144–154 (2019).
93. Gu, Y.-J. *et al.* Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **237**, 196–204 (2009).
94. Huang, K. *et al.* Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. *ACS Nano* **6**, 4483–4493 (2012).
95. Huo, S. *et al.* Ultrasmall Gold Nanoparticles as Carriers for Nucleus-Based Gene Therapy Due to Size-Dependent Nuclear Entry. *ACS Nano* **8**, 5852–5862 (2014).

96. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 2 (2017).
97. Jocelyn, P. C. Chemical reduction of disulfides. in *Methods in Enzymology* **143**, 246–256 (Academic Press, 1987).
98. Pantoustier, N., Moins, S., Wautier, M., Degée, P. & Dubois, P. Solvent -free synthesis and purification of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] by atom transfer radical polymerization. *Chem. Commun.* **0**, 340–341 (2003).
99. Lutz, J.-F. & Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylate and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **39**, 893–896 (2006).
100. Corbierre, M. K., Cameron, N. S. & Lennox, R. B. Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles with High Grafting Densities. *Langmuir* **20**, 2867–2873 (2004).
101. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
102. Li, T., Senesi, A. J. & Lee, B. Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. *Chem. Rev.* **116**, 11128–11180 (2016).
103. Benoit, H. On the effect of branching and polydispersity on the angular distribution of the light scattered by gaussian coils. *J. Polym. Sci.* **11**, 507–510 (1953).
104. Mathur, A. M., Drescher, B., Scranton, A. B. & Klier, J. Polymeric emulsifiers based on reversible formation of hydrophobic units. *Nature* **392**, 367 (1998).
105. Jones, J. A. *et al.* Thermo-responsive copolymers of methacrylic acid and poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **43**, 6095–6104 (2005).
106. Becer, C. R. *et al.* Libraries of methacrylic acid and oligo(ethylene glycol) methacrylate copolymers with LCST behavior. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 7138–7147 (2008).
107. Ghosh, S. K. & Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **107**, 4797–4862 (2007).
108. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
109. Conde, J. *et al.* Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* **2**, (2014).
110. Gal, F. *et al.* Electrocatalytic (Bio)Nanostructures Based on Polymer-Grafted Platinum Nanoparticles for Analytical Purpose. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 14747–14755 (2016).
111. Résumé des caractéristiques du produit - Doxorubicine Accord 2 mg/ml, solution pour perfusion. *Base de données publique des médicaments* Available at: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=62783375&typedoc=R>. (Accessed: 2nd January 2019)
112. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1845**, 84–89 (2014).
113. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* **21**, 440–446 (2011).
114. Gautier, J., Allard-Vannier, E., Munnier, E., Soucé, M. & Chourpa, I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J. Controlled Release* **169**, 48–61 (2013).
115. Hervault, A. *et al.* Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale* **8**, 12152–12161 (2016).
116. Lee, E. S., Na, K. & Bae, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J. Controlled Release* **103**, 405–418 (2005).

117. Greco, F. *et al.* Investigating the mechanism of enhanced cytotoxicity of HPMA copolymer–Dox–AGM in breast cancer cells. *J. Controlled Release* **117**, 28–39 (2007).
118. Li, T. *et al.* Thermosensitive Hydrogel Co-loaded with Gold Nanoparticles and Doxorubicin for Effective Chemoradiotherapy. *AAPS J.* **18**, 146–155 (2016).
119. Theodossiou, T. A., Galanou, M. C. & Paleos, C. M. Novel Amiodarone–Doxorubicin Cocktail Liposomes Enhance Doxorubicin Retention and Cytotoxicity in DU145 Human Prostate Carcinoma Cells. *J. Med. Chem.* **51**, 6067–6074 (2008).
120. Kim, K. *et al.* Doxorubicin/gold-loaded core/shell nanoparticles for combination therapy to treat cancer through the enhanced tumor targeting. *J. Controlled Release* **228**, 141–149 (2016).
121. Jang, H., Ryoo, S.-R., Kostarelos, K., Han, S. W. & Min, D.-H. The effective nuclear delivery of doxorubicin from dextran-coated gold nanoparticles larger than nuclear pores. *Biomaterials* **34**, 3503–3510 (2013).
122. Zhang, X., Teodoro, J. G. & Nadeau, J. L. Intratumoral gold-doxorubicin is effective in treating melanoma in mice. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1365–1375 (2015).
123. Wang, F. *et al.* Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS Nano* **5**, 3679–3692 (2011).
124. Cui, T. *et al.* Performance of Doxorubicin-Conjugated Gold Nanoparticles: Regulation of Drug Location. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 8569–8580 (2017).
125. Fang, C. *et al.* Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach. *J. Controlled Release* **162**, 233–241 (2012).
126. Gu, Y.-J., Cheng, J., Man, C. W.-Y., Wong, W.-T. & Cheng, S. H. Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 204–211 (2012).
127. Meng, F., Zhong, Y., Cheng, R., Deng, C. & Zhong, Z. pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor-targeting doxorubicin delivery: concept and recent advances. *Nanomed.* **9**, 487–499 (2014).
128. Tannock, I. F. & Rotin, D. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Res.* **49**, 4373–4384 (1989).
129. Cooper, G. M. Protein Sorting and Transport - The Endoplasmic Reticulum, Golgi Apparatus, and Lysosomes. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (2000).
130. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release* **145**, 182–195 (2010).
131. MacKay, J. A. *et al.* Self-assembling chimeric polypeptide–doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection. *Nat. Mater.* **8**, 993–999 (2009).
132. Lin, Q., Huang, X., Tang, J., Han, Y. & Chen, H. Environmentally friendly, one-pot synthesis of folic acid-decorated graphene oxide-based drug delivery system. *J. Nanoparticle Res.* **15**, 2144 (2013).
133. Kalepu, S. & Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 442–453 (2015).
134. Zeng, S. *et al.* A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **6**, 491–506 (2011).
135. Bazak, R., Hourri, M., Achy, S. E., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 769–784 (2015).
136. Evans, E. R., Bugga, P., Asthana, V. & Drezek, R. Metallic nanoparticles for cancer immunotherapy. *Mater. Today* (2017). doi:10.1016/j.mattod.2017.11.022
137. Wright, A. K. & Thompson, M. R. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophys. J.* **15**, 137–141 (1975).
138. Majorek, K. A. *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).

139. Rose, A. S. *et al.* NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics* **34**, 3755–3758 (2018).
140. Stoscheck, C. M. Quantitation of protein. in *Methods in enzymology* **182**, 50–68 (Elsevier, 1990).
141. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
142. Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantitation. in *The protein protocols handbook - 2nd edition* 15–21 (Springer, 2002).
143. Woody, R. W. [4] Circular dichroism. in *Methods in enzymology* **246**, 34–71 (Elsevier, 1995).
144. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
145. Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. & Peters Jr, T. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. *Biochemistry (Mosc.)* **14**, 4578–4583 (1975).
146. Li, S., Peng, Z. & Leblanc, R. M. Method To Determine Protein Concentration in the Protein–Nanoparticle Conjugates Aqueous Solution Using Circular Dichroism Spectroscopy. *Anal. Chem.* **87**, 6455–6459 (2015).
147. Wangoo, N., Suri, C. R. & Shekhawat, G. Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. *Appl. Phys. Lett.* **92**, 133104 (2008).
148. Slocik, J. M., Govorov, A. O. & Naik, R. R. Plasmonic Circular Dichroism of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **11**, 701–705 (2011).
149. Laera, S. *et al.* Measuring Protein Structure and Stability of Protein–Nanoparticle Systems with Synchrotron Radiation Circular Dichroism. *Nano Lett.* **11**, 4480–4484 (2011).
150. Jiang, X., Jiang, J., Jin, Y., Wang, E. & Dong, S. Effect of Colloidal Gold Size on the Conformational Changes of Adsorbed Cytochrome c: Probing by Circular Dichroism, UV–Visible, and Infrared Spectroscopy. *Biomacromolecules* **6**, 46–53 (2005).
151. Kuramoto, N., Sakamoto, M., Komiyama, J. & Iijima, T. Complex formation between bovine serum albumin and poly(acrylic acid) as studied by viscometry, circular dichroism, and fluorescence spectroscopy. *Makromol. Chem.* **185**, 1419–1427 (1984).
152. Teramoto, A., Takagi, Y., Hachimori, A. & Abe, K. Interaction of albumin with polysaccharides containing ionic groups. *Polym. Adv. Technol.* **10**, 681–686 (1999).
153. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201500851 (2015). doi:10.1073/pnas.1500851112
154. Micsonai, A. *et al.* BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, W315–W322 (2018).
155. Bestsel (Beta Structure Selection). Available at: <http://bestsel.elte.hu/index.php>. (Accessed: 7th September 2018)
156. Huang, R. *et al.* Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain. *J. Biomed. Sci.* **14**, 121–128 (2007).
157. Mehra, N. K., Mishra, V. & Jain, N. K. Receptor-based targeting of therapeutics. *Ther. Deliv.* **4**, 369–394 (2013).
158. Su, Z. *et al.* Lactoferrin-Modified Poly(ethylene glycol)-Grafted BSA Nanoparticles as a Dual-Targeting Carrier for Treating Brain Gliomas. *Mol. Pharm.* **11**, 1823–1834 (2014).
159. Kumari, S., Ahsan, S. M., Kumar, J. M., Kondapi, A. K. & Rao, N. M. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433). *Sci. Rep.* **7**, 6602 (2017).
160. Hu, K. *et al.* Lactoferrin-conjugated PEG–PLA nanoparticles with improved brain delivery: In vitro and in vivo evaluations. *J. Controlled Release* **134**, 55–61 (2009).

161. Xie, H. *et al.* Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo. *Biomaterials* **32**, 495–502 (2011).
162. Chen, H. *et al.* Lactoferrin modified doxorubicin-loaded procationic liposomes for the treatment of gliomas. *Eur. J. Pharm. Sci.* **44**, 164–173 (2011).
163. Jiang, L. *et al.* pH/temperature sensitive magnetic nanogels conjugated with Cy5.5-labeled lactoferrin for MR and fluorescence imaging of glioma in rats. *Biomaterials* **34**, 7418–7428 (2013).
164. Fang, J.-H. *et al.* Magnetic Core–Shell Nanocapsules with Dual-Targeting Capabilities and Co-Delivery of Multiple Drugs to Treat Brain Gliomas. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1250–1260 (2014).
165. Singh, I. *et al.* Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *J. Drug Target.* **24**, 212–223 (2016).
166. Lee, D. Y., Lee, S. J. & Kim, H. S. Lactoferrin-Conjugated Nanoparticle Complex and Use Thereof. (2017).
167. Moore, S. A., Anderson, B. F., Groom, C. R., Haridas, M. & Baker, E. N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **274**, 222–236 (1997).
168. Lourdu Xavier, P., Chaudhari, K., Kumar Verma, P., Kumar Pal, S. & Pradeep, T. Luminescent quantum clusters of gold in transferrin family protein, lactoferrin exhibiting FRET. *Nanoscale* **2**, 2769–2776 (2010).
169. Bendedouch, D. & Chen, S. H. Structure and interparticle interactions of bovine serum albumin in solution studied by small-angle neutron scattering. *J. Phys. Chem.* **87**, 1473–1477 (1983).
170. Lu, J. R. *et al.* Surface-Induced Unfolding of Human Lactoferrin. *Langmuir* **21**, 3354–3361 (2005).
171. Brisson, G., Britten, M. & Pouliot, Y. Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: Effect of iron saturation. *Int. Dairy J.* **17**, 617–624 (2007).
172. Jakubowski, W. & Matyjaszewski, K. Activators Regenerated by Electron Transfer for Atom-Transfer Radical Polymerization of (Meth)acrylates and Related Block Copolymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4482–4486 (2006).
173. Chaduc, I., Lansalot, M., D'Agosto, F. & Charleux, B. RAFT Polymerization of Methacrylic Acid in Water. *Macromolecules* **45**, 1241–1247 (2012).
174. Renz, P., Kokkinopoulou, M., Landfester, K. & Lieberwirth, I. Imaging of Polymeric Nanoparticles: Hard Challenge for Soft Objects. *Macromol. Chem. Phys.* **217**, 1879–1885 (2016).
175. Stewart, P. L. Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **9**, e1417 (2017).
176. Bai, X., McMullan, G. & Scheres, S. H. W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 49–57 (2015).
177. Kokkinopoulou, M., Simon, J., Landfester, K., Mailänder, V. & Lieberwirth, I. Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell-interactions. *Nanoscale* **9**, 8858–8870 (2017).
178. Fox, T. L. *et al.* In Situ Characterization of Binary Mixed Polymer Brush-Grafted Silica Nanoparticles in Aqueous and Organic Solvents by Cryo-Electron Tomography. *Langmuir* **31**, 8680–8688 (2015).
179. Li, S. *et al.* Platinum nanoparticles: an exquisite tool to overcome radioresistance. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 4 (2017).
180. Liu, P. *et al.* Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma? *Nanoscale* **5**, 11829–11836 (2013).
181. Liu, P. *et al.* Silver nanoparticles outperform gold nanoparticles in radiosensitizing U251 cells in vitro and in an intracranial mouse model of glioma. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 5003–5014 (2016).
182. Ahamed, M., AlSalhi, M. S. & Siddiqui, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1841–1848 (2010).

183. Mallin, M. P. & Murphy, C. J. Solution-Phase Synthesis of Sub-10 nm Au–Ag Alloy Nanoparticles. *Nano Lett.* **2**, 1235–1237 (2002).
184. Singh, A. V., Bandgar, B. M., Kasture, M., Prasad, B. L. V. & Sastry, M. Synthesis of gold, silver and their alloy nanoparticles using bovine serum albumin as foaming and stabilizing agent. *J. Mater. Chem.* **15**, 5115 (2005).
185. Liu, S., Chen, G., Prasad, P. N. & Swihart, M. T. Synthesis of Monodisperse Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles with Tunable Size and Surface Plasmon Resonance Frequency. *Chem. Mater.* **23**, 4098–4101 (2011).
186. Ahmed, B. S. *et al.* Evaluation of Gold, Silver and Silver–Gold (Bimetallic) Nanoparticles as Radiosensitizers for Radiation Therapy in Cancer Treatment. *Cancer Oncol. Res.* **4**, 42–51 (2016).
187. Koukourakis, G. V. *et al.* Temozolomide with Radiation Therapy in High Grade Brain Gliomas: Pharmaceuticals Considerations and Efficacy; A Review Article. *Molecules* **14**, 1561–1577 (2009).
188. Sumerlin, B. S. Proteins as Initiators of Controlled Radical Polymerization: Grafting-from via ATRP and RAFT. *ACS Macro Lett.* **1**, 141–145 (2012).
189. Pelegri-O’Day, E. M. & Maynard, H. D. Controlled Radical Polymerization as an Enabling Approach for the Next Generation of Protein–Polymer Conjugates. *Acc. Chem. Res.* **49**, 1777–1785 (2016).
190. Gharib, M. *et al.* Sustainable Synthesis and Improved Colloidal Stability of Popcorn-Shaped Gold Nanoparticles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2019). doi:10.1021/acssuschemeng.9b00295

Chapitre 3. Interaction des nanoparticules avec les systèmes biologiques

TABLE DES MATIÈRES

I. Stabilité colloïdale en milieux biologiques	111
A. Etude par spectroscopie UV-visible.....	113
B. Etude par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	115
II. Migration dans la matrice extracellulaire	119
A. Le Matrigel® comme modèle de la MEC.....	120
B. Méthodologie.....	122
C. Résultats	124
1. Variation de la longueur de la couronne PMAA.....	127
2. Variation de la nature de la couronne	127
3. Impact des protéines greffées.....	129
III. Captation et localisation intracellulaire des NPs	130
A. Quelle est la cinétique d'internalisation ?	130
B. Quel est l'impact de la couronne polymère sur l'internalisation ?	132
1. Variation de la longueur de la couronne PMAA.....	134
2. Variation de la nature de la couronne	136
3. Impact des protéines greffées.....	139
C. Où sont localisées les NPs et dans quel état d'agrégation se trouvent-elles ?.....	141
1. Observation en microscopie électronique à balayage	142
2. Observation en microscopie électronique en transmission	145
D. Les NPs peuvent-elles être éliminées ?	154

IV. Cytotoxicité	156
A. Description de la méthode utilisée	157
B. Variation de la longueur de la couronne PMAA	158
C. Variation de la nature de la couronne.....	159
D. Impact de la Doxorubicine greffée.....	163
E. Impact des protéines greffées	164
V. Conclusions et perspectives.....	165
Bibliographie.....	172

Une fois les nanoparticules synthétisées et bien caractérisées, il était nécessaire d'étudier leurs interactions avec les systèmes biologiques. En effet, au-delà des propriétés radiosensibilisantes que l'on recherche pour nos objets, l'anticipation de leur comportement vis-à-vis de différents constituants du vivant (protéines, matrice extracellulaire, cellules) est primordiale dans une perspective d'application médicale. En particulier, nous allons chercher à évaluer l'impact des ligands polymères greffés en surface de nos nanoparticules d'or. Cette spécificité propre à nos objets devrait nous permettre, grâce à la gamme de polymères dont nous disposons, de mettre en évidence l'influence des propriétés physico-chimiques des NPs sur leurs interactions avec le vivant.

Différents aspects ont été étudiés et vont être détaillés dans ce chapitre. Sa structure a été choisie pour correspondre à la progression *in vivo* supposée de NPs injectées en intraveineuse : circulation dans le sang et exposition à diverses protéines, pénétration et diffusion dans la tumeur, internalisation dans les cellules, et induction d'une éventuelle toxicité. La stabilité des nanoparticules au contact de milieux biologiques sera ainsi abordée dans une première partie, avant d'exposer les tests de migration dans un modèle de matrice extracellulaire. Les résultats de deux études sur cellules seront ensuite exposés successivement : la captation cellulaire des NPs et leur localisation intracellulaire, puis leur cytotoxicité intrinsèque.

I. STABILITÉ COLLOÏDALE EN MILIEUX BIOLOGIQUES

Lorsque des NPs sont introduites dans un milieu biologique, elles peuvent subir diverses modifications liées à leurs interactions avec les constituants de ce milieu. Une dissolution est par exemple possible, même si elle est très limitée dans le cas des AuNPs, qui présentent une excellente stabilité chimique. Une étude récente a ainsi montré un taux de dissolution de seulement 3% pour des AuNPs de 5 nm de diamètre recouvertes de citrate, après 1 semaine d'incubation dans un milieu biologique.¹ Cependant, un problème récurrent et commun à toutes les NPs est l'apparition de phénomènes d'agrégation, voire de précipitation. De manière générale, le but est de limiter cette agrégation des NPs. En effet, ce phénomène peut avoir plusieurs conséquences négatives sur les interactions des NPs avec les cellules. Tout d'abord, la captation cellulaire est généralement réduite pour des agrégats par rapport aux mêmes nanoparticules bien dispersées.^{2,3} Des mécanismes d'internalisation différents peuvent d'ailleurs être mis en jeu selon l'état d'agrégation.⁴ Si les NPs vont jusqu'à sédimenter, une étude a mis en évidence une captation accrue, grâce à l'augmentation de la concentration à la surface des cellules, ce qui fausse les résultats *in vitro*.⁵ L'agrégation peut également modifier la toxicité des objets.⁶ Enfin, des simulations ont montré que l'effet radiosensibilisant des AuNPs est fortement atténué lorsque la distance inter-particules se réduit.⁷

Ce phénomène d'agrégation des NPs peut résulter de la présence de fortes concentrations en sels. En effet, les milieux biologiques, tels que le sang, sont caractérisés par des forces ioniques élevées.⁸ Celles-ci peuvent alors diminuer les forces de répulsion électrostatiques qui pouvaient exister entre les NPs, jusqu'à induire leur agrégation. Ce phénomène a été observé de nombreuses fois dans la littérature, et ce pour différents types de NPs.⁹⁻¹¹

D'autre part, l'agrégation peut aussi résulter de la présence de biomolécules dans le milieu. Il a été montré, lors de l'introduction de NPs dans un milieu biologique, qu'une couche de protéines adsorbées, appelée couronne protéique, se forme à leur surface.¹² C'est ce qui se passe dans le cas d'une injection intraveineuse par exemple, où les NPs sont exposées à la forte concentration de protéines qui se trouve dans le sang (60-80 g/L).¹³ Une stratégie très répandue consiste à recouvrir la surface des NPs de PEG, qui limite les interactions avec les protéines, rendant ainsi les NPs furtives et évitant leur agrégation.¹⁴ Cela permet d'améliorer la biocompatibilité des NPs et de prolonger leur temps de circulation dans le sang. Les études concernant la formation de cette couronne de protéines sont généralement réalisées dans des milieux de culture cellulaire supplémentés ou non en sérum (les milieux ne contiennent pas de protéines initialement, c'est l'ajout de sérum qui les apporte). Les différents travaux publiés rapportent deux observations opposées : soit une agrégation des NPs,¹⁵⁻¹⁸ soit une stabilisation.^{10,19-21} Le deuxième cas correspond à des situations où l'agrégation est observée dans le milieu sans sérum (force ionique élevée), mais où le phénomène est réduit, voire neutralisé, en présence de sérum. Plusieurs auteurs expliquent cette stabilisation par des effets stériques liés à la taille des protéines de la couronne.^{20,21} Dans le cas précis des AuNPs, différentes études ont montré, là encore, des résultats divers : stabilité dans les milieux de culture de AuNPs recouvertes de citrates,²² ou au contraire formation d'agrégats.²³ L'ajout de PEG greffés en surface des AuNPs a aussi été fréquemment utilisé pour améliorer la stabilité colloïdale.^{24,25}

Dans une perspective d'applications médicales des NPs, la caractérisation de leur stabilité colloïdale dans les milieux biologiques semble donc primordiale, en amont de tout autre test biologique. Pourtant, peu d'études *in vitro* et *in vivo* s'y sont intéressées. Dans notre cas, l'utilisation d'une couronne polymère greffée avait justement pour objectif de stabiliser les objets, à la manière des PEG-thiols souvent exploités. Nous avons donc cherché à évaluer la capacité de stabilisation des différents ligands polymères utilisés. Qualitativement, une excellente stabilité semble déjà observée dans l'eau pour l'ensemble de nos objets, puisque les solutions de NPs peuvent être conservées pendant plus d'un an sans qu'aucune déstabilisation (précipitation/décantation) ne se produise, et ce même pour de fortes concentrations de NPs (10 mg/mL). Nos NPs peuvent en outre être conservées à l'état de poudre, puis redispersées dans une solution aqueuse sans modification de leurs propriétés. Au-delà de l'aspect qualitatif, nous avons étudié la stabilité de nos NPs en milieux biologiques au travers de

deux techniques : les Au-PMAA(10,6) et Au-P(HEMA-MAA) ont tout d'abord été analysées par spectroscopie UV-visible, puis une étude complémentaire a été menée en SAXS sur l'ensemble de la gamme des NPs. L'objectif était, en particulier, de déterminer l'effet de la couronne polymère greffée.

A. ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

L'analyse par spectroscopie UV-visible des AuNPs permet d'identifier leur pic plasmon caractéristique, dont la position est notamment dépendante de la taille des NPs.²⁶ Ainsi, on s'attend à un déplacement et/ou à un élargissement du pic plasmon dans le cas d'un phénomène d'agrégation, mais uniquement si les distances inter-particules deviennent inférieures à 5 fois le rayon des particules.^{3,17,27} L'étude de stabilité a été réalisée dans quatre milieux aqueux différents :

- Eau déionisée (résistivité 18,2 MΩ.cm).
- Tampon DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*, classiquement utilisé en biologie), pH 7,0-7,3, qui contient 200 mg/L de chlorure de potassium, 2,4 g/L de phosphate de potassium, et 8 g/L de chlorure de sodium.²⁸
- Milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, le milieu utilisé dans nos tests *in vitro*), pH 6,8-7,2, qui contient entre autres 4,5 g/L de glucose, différents sels inorganiques dont le chlorure de sodium à 6,4 g/L et le bicarbonate de soude à 3,7 g/L, 15 acides aminés à des concentrations allant de 15 à 860 mg/L, et 8 vitamines.²⁹
- DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (conditions d'utilisation du milieu de culture pour nos tests *in vitro*). Le sérum contient notamment 30 à 45 g/L de protéines, des facteurs de croissance et des hormones.³⁰

On peut ainsi noter une complexification du milieu : présence de sels et pH contrôlé pour le DPBS, présence supplémentaire d'acides aminés, vitamines et glucose pour le DMEM, et présence de protéines pour le DMEM supplémenté. Le DMEM utilisé pour cette expérience ne contient pas le colorant Phénol Red habituellement présent, car il absorbe dans la gamme de longueurs d'onde d'intérêt. La comparaison de ces quatre conditions devrait permettre d'identifier les causes d'une éventuelle agrégation.

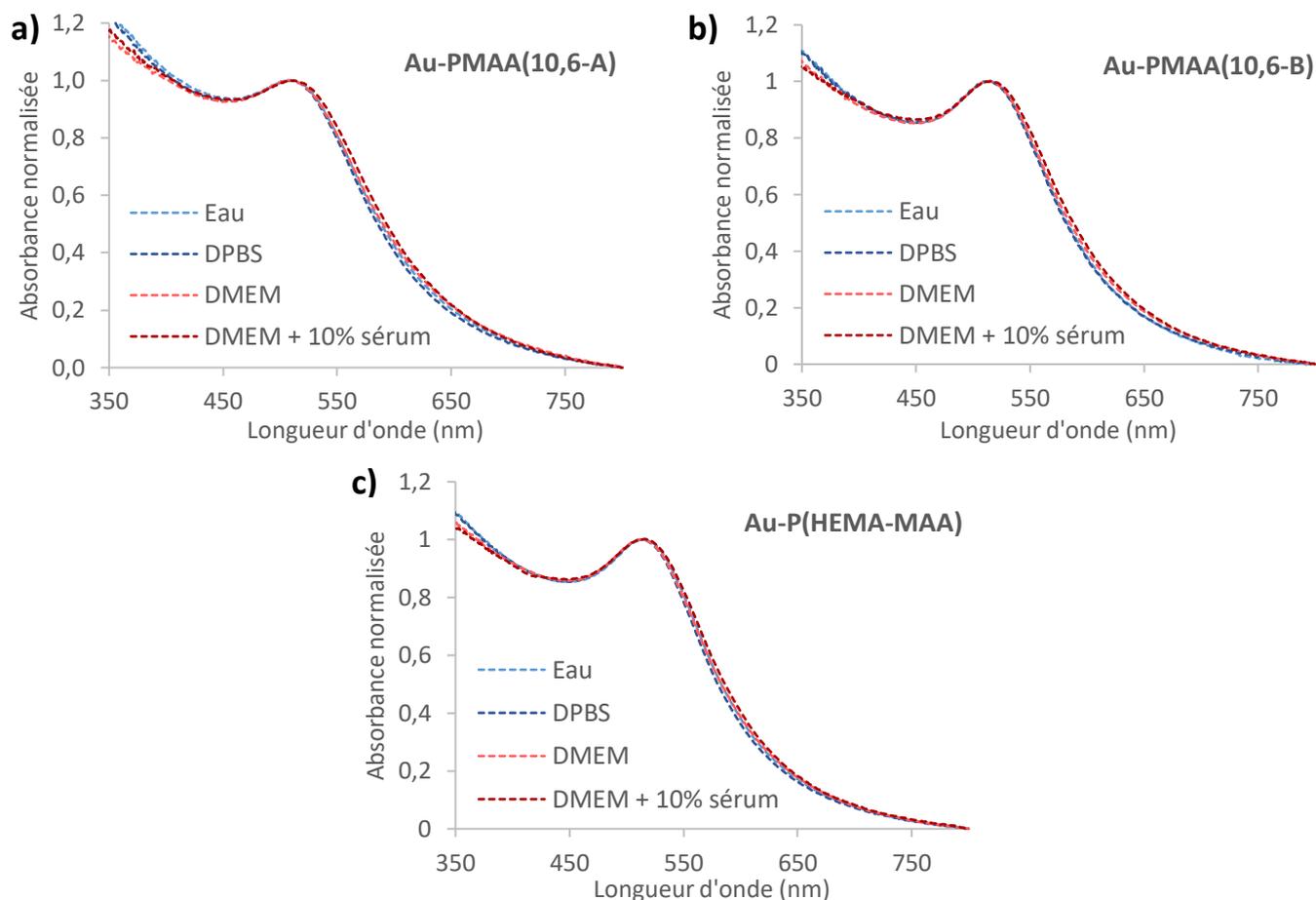


Figure III.1 - Spectres d'absorbance dans l'eau, le DPBS, le DMEM et le DMEM supplémenté en sérum
(a) Au-PMAA(10,6-A), (b) Au-PMAA(10,6-B) et (c) Au-P(HEMA-MAA)

Les spectres d'absorbance des Au-PMAA(10,6) et Au-P(HEMA-MAA) sont présentés sur la Figure III.1. Ils ont été normalisés par la valeur maximale du pic plasmon, pour mieux mettre en valeur d'éventuelles modifications. Celui-ci est bien visible pour tous les spectres, et sa localisation ne semble pas affectée par le changement de milieu. On peut cependant observer un très léger élargissement du pic vers les grandes longueurs d'onde lorsqu'on passe de l'eau au DMEM supplémenté, mais cela reste minime, et ce même en présence d'une quantité importante de sels et de protéines. Cet élargissement pourrait traduire la présence de protéines qui seraient en interaction avec nos NPs.³¹ Les résultats de dichroïsme circulaire présentés dans le chapitre 2 (§ IV.B.1.b) allaient d'ailleurs dans ce sens, puisqu'ils avaient démontré l'existence d'interactions entre les Au-PMAA et la BSA, qui est le constituant majeur du sérum de veau fœtal.

La stabilité dans le temps a également été évaluée dans le DMEM et le DMEM supplémenté en sérum, car il a été montré que la stabilité colloïdale des NPs et la composition de la couronne de protéines pouvaient évoluer selon la durée d'exposition.³² Une deuxième série de mesures a ainsi été effectuée après 7 jours au contact des milieux (Figure III.2). Aucune précipitation n'a été observée, et le pic

plasmon ne semble pas subir de modification significative, montrant l'excellente stabilité de nos NPs en milieux biologiques, même après un temps d'exposition prolongé.

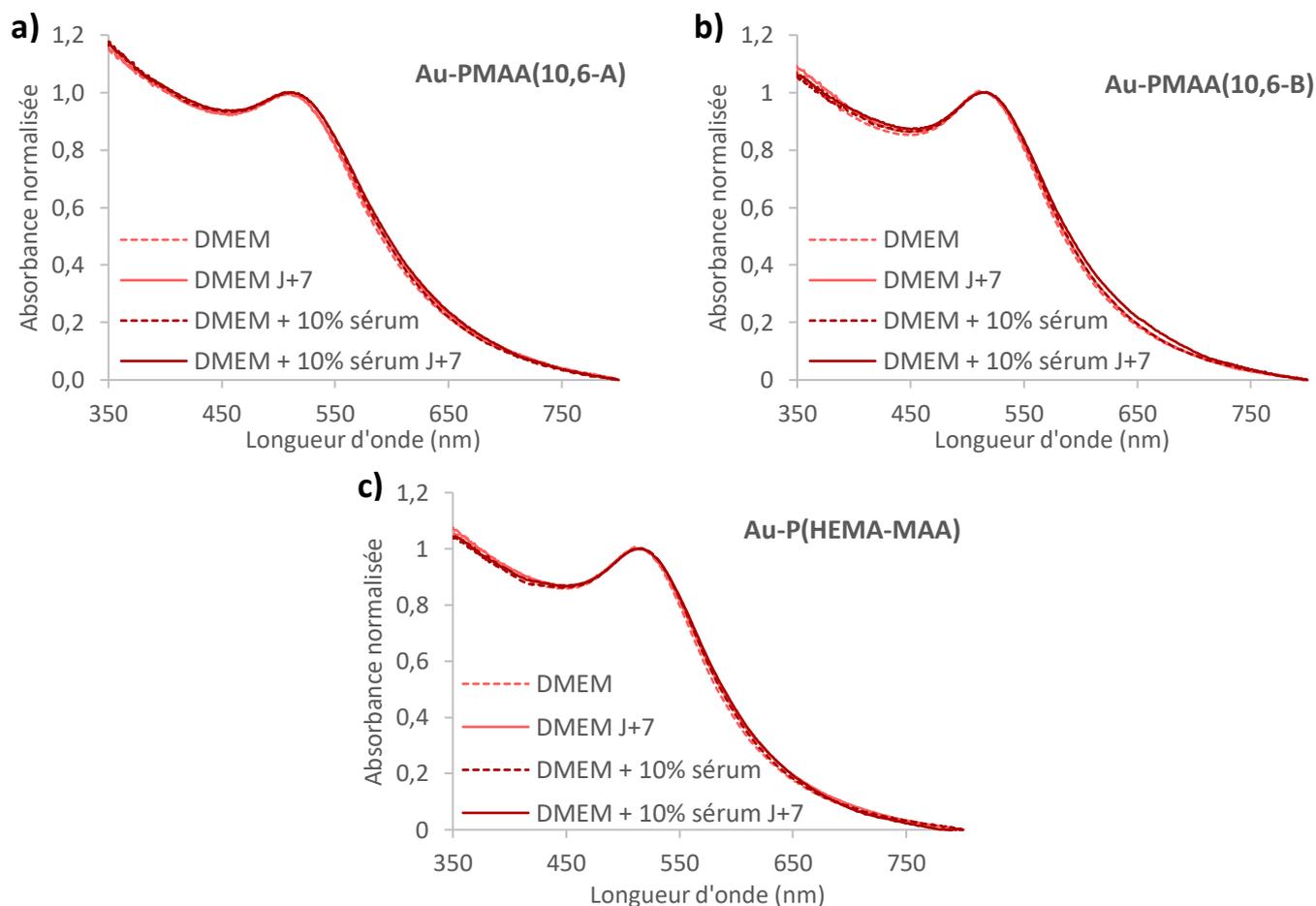


Figure III.2 - Evolution des spectres d'absorbance après 7 jours dans le DMEM et le DMEM supplémenté en sérum (a) Au-PMAA(10,6-A), (b) Au-PMAA(10,6-B) et (c) Au-P(HEMA-MAA)

L'étude en UV-visible suggère donc l'absence de phénomènes d'agrégation pour les Au-PMAA(10,6) et Au-P(HEMA-MAA) en milieux biologiques. Cependant, cette technique basée sur la localisation du plasmon est généralement considérée comme qualitative. Dans notre cas, la présence des chaînes polymères peut en outre limiter sa sensibilité, en empêchant un rapprochement des cœurs suffisant pour être détecté (distance inter-particules inférieure à 5 fois le rayon des particules²⁷). C'est pourquoi nous avons également utilisé le SAXS pour confirmer ces résultats.

B. ÉTUDE PAR DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES (SAXS)

A notre connaissance, le SAXS n'a jamais été exploité pour effectuer ce type d'étude. La plupart des publications utilisent en effet la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* en anglais, ou DLS) pour mesurer les rayons hydrodynamiques des nano-objets. Le TEM est souvent utilisé en complément, pour observer directement les morphologies des agrégats. Cependant, une augmentation du rayon hydrodynamique en DLS peut signifier à la fois une agrégation des NPs ou la

formation d'une couronne de protéines. Il est donc difficile de distinguer les deux phénomènes. En SAXS, seul le cœur d'or diffuse, et toute modification de sa taille ou des distances inter-particules impactera son signal. L'agrégation, par exemple, se traduit par une remontée du signal aux petits angles. L'utilisation de cette technique permet donc de gagner en précision concernant l'analyse de la stabilité des NPs en milieux biologiques.

Nous avons cette fois analysé l'ensemble de la gamme de nos objets Au-polyméthacrylates. Comme pour l'étude en UV-visible, les solutions de NPs sont préparées dans l'eau milliQ, le DPBS, le DMEM, et le DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. On ajoute une solution supplémentaire préparée dans du DMEM supplémenté ayant été utilisé pour incuber des cellules. Ce nouveau milieu gagne encore en complexité puisqu'il peut contenir des débris cellulaires et/ou des composés rejetés par les cellules, qui peuvent eux aussi impacter la stabilité des NPs. Nous avons commencé par effectuer les mesures dans l'eau et le DMEM exposé aux cellules pour l'ensemble de la gamme. Puis, dans un deuxième temps, des mesures supplémentaires ont été réalisées dans les milieux de complexité intermédiaire, pour les NPs qui présentaient une différence entre l'eau et le DMEM exposé (toutes sauf Au-PDMAEMA et Au-P(DMAEMA-MAA)).

Les mesures ont été réalisées à la fois en laboratoire et en synchrotron, sur la ligne SWING de Soleil. Ainsi, les gammes de q diffèrent d'une mesure à l'autre car les configurations n'étaient pas identiques (paramètres détaillés en Annexe A). Les diagrammes de diffusion obtenus sont présentés sur la Figure III.3.

• Eau • DPBS • DMEM • DMEM + 10% sérum • DMEM exposé aux cellules

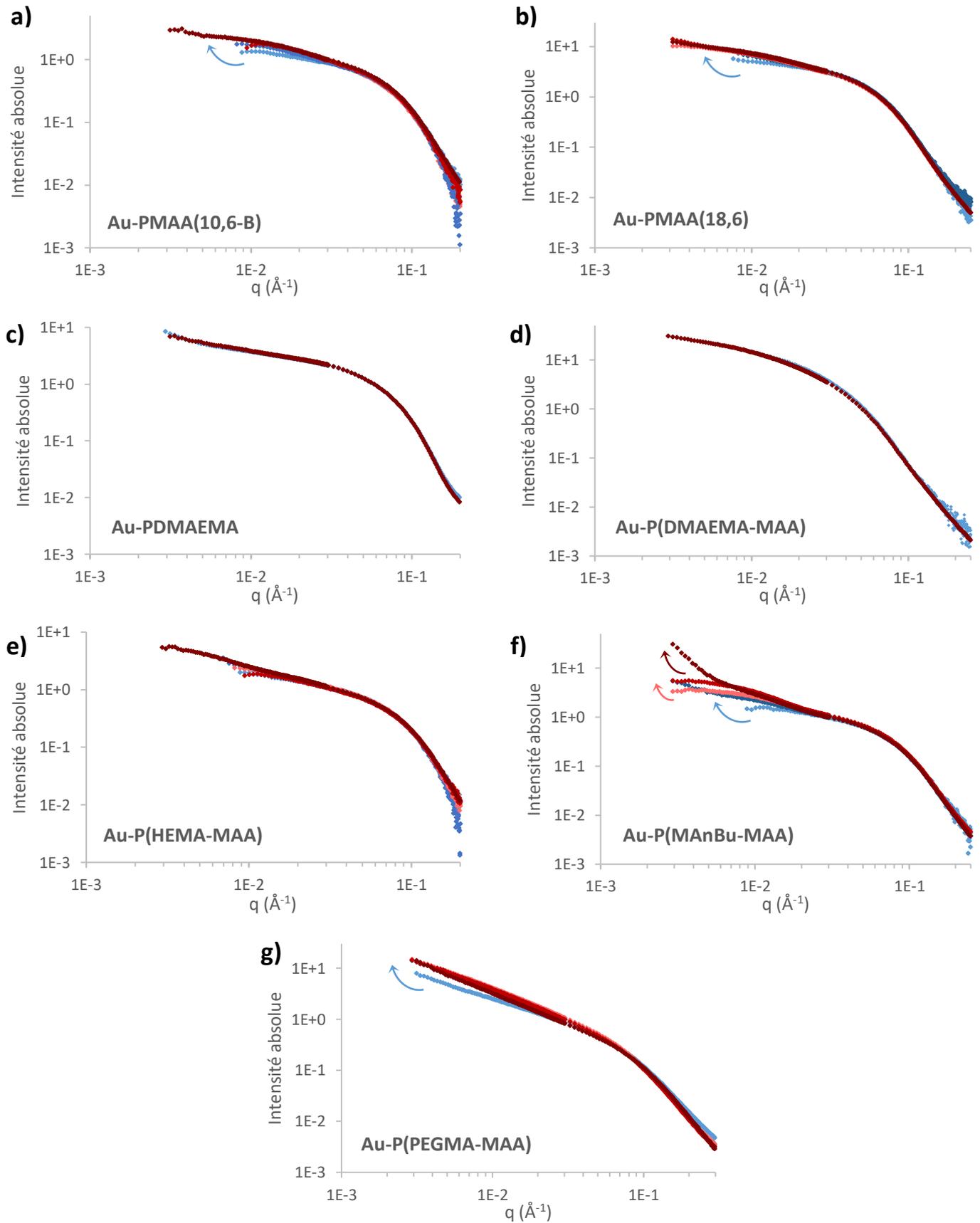


Figure III.3 - Diagrammes SAXS des NPs dans l'eau, le DPBS, le DMEM, le DMEM supplémenté en sérum et le DMEM exposé à des cellules

(a) Au-PMAA(10,6-B), (b) Au-PMAA(18,6), (c) Au-PDMAEMA, (d) Au-P(DMAEMA-MAA), (e) Au-P(HEMA-MAA), (f) Au-P(MAnBu-MAA) et (g) Au-P(PEGMA-MAA)

De manière générale, les courbes correspondant à un même type de NPs sont très proches pour tous les milieux testés, ce qui démontre une très bonne stabilité colloïdale. En particulier, aucune différence significative n'est observable pour les Au-PDMAEMA (Figure III.3c) et Au-P(DMAEMA-MAA) (Figure III.3d). Pour toutes les autres NPs, on note une faible remontée aux petits angles au fur et à mesure que le milieu se complexifie, ce qui peut traduire de faibles interactions attractives entre les NPs, ou bien une légère agrégation. Les phénomènes sont cependant minimes, excepté pour les Au-P(MAnBu-MAA), dont le cas est discuté ci-dessous. Pour la plupart des NPs, les différences entre l'eau et le DPBS semblent les plus importantes (flèches bleues sur la Figure III.3), ce qui pourrait indiquer que c'est la présence de sels ou du tampon qui induit ces interactions attractives. On peut par exemple supposer que les sels jouent un rôle d'écrantage de la charge des polymères.

Les Au-P(MAnBu-MAA) (Figure III.3f) sont celles pour lesquelles la variation est la plus importante entre les différents milieux. Notamment, on observe, uniquement dans le cas du DMEM exposé aux cellules, une forte remontée qui commence autour de $5 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ (flèche rouge sur la Figure III.3f) et qui traduit la formation d'objets plus gros. Puisque ces NPs se différencient des autres par un caractère hydrophobe plus important (présence du MAnBu), on peut faire l'hypothèse que les ligands polymères interagissent avec des bouts de membrane plasmique présents dans le milieu. On peut également noter qu'une remontée aux petits angles plus modérée est déjà visible dans le DMEM supplémenté (flèche rose sur la Figure III.3f), ce qui pourrait aussi indiquer des interactions avec les protéines.

Les deux techniques utilisées ici (UV-visible et SAXS) ont donc permis de mettre en évidence l'excellente stabilité des Au-polyméthacrylates en milieux biologiques, ce qui souligne l'avantage d'avoir ce type de couronne polymère en surface des AuNPs.

Malgré ces très bons résultats, la généralisation de cette stabilité est à nuancer. En effet, plusieurs études portant sur la couronne de protéines ont mis à jour la variabilité qu'il pouvait exister d'un milieu biologique à l'autre : Maiorano *et al.* ont obtenu des résultats différents pour deux milieux de culture distincts,²² Johnston *et al.* montrent des différences selon que leurs AuNPs soient exposées à des protéines issues du sérum ou des alvéoles pulmonaires de souris,³² tandis que Izak-Nau *et al.* ont souligné l'impact de la provenance du sérum (humain ou animal).¹⁰ La diversité des protéines en interaction avec les NPs pourrait donc entraîner des comportements variables, non seulement du point de vue de l'agrégation, mais aussi en termes de captation cellulaire et de toxicité.²² Dans une perspective d'injection intraveineuse, il faut également souligner que le sérum n'est pas un modèle parfait, en particulier car il ne contient pas les hématies. Ainsi, cela souligne à la fois l'importance et la

complexité du choix des conditions des tests *in vitro* pour pouvoir être le plus fidèle possible à celles du *vivo*.

II. MIGRATION DANS LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Dans le cas d'une injection intraveineuse, une fois que les nanoparticules se trouvent dans le sang, elles peuvent pénétrer dans la tumeur en passant à travers les parois de ses vaisseaux sanguins, comme le prévoit l'effet EPR mentionné dans le chapitre 1 (§ I.B). Leur déplacement à l'intérieur de la tumeur est alors principalement régi par le mécanisme de diffusion, car le transport par convection est rendu négligeable à cause de la pression du liquide interstitiel, très élevée dans les tumeurs.³³ La diffusion s'effectue dans la matrice extracellulaire (MEC) tumorale, qui est constituée d'un réseau 3D dense de protéines fibreuses, dont le collagène fait partie, en interaction avec d'autres molécules comme des glycoprotéines. Les cellules, tumorales ou non, sont intégrées dans cette matrice (Figure III.4). Les tumeurs sont caractérisées par une MEC plus dense et rigide que celle des tissus sains, à cause d'une réticulation plus importante du collagène.³⁴ Dans la littérature, les études *in vivo* rapportent des coefficients de diffusion faibles pour les macromolécules dans différentes tumeurs.³⁵ L'équipe de Chan a ainsi récemment montré que la plupart des NPs atteignant la tumeur après une injection intraveineuse restent bloquées dans la MEC à cause d'une diffusion limitée : sur les faibles 0,7% qui arrivent dans la tumeur, seuls 0,0014% vont pouvoir interagir avec les cellules cancéreuses.³⁶ Cette incapacité à atteindre l'ensemble de la tumeur est identifiée comme étant un frein majeur au transfert des nanomédicaments vers la clinique.³⁷

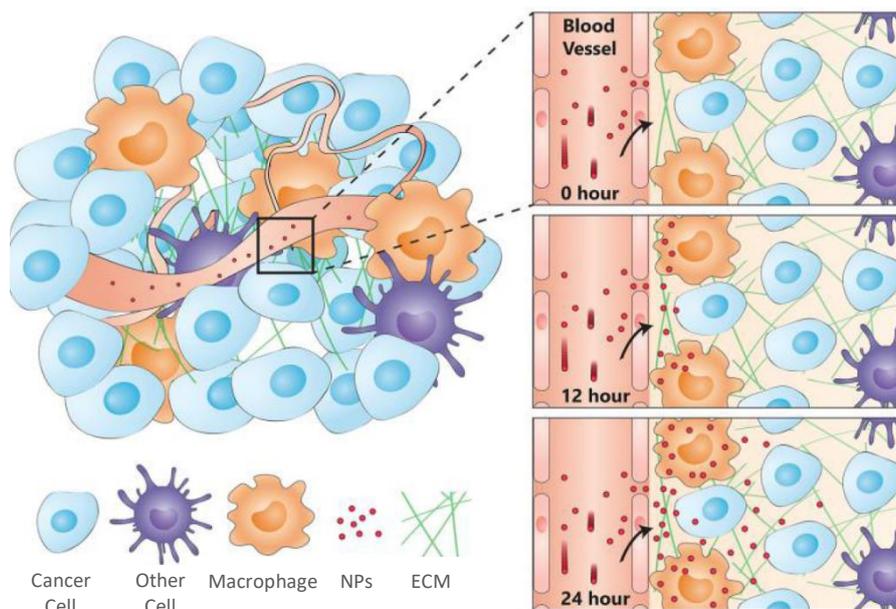


Figure III.4 - Schématisation de la structure d'une tumeur et de la pénétration et diffusion de nanoparticules dans cette tumeur³⁶

Quelques études, en grande partie publiées par les équipes de Jain et Chan, ont cherché à évaluer la diffusion de macromolécules et de NPs dans différents modèles de MEC. Elles ont permis d'établir que le coefficient de diffusion d'une NP dépend de sa taille et sa forme, mais aussi de ses propriétés physico-chimiques, qui vont déterminer sa propension à interagir avec les composants de la MEC.³⁷ Concernant le critère de taille, il a été vérifié à plusieurs reprises que le coefficient de diffusion diminuait quand la taille des objets augmentait.^{3,38} Ce résultat attendu a d'ailleurs été confirmé *in vivo*.^{35,39} Hansing *et al.* ont cependant démontré que, dans le cas d'interactions électrostatiques attractives entre les NPs et la matrice, les grosses NPs diffusent plus vite que les petites.⁴⁰ La charge surfacique des NPs semble en effet jouer un rôle primordial. Plusieurs études expérimentales avec des particules polymères ont montré que les particules chargées positivement ou négativement diffusent plus lentement dans la MEC que les particules neutres.^{41,42} Les études théoriques menées sur le sujet semblent obtenir des résultats similaires.^{40,43} L'équipe de Jain a également mis en évidence que les macromolécules aux configurations linéaires et semi-flexibles diffusent plus efficacement dans des matrices d'agarose que des particules rigides et sphériques.⁴⁴ Les propriétés de la MEC elle-même sont également déterminantes, et la difficulté vient de la variabilité de la MEC, non seulement d'un type de tumeur à l'autre, mais également pour un même type implanté à deux endroits différents.³⁵ Les études semblent désigner la proportion de collagène comme étant le facteur déterminant pour le transport dans la MEC : la diffusion est notablement entravée dans les tumeurs riches en collagène.⁴⁵

L'ensemble de ces résultats ne permet cependant pas de conclure quant aux propriétés qu'une NP doit posséder pour diffuser de manière optimale dans la MEC. Peu d'études se sont intéressées à cette problématique, pourtant primordiale. Certains modèles de MEC utilisés semblent en outre peu valables (voir paragraphe suivant). Ayant à disposition une gamme de NPs greffées polymères de structures similaires, mais possédant des propriétés différentes grâce à la variation de la nature du polyméthacrylate, nous avons donc cherché à comparer leurs coefficients de diffusion dans un modèle de MEC. Le choix du modèle va être explicité dans un premier temps, avant de décrire la méthodologie mise au point, puis les résultats obtenus.

A. LE MATRIGEL® COMME MODÈLE DE LA MEC

Au-delà du domaine des NPs, l'étude de la diffusion dans les tissus biologiques a un intérêt pour diverses applications médicales. Plusieurs modèles reproduisant les propriétés des tissus, et en particulier de la MEC, ont donc été rapportés dans la littérature. Les gels d'agarose ont par exemple été utilisés comme modèles de certains tissus du cerveau,^{46,47} ou exploités pour analyser la diffusion de nanoparticules magnétiques dans la MEC.⁴⁸ D'autres gels synthétiques, à base de peptides ou d'acide hyaluronique, ont également été développés par les fournisseurs de matériel de biologie.⁴⁹

Cependant, si les caractéristiques de porosité des gels sont proches de celles de la MEC, les propriétés chimiques sont, elles, bien différentes. En particulier, le caractère hétérogène et les propriétés électrostatiques de la MEC ne sont pas reproduites avec ce type de gel. Les tests de diffusion effectués dans ces conditions occultent donc le rôle des affinités entre NPs et matrice pour ne prendre en compte que les contraintes morphologiques du réseau poreux.

Une autre approche souvent utilisée est l'utilisation de constituants de la MEC, comme le collagène, la fibronectine ou encore la laminine, pour produire des modèles simplifiés à seulement un ou deux composants.^{38,41,50} Avec ce type de matrice, obtenue à partir de constituants naturels cette fois, les propriétés se rapprochent de celles de la MEC. Pourtant, Lieleg *et al.* ont montré que ces matrices simplifiées ne permettent pas de reproduire les fonctions de barrière électrostatique de la MEC native.⁴¹ L'étude de Tomasetti *et al.* va également dans ce sens, en pointant les propriétés inadaptées des matrices de collagène : les tailles des pores sont bien plus importantes que celles de la MEC native, et sa charge est globalement neutre, tandis que la MEC est chargée négativement à pH neutre.⁵¹ Ces résultats mettent en avant la complexité de la MEC, qu'il est difficile de reproduire de manière fidèle.

L'utilisation d'extraits de MEC permettrait *a priori* d'imiter au mieux ses propriétés natives. Le Matrigel[®], commercialisé par Corning, est par exemple une préparation solubilisée de protéines de MEC extraites d'une tumeur murine choisie pour sa MEC abondante (sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm).⁵² Des produits équivalents, extraits du même type de tumeur, sont également disponibles sur le marché sous d'autres appellations. Puisqu'il est issu d'une matrice réelle, le Matrigel[®] a l'avantage de contenir tous les composants de la MEC. Cette solution de protéines gélifie lorsqu'elle est incubée à 37°C et forme un gel biologiquement actif, permettant la différenciation cellulaire et la croissance de tumeurs.⁵² C'est pourquoi le Matrigel[®] est très utilisé dans les modèles de cancers. En termes de structure, il a été montré que les caractéristiques topographiques du réseau constitutif de ce gel sont similaires à celles de MEC natives.⁵³ Les propriétés électrostatiques sont également bien reproduites.⁵¹ Le module élastique pourrait par contre différer légèrement de celui mesuré sur des MEC natives, en particulier à température ambiante,⁵⁴ et la pression interne sera également différente par rapport à celle observée *in vivo* dans les tumeurs. Le Matrigel[®] semble être la solution la plus adaptée pour obtenir un modèle de MEC valable. Certaines études l'ont également utilisé en le supplémentant avec du collagène ou de la fibronectine pour faire varier ses propriétés mécaniques et/ou pour se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, en particulier pour imiter l'environnement du front invasif des cancers.⁵⁵⁻⁵⁷

Une dernière option est d'utiliser des MEC natives décellularisées, directement obtenues à partir de tissus *in vivo*.⁵⁸ Cependant, les procédures pour isoler la MEC sont complexes, et nécessitent des

quantités importantes de tissus. Ce n'est donc pas une solution envisageable dans le cadre de notre étude.

Pour réaliser nos tests de diffusion, nous avons donc choisi d'utiliser le Matrigel® comme modèle de MEC. La concentration en protéines a été fixée à 8 mg/mL, afin de se rapprocher des conditions utilisées par Tomasetti *et al.* dans une étude similaire. A cette concentration, un gel transparent est obtenu après une incubation prolongée à 37°C. La méthodologie développée pour évaluer les coefficients de diffusion des NPs dans ce modèle de MEC est expliquée dans le paragraphe suivant.

B. MÉTHODOLOGIE

Pour observer la capacité de diffusion de composés dans des gels, plusieurs méthodes ont été développées et décrites dans la littérature. Les techniques expérimentales utilisées se basent très souvent sur des mesures optiques, mais on distingue différentes échelles d'analyse : soit très localisée avec la spectroscopie de corrélation de fluorescence⁵⁹ ou la redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP en anglais),^{38,45,51} soit plus macroscopique, avec une grande variété de techniques telles que la spectrophotométrie en UV-visible,^{60,61} la microscopie confocale,^{36,62} l'imagerie par UV,^{63,64} ou encore la microtomographie aux rayons X (absorption⁶⁵ ou fluorescence X⁶⁶). Deux publications utilisent aussi des techniques d'analyse d'images à partir de simples photographies.^{48,67}

Dans notre cas, les techniques reposant sur des mesures de fluorescence dans l'UV-visible sont à proscrire, puisque cela nécessiterait de greffer un fluorophore à la surface de nos NPs, ce qui pourrait modifier leur comportement dans la MEC. L'objectif est donc d'exploiter les propriétés optiques des AuNPs natives : leur fluorescence X, ou bien leur absorbance dans le visible, produite par l'effet de résonance plasmon de surface, dont résulte leur couleur rouge caractéristique.

Nous avons d'abord voulu mesurer la concentration en NPs le long du profil de diffusion par fluorescence X. L'or ayant un numéro atomique élevé (79), son rendement de fluorescence X est important.⁶⁸ En collaboration avec Hermine Lemaire, Hugues Paradis et Adrien Stolidi (DISC, LIST), un test a donc été réalisé sur un gel d'agarose contenant des AuNPs (concentration en or d'environ 1 mg/mL). Aucun pic caractéristique de l'or n'a pu être détecté (résultats non présentés). On peut supposer que les raies L, moins énergétiques, ont été absorbées par l'épaisseur du gel, puisque seuls 7% sont transmis pour 5 mm d'eau.⁶⁹ Concernant les raies K, cela peut s'expliquer par le détecteur utilisé (CdTe), qui est très sensible au signal diffusé dans leur gamme d'énergie. Ce signal parasite provient probablement du plastique constituant le support et du gel, qui peuvent entraîner une diffusion importante du rayonnement et ainsi diminuer le rapport signal sur bruit. Avec un détecteur et des conditions de mesures plus adaptées, on devrait cependant pouvoir mesurer de telles

concentrations, puisque le platine ($Z = 78$) a déjà été détecté par microtomographie de fluorescence X avec une limite de détection de $10 \mu\text{g/mL}$ sur des échantillons de quelques centaines de microns d'épaisseur.⁶⁶ Dans le cadre de cette étude, nous n'avons cependant pas cherché à poursuivre avec cette technique.

La deuxième stratégie a consisté à exploiter la couleur rouge des AuNPs pour mettre au point une méthode simple, basée sur la coloration progressive du gel à mesure que les NPs diffusent à l'intérieur. La reproductibilité de la photographie étant primordiale, un système de positionnement des échantillons et d'éclairage maîtrisés a été utilisé, avec l'aide de Jean-Charles Méaudre (LAPA, NIMBE), afin d'obtenir des conditions de photographie comparables d'un test à l'autre. Des références internes (visibles sur la Figure III.5) ont également été placées sur chaque prise de vue pour pouvoir ensuite mettre les images à l'échelle et ajuster leur couleur si besoin.

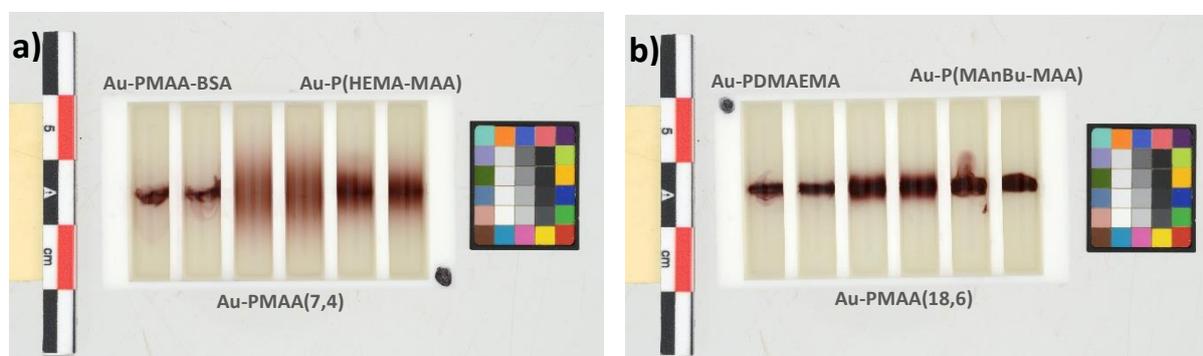


Figure III.5 - Photos du dispositif de diffusion des AuNPs dans la MEC :
 (a) Au-PMAA-BSA, Au-PMAA(7,4), Au-P(HEMA-MAA) 14 jours après l'injection
 (b) Au-PDMAEMA, Au-PMAA(18,6), Au-P(MAnBu-MAA) 14 jours après l'injection

La géométrie choisie pour ces tests de diffusion est inspirée des gels d'électrophorèse (Figure III.5). Contrairement à l'électrophorèse, où le champ électrique oriente le déplacement des molécules, il était nécessaire dans notre cas de contraindre la diffusion dans une seule dimension. La fabrication d'un support dédié, composé de pistes étroites et séparées par des parois, a été réalisée par impression 3D. En injectant des solutions de NPs dans des puits placés au centre du gel contenu dans chaque piste, la diffusion s'effectue de manière symétrique, de chaque côté des puits. Puisque les pistes sont étroites, et le gel peu épais, on peut considérer que la diffusion s'effectue dans une seule dimension, ce qui facilite l'analyse. Ce dispositif a également l'avantage de posséder plusieurs pistes, on peut ainsi observer la diffusion de différents composés en parallèle, au sein d'une même expérience.

Les profils de diffusion ont été obtenus par analyse des photographies avec le logiciel ImageJ. On considère ici que l'intensité de la couleur rouge est corrélée à la concentration en NPs. Les profils

obtenus ont donc été modélisés par la fonction suivante, qui est une solution de la loi de Fick en 1D, pour une source instantanée et localisée : ⁷⁰

$$C(x, t) = C_0 \exp \left[- \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)^2 \right] = \frac{Q}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp \left[- \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)^2 \right] \quad (III. 1)$$

avec x la distance de diffusion, t la durée de diffusion, C_0 la concentration en NPs au point d'injection au temps t , Q la quantité initiale de NPs par unité de surface et D le coefficient de diffusion. Ce dernier est donc obtenu à partir des résultats de la modélisation.

Les premiers tests ont été réalisés avec des gels d'agarose, afin de mettre au point la technique. Les mesures ont ensuite été effectuées avec du Matrigel[®] gélifié, pour modéliser au mieux la MEC.

C. RÉSULTATS

Comme on peut déjà l'observer qualitativement sur les photos de la Figure III.5, les différentes NPs étudiées présentent d'importantes différences de comportement dans le Matrigel[®]. Certaines diffusent dans la matrice (Au-PMAA(7,4)), tandis que d'autres semblent complètement immobiles, même 14 jours après l'injection (Au-PMAA-BSA).

Certains des profils de diffusion reconstitués à partir des photos sont représentés sur la Figure III.6a, ainsi que leurs modélisations par la fonction exprimée dans l'équation (1). Chaque profil correspond à la mesure de l'intensité moyennée sur la largeur pour une demi-piste. Le modèle choisi semble tout à fait approprié, et ce d'autant plus que les NPs diffusent (meilleure adéquation pour les Au-PMAA(7,4) que les Au-PMAA(18,6) par exemple). En effet, on peut alors négliger l'épaisseur initiale de la ligne d'injection, qui n'est pas prise en compte dans ce modèle puisqu'il prend comme hypothèse une source localisée. Les coefficients de diffusion sont obtenus directement à partir de ces modélisations.

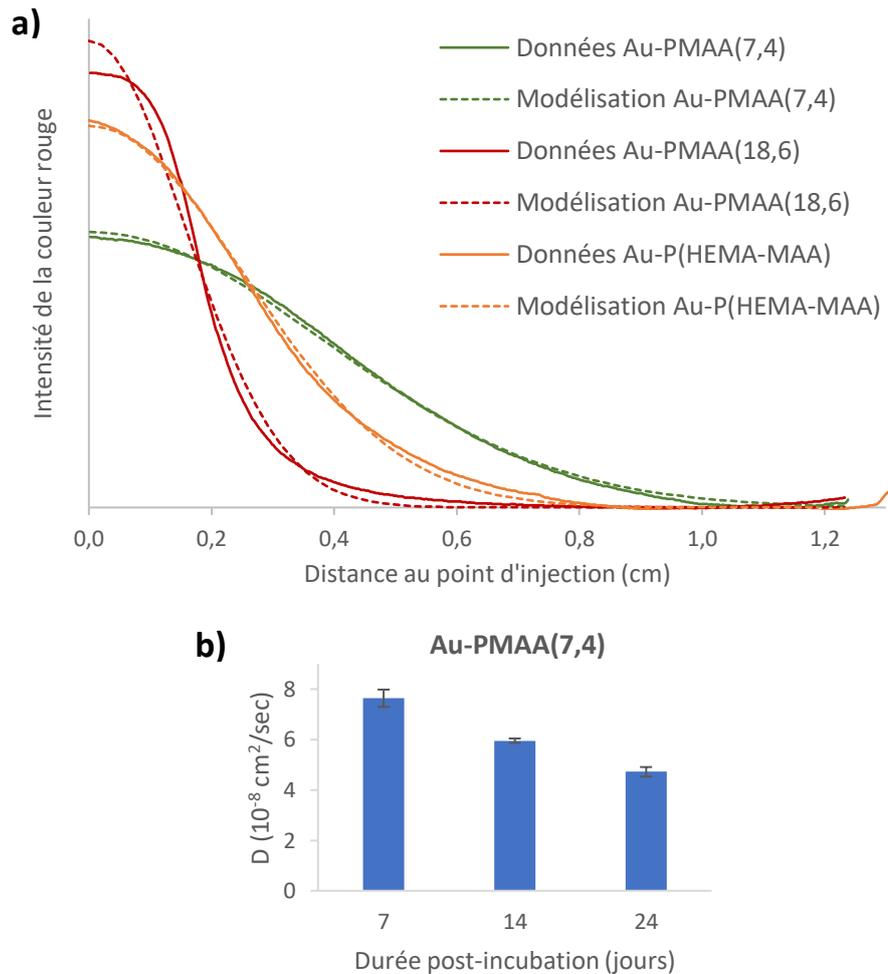


Figure III.6 - (a) Profils et courbes de modélisation de la diffusion des NPs dans le Matrigel® 14 jours après l'injection : Au-PMAA(7,4), Au-PMAA(18,6) et Au-P(HEMA-MAA)
 (b) Evolution du coefficient de diffusion mesuré en fonction de la durée post-injection pour les Au-PMAA(7,4) dans un même lot de Matrigel®

En réalisant des mesures à différents temps post-injection, on note une diminution progressive du coefficient de diffusion, comme on peut le voir sur la Figure III.6b dans le cas des Au-PMAA(7,4). Cela pourrait traduire une évolution de la matrice, comme une réticulation qui se poursuit ou un séchage du gel sur le long terme. La première hypothèse semble toutefois peu plausible car il a été montré que les propriétés mécaniques du Matrigel® se stabilisaient à 37°C au bout de quelques dizaines de minutes seulement.⁷¹ Concernant le séchage, nous avons cherché à le limiter en plaçant le gel en incubation dans une atmosphère saturée en humidité. Après deux semaines, il est toutefois possible qu'une modification des propriétés structurales et/ou chimiques du gel ait eu lieu. On peut tout de même noter qu'aucune altération du gel n'est observable à l'œil nu ou par pesée.

Cette diminution du coefficient de diffusion pourrait également provenir d'interactions des NPs avec la matrice : des échanges de ligands avec des thiols naturellement présents dans le Matrigel®, par exemple les cystéines que comportent les protéines de la MEC, ou bien l'adsorption de molécules à la

surface des NPs. Même si elle est globalement chargée négativement, la MEC est très hétérogène d'un point de vue électrostatique, car les protéines qui la composent possèdent non seulement des charges globales diverses, mais aussi des zones plus ou moins riches en charges positives ou négatives.^{41,51} Ainsi, les Au-PMAA pourraient être stoppées dans leur processus de diffusion lorsqu'elles rencontrent une zone chargée positivement, *a priori* plus rare, entraînant la diminution du coefficient de diffusion mesuré.

Considérant cette évolution temporelle des mesures, nous avons donc choisi de comparer les valeurs obtenues pour une même durée de diffusion post-injection. Pour pouvoir effectuer des mesures sur des NPs diffusant lentement, nous avons fixé cette durée à 14 jours.

Une étude de reproductibilité de la mesure a en outre été effectuée sur les Au-PMAA(7,4), qui sont celles présentant le coefficient de diffusion le plus élevé. Trois lots de Matrigel® ont été testés, sur lesquels quatre mesures ont été effectuées. Un coefficient de diffusion moyen de $4,4 \cdot 10^{-8}$ cm²/sec a été obtenu, avec un écart-type inférieur à 10% sur chaque lot, mais de 40% sur l'ensemble des trois lots. Cela s'explique certainement par l'existence d'une forte variabilité des propriétés du Matrigel® d'un lot à l'autre, une caractéristique largement admise dans la littérature.⁷²⁻⁷⁴ Puisque les mesures de l'ensemble de la gamme de NPs ont dû être réalisées avec des lots différents de Matrigel®, nous avons utilisé les Au-PMAA(7,4) comme référence, afin de s'affranchir de cette variabilité. Les coefficients de diffusion sont donc évalués par rapport au coefficient mesuré pour les Au-PMAA(7,4) dans le même lot de Matrigel®. Les valeurs moyennes ainsi obtenues sont résumées dans le Tableau III.1. Elles résultent de l'analyse de 4 profils de diffusion distincts. Certains coefficients n'ont pas pu être calculés, puisque les NPs ne diffusaient pas, ou trop peu, pour pouvoir appliquer le modèle. C'est le cas des Au-PDMAEMA, Au-P(MAnBu-MAA) et des Au-PMAA-BSA. Dans le Tableau III.1 sont également rappelées certaines propriétés des AuNPs déterminées dans le chapitre 2 qui peuvent aider à interpréter les résultats.

Tableau III.1 - Coefficients de diffusion moyens obtenus pour les différentes AuNPs 14 jours après l'injection et rappel de certaines propriétés déterminées dans le chapitre 2

NPs	Potentiel zêta (mV)	R _g (nm) déterminé en SANS	Agrégation observée en SANS	D / D _{Au-PMAA(7,4)}
Au-PMAA(7,4)	-19,4 ± 21,3	7,4 ± 0,4	Oui	1,00 ± 0,05
Au-PMAA(10,6-A)	-37,9 ± 10,0	8,5 ± 0,3	Non	0,64 ± 0,02
Au-PMAA(10,6-B)	-44,5 ± 6,6	8,5 ± 0,4	Non	0,37 ± 0,09
Au-PMAA(18,6)	-23,0 ± 10,5	11,5 ± 0,2	Non	0,17 ± 0,01
Au-PDMAEMA	9,5 ± 4,4	/	Oui	Coefficient trop faible pour être estimé
Au-P(DMAEMA-MAA)	-33,6 ± 8,3	/	Oui	0,68 ± 0,02
Au-P(HEMA-MAA)	-31,5 ± 9,0	13,0 ± 0,6	Non	0,50 ± 0,06
Au-P(MAnBu-MAA)	-17,7 ± 10,6	11,5 ± 0,3	Non	Coefficient trop faible pour être estimé
Au-P(PEGMA-MAA)	-22,3 ± 12,9	3,7 ± 0,3	Oui	0,41 ± 0,08
Au-PMAA-BSA	/	6,0 ± 0,2	Non	Coefficient trop faible pour être estimé

1. Variation de la longueur de la couronne PMAA

En comparant les coefficients de diffusion obtenus, on peut tout d'abord noter une différence de comportement pour les deux lots de Au-PMAA(10,6). Cette variabilité est difficile à expliquer puisque leurs caractéristiques déterminées dans le chapitre 2 (§ III.B et C) semblaient identiques. Cela pourrait provenir de la quantité de polymère libre, mesurée par ATG (résultats non présentés), qui est légèrement plus faible dans le cas des Au-PMAA(10,6-B), ou bien de leur potentiel zêta un peu plus négatif (Tableau III.1).

Malgré cette différence, une tendance nette de diminution du coefficient de diffusion est observée lorsque la masse molaire des ligands augmente. Un facteur 6 est ainsi obtenu entre les Au-PMAA(7,4) et les Au-PMAA(18,6). Cela s'explique certainement par l'augmentation de la taille des NPs, comme le montrent les rayons de giration obtenus en SANS (Tableau III.1).

2. Variation de la nature de la couronne

La comparaison des autres types de couronnes polymères permet de mettre en lumière un autre paramètre important : la charge des NPs. En effet, les Au-PDMAEMA, chargées positivement à pH neutre, ne diffusent pas, tandis que les Au-PMAA, chargées négativement, présentent des coefficients de diffusion assez élevés. Puisque le Matrigel® possède une charge globalement négative, il était attendu que les NPs cationiques soient maintenues quasi-immobiles par des interactions électrostatiques attractives. Les modélisations réalisées par Hansing *et al.* confirment ces résultats expérimentaux : ils obtiennent des coefficients de diffusion bien plus faibles dans le cas d'interactions électrostatiques attractives que répulsives.⁴⁰

Concernant les différents copolymères étudiés, on remarque des évolutions diverses selon la nature du monomère ajouté au MAA. Les Au-P(DMAEMA-MAA), Au-P(PEGMA-MAA) et Au-P(HEMA-MAA) présentent par exemple des coefficients de diffusion relativement élevés et proches de ceux obtenus pour les Au-PMAA, tandis que les Au-P(MAnBu-MAA) ne diffusent pas du tout.

- Pour les Au-P(DMAEMA-MAA), ce résultat indique qu'une faible proportion de charges positives n'entrave pas la diffusion de manière notable.
- La petite taille des Au-P(PEGMA-MAA) obtenue en SANS permettait de s'attendre à une bonne diffusion. Le coefficient de diffusion mesuré reste cependant inférieur à celui des plus petites Au-PMAA. Les tests étant ici réalisés dans le DPBS, tamponné à pH neutre, le PMAA doit être en grande partie protoné, ce qui devrait limiter la complexation avec le PEG évoquée dans le chapitre 2 (§ III.C).⁷⁵ Ainsi, la taille des Au-P(PEGMA-MAA) mesurée en SANS dans l'eau est probablement inférieure à leur taille effective dans ce test de diffusion. Il est en outre possible que la nature branchée du ligand induise une perte de flexibilité, ce qui pourrait avoir comme conséquence d'entraver la diffusion des NPs, comme l'a montré l'équipe de Jain.⁴⁴
- Le comportement des Au-P(HEMA-MAA) est plus inattendu, car elles possèdent le plus grand rayon de giration. La diminution de la proportion de charges négatives sur les ligands (50% d'unités monomères HEMA non chargées) pourrait expliquer cette bonne diffusion, puisqu'il a été montré que les NPs neutres diffusent plus rapidement que les NPs chargées.⁴⁰⁻⁴³
- Pour les Au-P(MAnBu-MAA), leur rayon de giration relativement élevé ne suffit pas à expliquer leur absence totale de diffusion, d'autant que la proportion de charges négatives est là aussi réduite par rapport aux Au-PMAA. Leur principale différence étant le caractère hydrophobe marqué du monomère MAnBu, des interactions hydrophobes avec l'élastine pourraient être à l'origine de ce comportement. L'élastine, qui comporte des segments fortement hydrophobes (domaines contenant 80% d'acides aminés apolaires), est en effet un composant majoritaire de la MEC.⁷⁶

De manière générale, si on compare à la littérature les valeurs obtenues pour les coefficients de diffusion de nos NPs dans la MEC, les ordres de grandeur sont identiques pour des objets similaires :

- Entre $3 \cdot 10^{-9}$ et $2 \cdot 10^{-8}$ cm²/sec, selon la concentration de la matrice de collagène, pour la diffusion de NPs magnétiques recouvertes d'un copolymère poly(acide acrylique-oxyde d'éthylène) adsorbé en surface et de diamètre hydrodynamique moyen total 20 nm.⁷⁷
- $1,6 \cdot 10^{-8}$ cm²/sec pour des AuNPs de 50 nm de diamètre recouvertes de PEG-thiols dans une matrice de collagène.⁶²

Il faut souligner que ces valeurs de la littérature ont été obtenues dans des matrices de collagène, qui ne rendent pas bien compte des effets électrostatiques, et qu'elles pourraient être diminuées dans un

modèle plus représentatif de la MEC comme le Matrigel. La plupart de nos NPs semblent donc présenter de bonnes caractéristiques de diffusion dans la MEC.

3. Impact des protéines greffées

Les Au-PMAA-BSA semblent elles aussi incapables de diffuser dans le Matrigel[®]. Le critère de taille ne peut ici expliquer ce comportement, puisque leur rayon de giration est inférieur à celui des Au-PMAA. Aucune agrégation n'avait en outre été observée en SANS. Toutefois, puisque le greffage a pu s'effectuer en plusieurs points sur la protéine et les chaînes polymères, figeant ainsi la structure, on peut là aussi faire l'hypothèse d'une perte de flexibilité de la couronne polymère. Pour déterminer le possible impact de cette propriété, il serait intéressant par la suite de caractériser la flexibilité des chaînes greffées, comme l'ont récemment fait Zhang *et al.* par des méthodes de RMN.⁷⁸

On peut également supposer que la BSA interagit avec la matrice via ses domaines hydrophobes ou ceux chargés positivement, même si sa charge globale est négative à pH neutre (point isoélectrique autour de 4,7-4,9⁷⁹). Pour évaluer si cette incapacité à diffuser est spécifique de la BSA, il faudrait réaliser le test avec d'autres NPs greffées par des biomolécules. Une généralisation de ce comportement serait en effet tout à fait problématique pour les perspectives de ciblage spécifique via des anticorps, peptides ou autres biomolécules.

Cette étude a permis de mettre en valeur un fort impact de la nature de la couronne polymère sur la capacité des NPs à diffuser dans un modèle de la MEC. A partir de la comparaison des comportements de notre gamme de Au-polyméthacrylates, nous avons ainsi pu identifier plusieurs critères importants : la taille des NPs, leur charge, mais aussi leur balance hydrophile/hydrophobe. En particulier, une charge globalement positive ou la présence de segments hydrophobes semblent empêcher toute diffusion. Une diffusion limitée peut cependant être utile dans le cas où on rechercherait une concentration importante et localisée de NPs par injection pour induire un effet prononcé ou de long terme. La possibilité de moduler les propriétés de diffusion à partir de la couronne polymère greffée est donc un avantage pour adapter au mieux le type de NP à l'application envisagée. La connaissance des coefficients de diffusion des NPs peut également permettre d'optimiser les protocoles de traitement, par exemple pour que la séance d'irradiation soit prévue suffisamment longtemps après une injection intratumorale de NPs radiosensibilisantes, afin qu'elles aient eu le temps de se répartir dans la tumeur.

Pour poursuivre l'étude, la méthodologie développée ici pourrait être testée avec d'autres milieux que le DPBS, afin de mieux modéliser les caractéristiques du fluide interstitiel. Il faudrait aussi l'appliquer à différentes concentrations de Matrigel, voire différentes compositions de la MEC, en ajoutant par

exemple du collagène supplémentaire. L'objectif serait d'approcher au mieux les propriétés mécaniques des tumeurs, dont la MEC est plus rigide que celle des tissus sains.³⁴ Le modèle de MEC pourrait également être complexifié en ajoutant des cellules dans la matrice, afin de prendre en compte les interactions des NPs avec celles-ci, d'autant que la densité cellulaire est élevée dans les tumeurs.⁸⁰ A la manière des études réalisées sur des sphéroïdes,^{42,81} ou sur des structures cellulaires multi-couches,⁸² cela permettrait en outre d'obtenir une modélisation plus exacte de l'organisation tridimensionnelle des cellules par rapport aux monocouches habituellement utilisées dans les tests *in vitro*, tout en conservant une géométrie linéaire plus facile à analyser. L'ajout de cellules permettrait également de prendre en compte les effets que les NPs peuvent avoir sur les taux de dégradation de la MEC par les cellules, effets récemment mis en évidence par Mulens-Arias *et al* dans le cas de AuNPs de différentes tailles.⁸³ Cependant, ce type d'étude ne fournirait plus d'information sur le coefficient de diffusion des NPs à proprement parler, puisqu'il faudrait considérer dans leur progression leur possible internalisation dans les cellules, phénomène que nous allons maintenant étudier.

III. CAPTATION ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES NPs

Au cours de leur migration dans la tumeur, les NPs vont pouvoir entrer en contact avec les cellules tumorales, et parfois être internalisées par ces dernières. Dans le cas des NPs à visée anticancéreuse, on cherche souvent à maximiser ce phénomène de captation cellulaire, car leur effet thérapeutique nécessite généralement d'être à l'intérieur des cellules. En radiosensibilisation par exemple, la portée de certains mécanismes est limitée (production d'électrons Auger qui ont une portée maximale de l'ordre de la centaine de nm^{84,85}), et il a été montré que l'efficacité de la radiosensibilisation dépend du nombre de NPs présentes dans la cellule.^{86,87}

Dans le cadre de notre projet, l'objectif était de caractériser l'internalisation dans son intégralité, pour une meilleure compréhension du phénomène : cinétique de captation, impact de la couronne polymère, localisation et état des NPs internalisées, et élimination. Ces différents aspects vont être abordés successivement dans les paragraphes qui suivent.

A. QUELLE EST LA CINÉTIQUE D'INTERNALISATION ?

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les NPs pouvaient pénétrer dans les cellules, et si oui à quelle vitesse. Pour cela, la technique de l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) a été utilisée, car elle permet de mesurer la concentration en or présente dans les échantillons cellulaires. C'est une méthode couramment utilisée pour les tests d'internalisation.⁸⁸⁻⁹² Elle possède l'avantage d'être très sensible, avec une limite de détection de 1 pg/mL pour l'or.⁹³

Les échantillons cellulaires sont obtenus par exposition de cellules murines aux NPs Au-PMAA(10,6-A) pendant une durée comprise entre 1 et 24 heures. La concentration en NPs dans le milieu de culture est de 200 $\mu\text{g/mL}$, soit une concentration en or de 22 $\mu\text{g/mL}$. Au terme de l'incubation, la solution contenant les NPs est aspirée et trois lavages sont effectués (deux avec du DMEM supplémenté et un avec du DPBS). Le but est de conserver uniquement les NPs internalisées dans les cellules ou fortement adsorbées sur les membranes, les lavages devant permettre d'éliminer les NPs faiblement adsorbées sur les membranes cellulaires. Les cellules sont ensuite décollées de la surface de culture et mélangées à de l'eau régale, qui assure ici une double fonction : digérer les cellules et dissoudre les AuNPs. La solution obtenue est alors diluée dans une solution d'acide chlorhydrique 2%, et sa concentration en or est mesurée en ICP-MS. On peut alors remonter au nombre de NPs présentes dans l'échantillon, en utilisant les tailles des cœurs d'or obtenues dans le chapitre 2 (§ III.B.) Chaque condition testée est réalisée en triplicata. L'ensemble du protocole est décrit en Annexe A.

La lignée cellulaire utilisée ici (B16F10), ainsi que dans l'ensemble des tests d'internalisation, est un mélanome murin. Les mélanomes sont connus pour leur radiorésistance,⁹⁴ et cette lignée a souvent été utilisée dans les études de radiosensibilisation.⁹⁵⁻⁹⁷ Elle a donc été choisie dans la perspective d'effectuer dans un deuxième temps les tests de radiosensibilisation (chapitre 4).

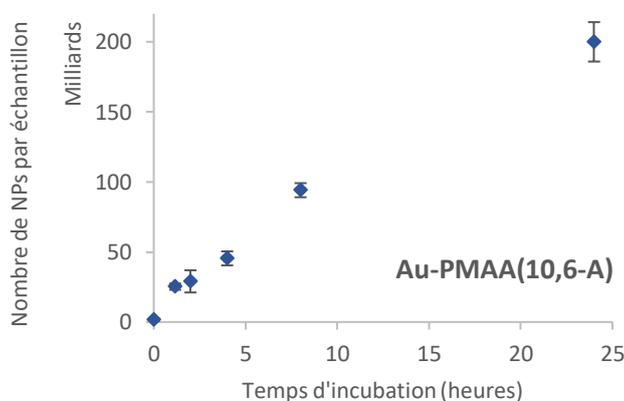


Figure III.7 - Cinétique d'internalisation des Au-PMAA(10,6-A) dans les cellules B16F10 pour une exposition à une concentration en or de 22 $\mu\text{g/mL}$

Les résultats obtenus (Figure III.7) montrent qu'on détecte dans les cellules une quantité d'or significative dès la première heure d'exposition, ce qui démontre un processus assez rapide. L'évolution semble ensuite linéaire sur la période étudiée, ce qui a déjà été observé pour d'autres types de AuNPs.⁹⁸ Il faut toutefois souligner qu'on considère le nombre de NPs par échantillon, et non par cellule, et que le nombre de cellules augmente vraisemblablement entre les points correspondant à 1h d'incubation et ceux correspondant à 24h, du fait de la division cellulaire. Les cellules nouvellement formées durant l'incubation peuvent donc elles aussi internaliser les AuNPs encore présentes dans le

milieu, et ainsi fausser l'évolution observée. La littérature rapporte en effet un temps de doublement de la population compris entre 15 et 20h pour la lignée B16F10.^{99,100} Mais il est également possible que la présence des AuNPs induise un ralentissement de la division cellulaire,^{101,102} même si des résultats parfois opposés ont été montrés à ce sujet,⁹² selon le type de AuNPs utilisées. Evaluer le nombre de NPs par cellule, dans le but d'obtenir une évolution fiable au cours du temps, est donc complexe dans cette expérience. Toutefois, il est raisonnable de supposer que l'évolution observée sur la Figure III.7 n'est pas uniquement due à la variation du nombre de cellules, car on observe un facteur x10 en 24 heures. Le nombre de NPs internalisées par cellule augmente donc avec le temps. Ayant montré que les Au-PMAA pouvaient être internalisées, il s'agit désormais d'étudier l'impact des propriétés de la couronne polymère sur cette captation à un temps donné.

B. QUEL EST L'IMPACT DE LA COURONNE POLYMÈRE SUR L'INTERNALISATION ?

Les propriétés physico-chimiques de surface jouent un rôle clé dans la capacité des NPs à être internalisées. En particulier, la charge des ligands semble avoir un fort impact.¹⁰³ Il a ainsi été montré que les ligands polymères neutres et biocompatibles, comme le PEG, minimisent les interactions avec les cellules, et limitent donc l'internalisation.^{104,105} Toutefois, l'ajout de fonctionnalités en bout de chaîne du PEG peut suffire à modifier ce phénomène.¹⁰⁶ Au contraire, les NPs dont la surface est cationique ont une forte affinité pour la membrane cellulaire, chargée négativement, et pénètrent facilement à travers celle-ci.¹⁰³ Certaines études ont cependant montré que cette pénétration se fait via la création de pores dans la membrane, qui peuvent ensuite mener à la mort cellulaire.^{107,108} Concernant les NPs présentant une charge de surface négative, la littérature a mis en évidence qu'elles ont aussi la capacité à pénétrer dans les cellules,^{109,110} même si les interactions électrostatiques ne sont *a priori* pas favorables. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'interaction se fait au niveau des quelques rares sites cationiques de la membrane.¹⁰⁹ On pourrait également supposer que des cations divalents puissent jouer le rôle d'intermédiaires entre la membrane et les NPs anioniques. Les degrés d'internalisation sont toutefois bien moindres que pour les NPs cationiques.^{103,110}

La charge n'est cependant pas le seul facteur qui détermine la capacité de captation d'une NP. Une étude a par exemple obtenu des résultats allant à l'encontre de toutes ces tendances, puisque les auteurs n'observent pas de différence significative d'internalisation entre les petites molécules cationiques, anioniques et neutres qu'ils utilisent comme ligands.¹¹¹ Dans le cas de structures comportant des polymères, plus proches de nos objets, il a été montré que la balance hydrophobe/hydrophile ou la flexibilité des chaînes peuvent également jouer un rôle. Des différences d'internalisation ont par exemple été observées entre divers ligands polymères comportant une charge positive, en fonction de la structure chimique plus ou moins hydrophobe présente en bout de

chaîne.¹¹² Enfin, il a été montré avec des NPs polymères (dendrimères et micelles) que la rigidité de la particule favorise l'internalisation.^{113,114}

Au-delà des propriétés des ligands, leur organisation à la surface des NPs semble elle aussi impacter les interactions avec les cellules. L'équipe de Stellacci a ainsi comparé deux AuNPs amphiphiles identiques en taille, forme et composition, mais dont l'organisation des deux ligands alcanethiols diffère (l'un comportant une fonction chargée négativement, l'autre non) : leur répartition à la surface des NPs est aléatoire dans un cas, et structurée en stries dans l'autre (Figure III.8).¹¹⁵ L'étude montre que les NPs dont la surface est ordonnée sont bien mieux internalisées, mais également que les processus de passage de la membrane ne sont pas les mêmes. Les NPs non-structurées semblent être internalisées par endocytose et sont donc confinées dans des endosomes, tandis que les structurées atteignent le cytoplasme. Une étude plus récente va également dans ce sens, en affirmant que c'est l'organisation des ligands à la surface qui régit l'internalisation des NPs, plus que leur charge ou leurs propriétés chimiques.⁹⁸ Ces résultats ont été confirmés par simulation et semblent être expliqués par l'existence d'une barrière énergétique plus faible dans le cas des NPs striées.¹¹⁶

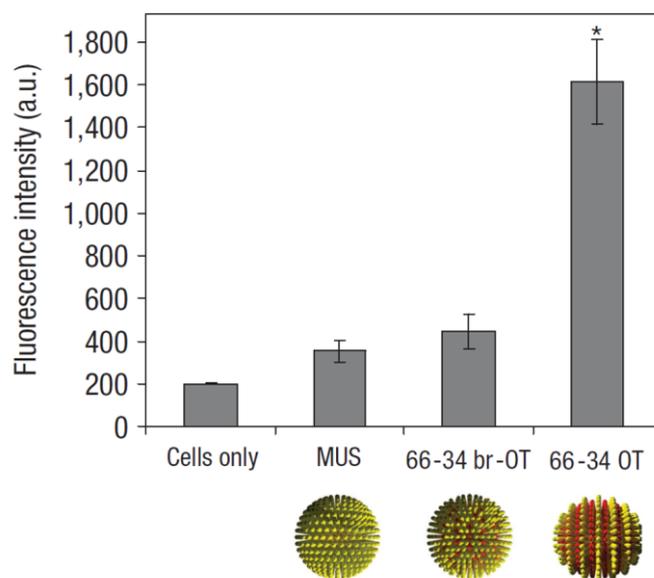


Figure III.8 - Intensité de fluorescence d'échantillons cellulaires représentative de la quantité de NPs fluorescentes internalisées dans les cellules. Quatre conditions sont présentées : contrôle sans NPs (cells only), NPs recouvertes de ligands hydrophobiques (MUS), ou d'un mélange de ligands anioniques et hydrophobiques répartis aléatoirement (66-34 br-OT), ou encore du même mélange structuré en stries (66-34 OT)¹¹⁵

Une des limites relevées dans la plupart des études mentionnées est l'utilisation de ligands dont les structures diffèrent grandement, certains auteurs allant jusqu'à comparer des petites molécules (citrate) avec des polymères (poly(alcool vinylique)).¹⁰³ Dans ces conditions, il semble donc difficile d'isoler l'effet d'un seul paramètre, comme la charge, et d'établir des conclusions générales sur les propriétés des NPs qui favorisent l'internalisation. Avec une gamme de ligands polymères de structures chimiques proches (polyméthacrylates) mais présentant des propriétés différentes (charge,

hydrophobicité, longueur de chaîne), nous possédons donc un avantage indéniable pour pouvoir déterminer l'impact des différentes caractéristiques physico-chimiques sur la captation cellulaire.

Nous comparerons dans un premier temps des couronnes PMAA de longueurs différentes, puis analyserons l'influence de la nature de la couronne polyméthacrylate. Les NPs greffées de protéines seront étudiées dans une troisième et dernière partie.

1. Variation de la longueur de la couronne PMAA

Dans la littérature, peu d'auteurs se sont intéressés à l'influence de la longueur des chaînes polymères greffées en surface des AuNPs. Seul le cas du PEG a déjà été étudié.^{105,117} Les résultats ont montré que la captation cellulaire est grandement diminuée quand la longueur du PEG augmente. Cependant, il semble difficile de généraliser cette observation à d'autres polymères, car le PEG possède la spécificité de diminuer les interactions avec les cellules, comme cela a été dit précédemment.

Les tests d'internalisation ont ici été effectués pour les quatre échantillons Au-PMAA possédant des chaînes polymères de masses molaires différentes : 7,4 kg/mol, 10,6 kg/mol (2 échantillons) et 18,6 kg/mol. L'objectif est de déterminer si la longueur de la couronne peut avoir un impact sur l'internalisation cellulaire des NPs. La comparaison des deux synthèses réalisées avec les chaînes de 10,6 kg/mol permettra également d'évaluer la reproductibilité des résultats d'un lot à l'autre.

Les tests ont été réalisés selon le protocole décrit pour l'étude cinétique, avec une durée d'exposition fixée à 18 heures et 4 concentrations en or testées : 0,5 / 2,2 / 5,5 / 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (voir protocole détaillé en Annexe A). Nous avons choisi de travailler à concentration en or constante, plutôt qu'à concentration en NPs constante, puisque, dans une perspective de radiosensibilisation, c'est la quantité d'or qui importe. Les %_wAu obtenus en ICP-MS dans le chapitre 2 (§ III.B) ont donc été utilisés pour calculer les concentrations de NPs équivalentes pour chaque lot. Chaque condition a été réalisée en triplicata, et les résultats correspondent en outre à la moyenne de deux expériences distinctes. Le nombre de cellules a été estimé à 1 million par échantillon, ce qui a permis de remonter à la masse d'or par cellule à partir des concentrations obtenues pour chaque échantillon. Comme les durées d'exposition sont ici identiques pour toutes les conditions, on fait l'approximation que le nombre de cellules est équivalent d'un échantillon à l'autre.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la Figure III.9. Ils sont présentés de deux manières différentes : évolution de la masse d'or par cellule en fonction de la concentration (Figure III.9a), et évolution du nombre de NPs par cellule (Figure III.9b), qui prend donc en compte l'effet de la variation de taille du cœur. Il faut souligner que ces valeurs sont des estimations, elles font donc abstraction des différences qui existent d'une expérience à l'autre, même si une attention particulière a été portée à la reproductibilité des conditions de culture. D'autre part, ces valeurs sont des moyennes, qui ne

prennent en compte ni la polydispersité des NPs, ni l'hétérogénéité d'internalisation existant au sein d'une population de cellules.¹¹⁸

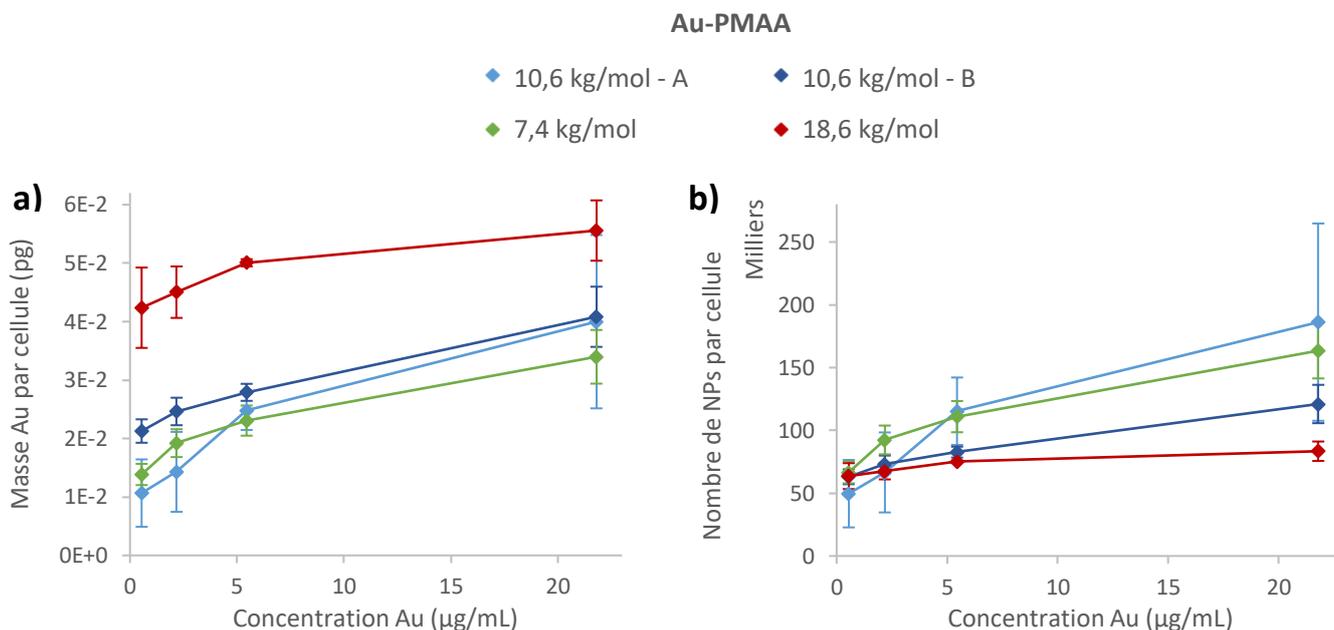


Figure III.9 - Internalisation des NPs Au-PMAA dans les cellules B16F10 après une exposition de 18 heures : évolution en fonction de la concentration en or
(a) Masse d'or par cellule et (b) Nombre de NPs par cellule

Pour les quatre Au-PMAA étudiées, on note que la quantité d'or internalisée augmente avec la concentration d'or dans le milieu de culture (Figure III.9a). Elle semble cependant tendre vers une valeur limite, qui traduit une possible saturation des cellules. Dans le cas des Au-PMAA(18,6), la saturation paraît presque atteinte à 5,5 µg/mL. Cela pourrait indiquer une différence de mécanisme d'internalisation. De manière générale, une saturation avec l'augmentation de la concentration peut traduire la saturation des récepteurs dans le cas d'un transport actif.

Pour les quatre échantillons, le nombre de NPs internalisées par cellule semble considérable (plusieurs dizaines à centaines de milliers). Cette observation est cependant à nuancer, car la très petite taille des NPs implique un pourcentage massique d'or finalement assez faible par rapport à la cellule entière : entre $3 \cdot 10^{-4}$ et $2 \cdot 10^{-3}$ % si l'on estime la masse d'une cellule à $3,5 \cdot 10^{-9}$ g.¹¹⁹ D'autre part, ces valeurs sont en-dessous de celles que l'on peut trouver dans la littérature pour des AuNPs possédant des cœurs d'or de tailles similaires (quelques millions de NPs par cellule).⁸⁹⁻⁹¹ Toutefois, la comparaison est à considérer avec précaution puisque les conditions d'internalisation sont différentes (lignée cellulaire, concentration en or, temps d'exposition, etc.), de même que les ligands utilisés (PEG fonctionnalisé par une amine dans un cas, petite molécule dans les deux autres).

Les deux Au-PMAA(10,6) présentent des résultats très similaires, et ce pour les deux grandeurs analysées. Cela montre une bonne reproductibilité des résultats pour des lots de synthèse différents d'un même type de NPs. On remarque également que l'internalisation des Au-PMAA(7,4), dont les chaînes sont un peu plus petites, s'effectue dans les mêmes proportions. Concernant les Au-PMAA(18,6), la masse d'or internalisée est quasiment doublée par rapport aux autres NPs (Figure III.9a). Cette différence semble toutefois provenir de la variation de taille du cœur d'or, et non de la longueur de la chaîne polymère, puisque le nombre de NPs internalisées est quant à lui identique pour les quatre échantillons (Figure III.9b). Nous avons en effet montré dans le chapitre 2 (§ III.B) que les Au-PMAA(18,6) possèdent un cœur d'or légèrement plus grand que les autres Au-PMAA.

Les résultats obtenus ici montrent donc que la longueur de la couronne PMAA ne semble pas induire de différence majeure dans la capacité d'internalisation des NPs. Il serait toutefois intéressant de prolonger l'étude en étendant la gamme de masses molaires. Une polymérisation du PMAA par ATRP en *bulk* pourrait par exemple permettre d'atteindre des masses molaires plus élevées. Concernant le mécanisme, la constance du nombre de Au-PMAA internalisées pourrait indiquer l'existence d'un nombre limité de sites d'interactions sur la membrane cellulaire, comme cela avait été suggéré par Wilhelm *et al.*¹⁰⁹ On pourrait poursuivre l'étude en utilisant cette fois des NPs possédant des chaînes PMAA de tailles identiques mais un cœur d'or dont la taille varie, pour déterminer si le nombre de NPs reste constant.

2. Variation de la nature de la couronne

L'impact de la nature de la couronne polymère a ensuite été étudié en testant les AuNPs formées avec les différents ligands polyméthacrylates, à la fois homopolymères et copolymères, selon les mêmes modalités que pour les Au-PMAA. Là encore, nous avons choisi de travailler à concentration en or constante.

Les résultats obtenus pour les Au-P(HEMA-MAA), Au-P(MAnBu-MAA) et Au-P(PEGMA-MAA) sont présentés sur la Figure III.10 avec ceux des Au-PMAA(10,6-B), pour comparaison.

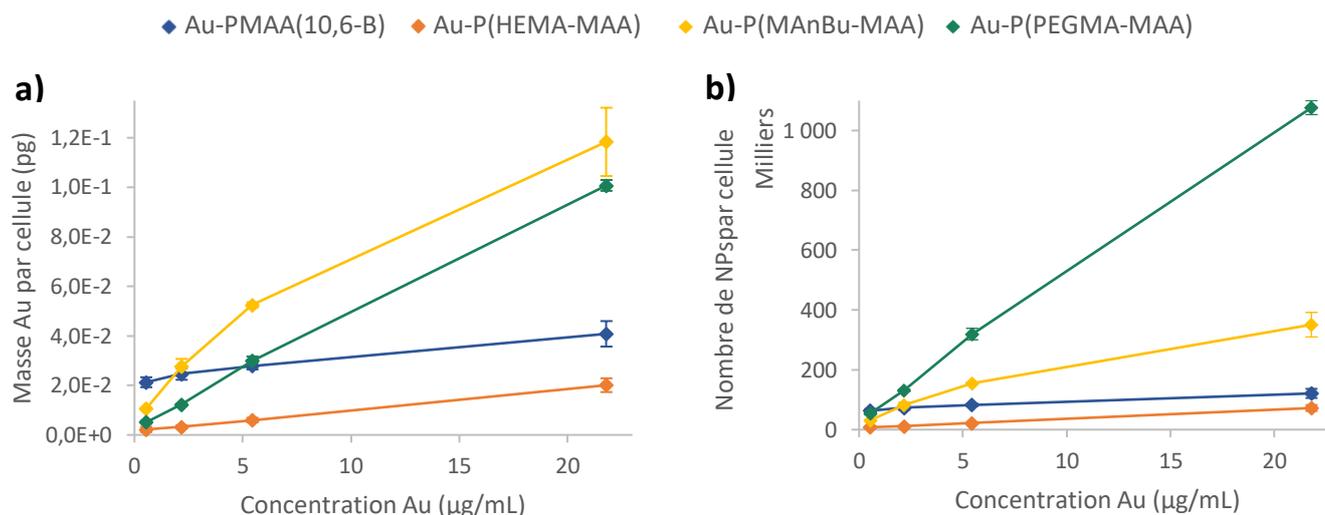


Figure III.10 - Internalisation des NPs Au-P(HEMA-MAA), Au-P(MANBu-MAA), Au-P(PEGMA-MAA) et Au-P(MAA(10,6-B)) dans les cellules B16F10 après une exposition de 18 heures : évolution en fonction de la concentration en or (a) Masse d'or par cellule et (b) Nombre de NPs par cellule

Les Au-P(PEGMA-MAA) et Au-P(MANBu-MAA) favorisent nettement la quantité d'or internalisée par rapport aux Au-P(MAA) (Figure III.10a). À l'inverse, une quantité moindre de Au-P(HEMA-MAA) semble captée par les cellules. Les quantités d'or internalisées maximales, ainsi que leur éventuel comportement de saturation, sont résumés pour l'ensemble des NPs dans le Tableau III.2. Les NPs y sont classées selon la quantité d'or internalisée.

Ces trois copolymères sont tous caractérisés par l'addition d'unités monomères non chargées par rapport au PMAA, mais la diversité de leurs comportements montre que c'est la nature chimique du ligand, plus que la proportion de charges négatives, qui impacte l'internalisation. Concernant les Au-P(MANBu-MAA), l'hydrophobicité du MANBu pourrait favoriser l'interaction avec la membrane cellulaire,¹²⁰ qui présente un fort caractère hydrophobe de par les lipides qui la composent. Pour les Au-P(PEGMA-MAA), on aurait pu s'attendre à ce que la présence de PEG diminue l'internalisation, comme cela a été montré dans la littérature pour des ligands PEG.^{104,105} Le comportement inverse observé pourrait s'expliquer en partie par une rigidité supérieure des Au-P(PEGMA-MAA), déjà évoquée précédemment, qui favoriserait l'internalisation. Il est également possible que certaines chaînes PEG soient encore complexées sur le squelette méthacrylate, même si le pH neutre défavorise *a priori* le phénomène. Comme évoqué dans le chapitre 2 (§ III.C), cette complexation implique la présence de segments hydrophobes sur les chaînes polymères. Cela pourrait donc expliquer une internalisation favorisée, de manière similaire aux Au-P(MANBu-MAA). Cette hypothèse mériterait toutefois d'être vérifiée par une étude plus poussée du phénomène, notamment via une étude SANS en fonction du pH.

Tableau III.2 - Résumé des propriétés d'internalisation des AuNPs dans les cellules B16F10

NPs	Quantité d'or maximale internalisée par cellule (fg)	Phénomène de saturation
Au-PDMAEMA	Toxique	
Au-P(DMAEMA-MAA)	427 ± 28	Oui
Au-P(MAnBu-MAA)	118 ± 14	Oui
Au-P(PEGMA-MAA)	101 ± 2	Non
Au-PMAA(18,6)	56 ± 5	Très rapide
Au-PMAA(10,6-B)	41 ± 5	Rapide
Au-PMAA(10,6-A)	40 ± 15	Rapide
Au-PMAA(7,4)	34 ± 5	Rapide
Au-P(HEMA-MAA)	20 ± 3	Non

Les résultats obtenus pour les Au-PDMAEMA et Au-P(DMAEMA-MAA) sont présentés sur la Figure III.11 avec ceux des Au-PMAA(10,6-B), pour comparaison. Seul le point à 0,5 µg/mL est indiqué pour les Au-PDMAEMA, car une forte toxicité a été observée pour les concentrations plus élevées, et les cellules mortes ont été emportées lors des lavages.

On remarque que le nombre de NPs par cellule est beaucoup plus élevé pour le PDMAEMA que pour le PMAA, malgré la possible toxicité existant déjà pour une concentration d'or de 0,5 µg/mL, qui pourrait avoir diminué le nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Il semblerait donc que le PDMAEMA favorise grandement la captation cellulaire par rapport au PMAA. L'étude de Rinkenauer *et al.* concernant l'internalisation de NPs polymères méthacrylates avait déjà montré que les copolymères contenant du PDMAEMA sont mieux internalisés que ceux contenant du PMAA.¹²¹ D'autre part, le PDMAEMA est connu pour sa capacité à pénétrer à travers les membranes cellulaires, puisqu'il est utilisé pour la transfection de gènes.¹²² Les résultats obtenus ici sont donc cohérents avec la littérature.

Cependant, la toxicité observée ici, qui sera confirmée dans la partie suivante (§ IV.C), empêche toute possibilité d'application des Au-PDMAEMA. Afin d'exploiter la capacité d'internalisation de ce polymère, tout en atténuant sa toxicité, nous avons donc étudié un copolymère P(DMAEMA-MAA) contenant 10% de PDMAEMA.

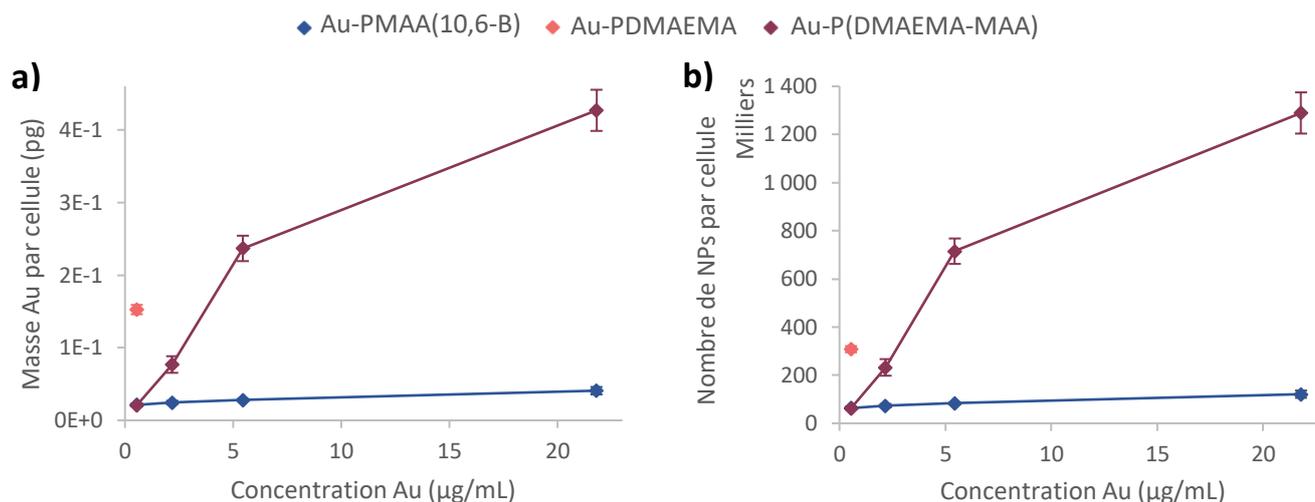


Figure III.11 - Internalisation des NPs Au-PDMAEMA, Au-P(DMAEMA-MAA) et Au-PMAA(10,6-B) dans les cellules B16F10 après une exposition de 18 heures : évolution en fonction de la concentration en or (a) Masse d'or par cellule et (b) Nombre de NPs par cellule

La copolymérisation du PDMAEMA avec d'autres monomères est une méthode qui a déjà été utilisée dans la littérature pour réduire sa toxicité dans le cadre de la délivrance de gènes.¹²³⁻¹²⁶ Une diminution de l'efficacité de transfection est souvent observée en contrepartie. Nous avons ici obtenu des résultats similaires, puisqu'aucune toxicité n'a été observée lors des tests d'internalisation des Au-P(DMAEMA-MAA), mais une quantité moindre de NPs semble être internalisée pour une concentration de 0,5 µg/mL d'or (Figure III.11b). Cependant, cette quantité reste bien supérieure à celle des Au-PMAA (facteur x10 à 22 µg/mL), ce qui montre que l'ajout d'une faible proportion de DMAEMA peut suffire à améliorer significativement les propriétés d'internalisation des NPs. Cela peut s'expliquer par des effets électrostatiques entre les unités monomères DMAEMA chargées positivement et la membrane cellulaire chargée négativement.

3. Impact des protéines greffées

Le greffage de protéines en surface des NPs est souvent utilisé dans une perspective d'amélioration de l'internalisation et de ciblage spécifique des cellules tumorales.^{127,128} La transferrine permet par exemple de générer une captation accrue des nanoparticules dans les tumeurs, puisque l'expression des récepteurs de transferrine peut être jusqu'à 100 fois plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules saines.¹²⁸ Cependant, la capacité de ciblage de la protéine peut être perdue à cause de l'adsorption, en surface des NPs, de protéines du sérum qui peuvent masquer les éventuelles fonctionnalisations, comme l'ont montré Salvati *et al.* pour des nanoparticules conjuguées à des molécules de transferrine.¹²⁹

Dans ce projet, la BSA a été greffée dans un premier temps, afin de tester le protocole sur une protéine modèle (chapitre 2 § IV.B). L'impact de cette protéine sur l'internalisation des AuNPs a été évalué selon la même procédure que pour les NPs non greffées. Les résultats sont présentés sur la Figure III.12.

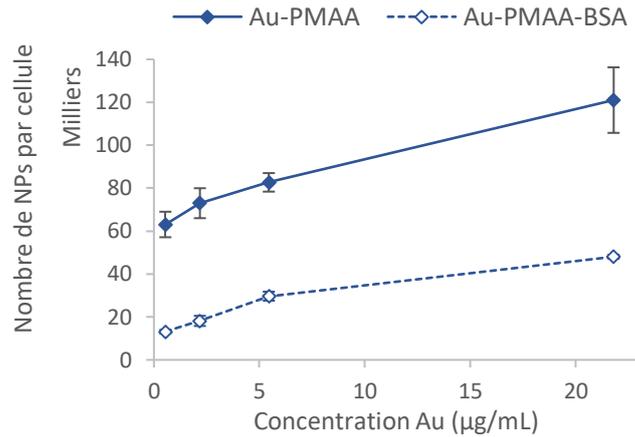


Figure III.12 - Internalisation des NPs Au-PMAA et Au-PMAA-BSA dans les cellules B16F10 après une exposition de 18 heures : évolution du nombre de NPs par cellule en fonction de la concentration en or

Dans la littérature, des effets contradictoires ont été observés quand de la BSA était fixée à la surface des NPs : soit une augmentation de la captation,¹³⁰ soit une diminution.^{109,131} Dans notre cas, les résultats obtenus montrent que la présence de la BSA greffée semble diminuer l'internalisation des Au-PMAA.

La deuxième protéine que nous avons greffée sur nos NPs est la lactoferrine (Lf). Comme cela a été détaillé dans le chapitre 2, ce greffage a pour but de cibler les tumeurs du cerveau. C'est pourquoi l'internalisation des Au-PMAA-Lf a été observée sur une autre lignée cellulaire, les U87MG, qui sont des cellules de glioblastome humain. Les Au-PMAA et Au-PMAA-BSA ont également été testées pour comparaison. Le protocole utilisé est en tous points identique à celui décrit sur la lignée B16F10. L'ensemble des résultats est présenté sur la Figure III.13.

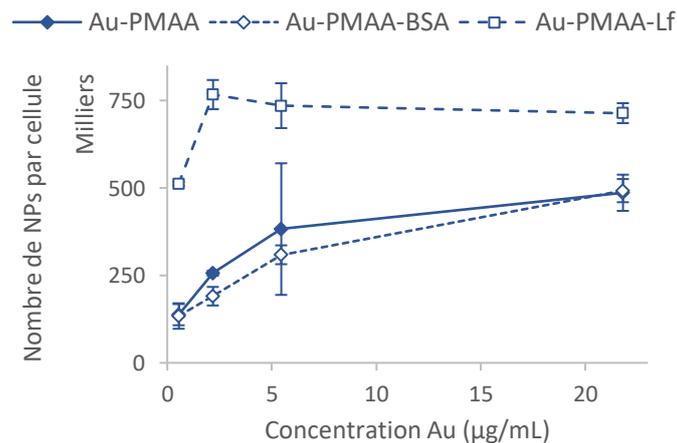


Figure III.13 - Internalisation des NPs Au-PMAA, Au-PMAA-BSA et Au-PMAA-Lf dans les cellules U87MG après une exposition de 18 heures : évolution du nombre de NPs par cellule en fonction de la concentration en or

Les Au-PMAA et Au-PMAA-BSA sont ici internalisés dans des proportions identiques. Mais la présence de la lactoferrine greffée augmente considérablement la captation cellulaire, et ce pour toutes les concentrations testées. Cela semble montrer que les protéines greffées sont capables d'interagir avec

les récepteurs spécifiques qui sont situés sur les cellules humaines U87MG, même si la lactoferrine utilisée ici est d'origine bovine. Cela permet donc de favoriser l'internalisation des NPs, qui s'effectue *a priori* via un mécanisme d'endocytose par récepteurs interposés.¹³² Contrairement à l'article de Salvati *et al*,¹²⁹ mentionné au début de ce chapitre, la capacité de la protéine greffée à se lier aux récepteurs semble ainsi conservée en présence de sérum, malgré la couronne de protéines qui a probablement dû se former à la surface des NPs. Il est en outre intéressant de noter que la quantité de Au-PMAA-Lf internalisées évolue peu lorsqu'on augmente leur concentration dans le milieu, ce qui pourrait traduire une saturation des récepteurs. Une faible concentration pourrait donc suffire à générer une captation importante.

C. OU SONT LOCALISÉES LES NPs ET DANS QUEL ÉTAT D'AGRÉGATION SE TROUVENT-ELLES ?

L'ICP-MS a permis de quantifier les NPs dans les cellules, mais aucune information n'a été obtenue quant à leur localisation intracellulaire, le mécanisme d'internalisation mis en jeu, ou encore l'état d'agrégation des NPs à l'intérieur de la cellule. L'observation directe des NPs internalisées permet d'étudier ces différents aspects, et plusieurs techniques de microscopie peuvent être exploitées dans ce but.

La microscopie optique en champ sombre, dite *dark-field* en anglais, repose sur l'observation de la lumière diffusée par l'échantillon, en occultant le faisceau transmis. Les NPs ayant des propriétés plasmoniques sont bien visibles avec cette technique, puisqu'elles diffusent fortement les longueurs d'onde correspondant à leur résonance plasmon.^{133,134} La technique a donc été utilisée à de nombreuses reprises pour visualiser l'internalisation de NPs dans des cellules ou des tissus.^{106,135-137} Cependant, en-dessous d'une taille critique de 10-20 nm, les NPs ne sont pas observables car l'intensité de la lumière diffusée est trop faible, ce qui limite l'utilisation de cette technique pour les petites NPs.^{138,139}

Les NPs internalisées peuvent également être observées par microscopie de fluorescence.¹⁴⁰ Puisque nos AuNPs ne sont pas fluorescentes, et afin d'éviter le greffage d'un fluorophore sur celles-ci, ce n'est pas la technique que nous avons retenue.

La microscopie électronique en transmission (*Transmission Electron Microscopy* en anglais, ou TEM) permet, elle aussi, d'observer les NPs à l'intérieur des cellules. Elle est particulièrement adaptée dans le cas de NPs électroniquement denses, comme les AuNPs, car le contraste avec les structures cellulaires sera meilleur. Bien que les échantillons soient longs à préparer, cette technique a l'avantage de posséder une excellente résolution spatiale, ce qui permet d'observer de petites NPs.^{89,90,141,142} Une autre possibilité est d'utiliser le TEM en champ sombre, qui est l'équivalent, en microscopie

électronique, du microscope optique en champ sombre décrit plus haut. Avec cette technique, l'intensité du signal dépend du carré du numéro atomique, ce qui donne un très bon contraste pour l'or ($Z=79$), meilleur qu'en TEM conventionnel.¹⁴³ Cette technique a ainsi été utilisée pour analyser l'internalisation cellulaire de AuNPs.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Par rapport aux autres techniques, le TEM a l'avantage de pouvoir être couplé à une analyse élémentaire, par analyse dispersive en énergie (EDX) ou spectroscopie des pertes d'énergie (EELS).

D'autres techniques moins répandues ont également été utilisées pour observer la localisation de NPs dans les cellules. On peut citer entre autres la photoluminescence par absorption de deux photons,²² la microscopie électronique à balayage,^{146,147} ou encore l'ICP-MS couplée à de l'ablation laser.¹⁴⁸

Dans ce projet, puisque nos AuNPs sont de très petite taille, nous avons choisi d'utiliser la technique du TEM, que nous avons déjà exploitée pour caractériser la taille et la forme des cœurs d'or de nos NPs dans le chapitre 2 (§ III.B). Nous avons complété ces observations par l'utilisation de la microscopie électronique à balayage (MEB), qui sera décrite dans une première partie.

1. Observation en microscopie électronique à balayage

Le MEB est utilisé ici dans le but d'observer la surface des cellules, dont une infime partie seulement sera visible sur les coupes cellulaires en TEM. En effet, malgré les lavages effectués sur les cellules, les signaux d'or obtenus en ICP-MS peuvent provenir de NPs en forte interaction avec la membrane, mais non internalisées. L'observation de cellules entières en MEB devrait permettre de conclure sur cette question. L'ensemble des observations a été effectué avec l'aide de Sylvie Marguet et Mathieu Pinault (LEDNA, NIMBE).

Des observations préliminaires ont d'abord été réalisées sur un dépôt de solution de NPs effectué sur un wafer de silicium, afin de s'assurer que les cœurs d'or sont visibles. Les observations ont été effectuées en analysant les électrons rétrodiffusés, car ils permettent une meilleure sensibilité au contraste chimique, ce qui est intéressant dans notre cas (or ($Z=79$) sur une surface de silicium ($Z=14$)). Le détail des paramètres utilisés est disponible en Annexe A. L'image présentée en Figure III.14 confirme que les NPs sont détectables avec cette technique d'imagerie, elles apparaissent comme des points lumineux sur un fond sombre.

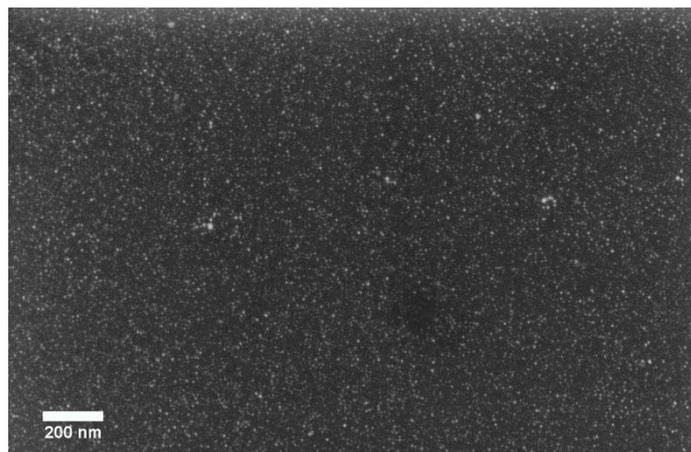


Figure III.14 - Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un dépôt de Au-PMAA sur un wafer de silicium

Afin d'observer les cellules en MEB, nous les avons cultivées directement sur un wafer de silicium, qui a l'avantage d'être conducteur et donc de participer à l'évacuation des charges lors de l'observation. Il a donc fallu s'assurer dans un premier temps que ces conditions de culture n'induisaient pas de toxicité chez les cellules utilisées. Pour cela, un test de cytotoxicité (test MTT, voir détails dans la partie IV de ce chapitre) a été réalisé pour comparer la viabilité de cellules cultivées sur un morceau de wafer pendant 3 jours avec la viabilité de cellules cultivées sur des surfaces en plastique traitées pour la culture. Les wafers ont été traités avec du sérum de veau fœtal avant l'ensemencement, afin de favoriser l'adhésion des cellules sur la surface. Le protocole détaillé est disponible en Annexe A. Les résultats du test sont présentés sur la Figure III.15. Ils montrent qu'aucune cytotoxicité n'est observée sur le wafer.

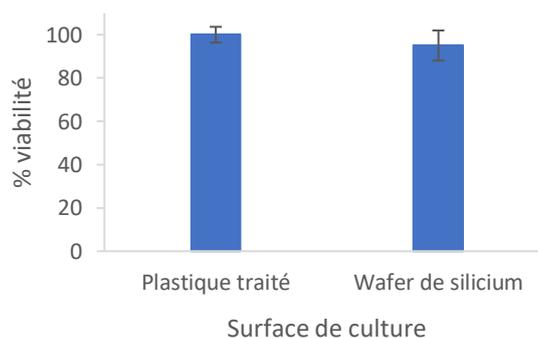
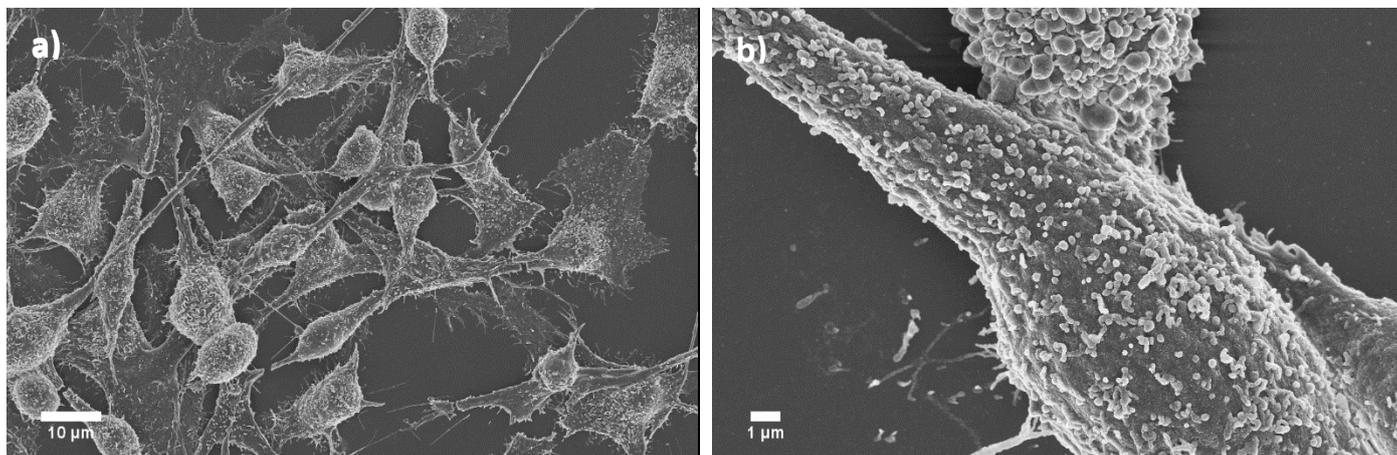


Figure III.15 - Cytotoxicité induite par la surface de culture (test MTT) chez les B16F10 : comparaison entre le wafer de silicium et le plastique traité pour la culture

Des morceaux de wafer ont donc été utilisés pour réaliser les deux échantillons cellulaires à observer en MEB. L'échantillon exposé aux NPs a été incubé pendant 18 heures avec une solution de Au-PMAA(10,6-A) préparée à une concentration de 22 µg/mL d'or dans le DMEM supplémenté, tandis que le contrôle a été mis en présence de DMEM supplémenté uniquement. Les conditions sont identiques à celles utilisées dans les expériences d'internalisation. Les échantillons ont ensuite été fixés avec du

glutaraldéhyde, déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, avant d'être séchés avec le solvant hexaméthylsilazane, qui empêche l'effondrement des structures cellulaires.¹⁴⁹ Le protocole est détaillé en Annexe A. Les échantillons ont été métallisés avec une fine couche de carbone avant observation, pour permettre l'évacuation des charges. Un échantillon des images obtenues est présenté sur la Figure III.16.

Contrôle



AuNPs

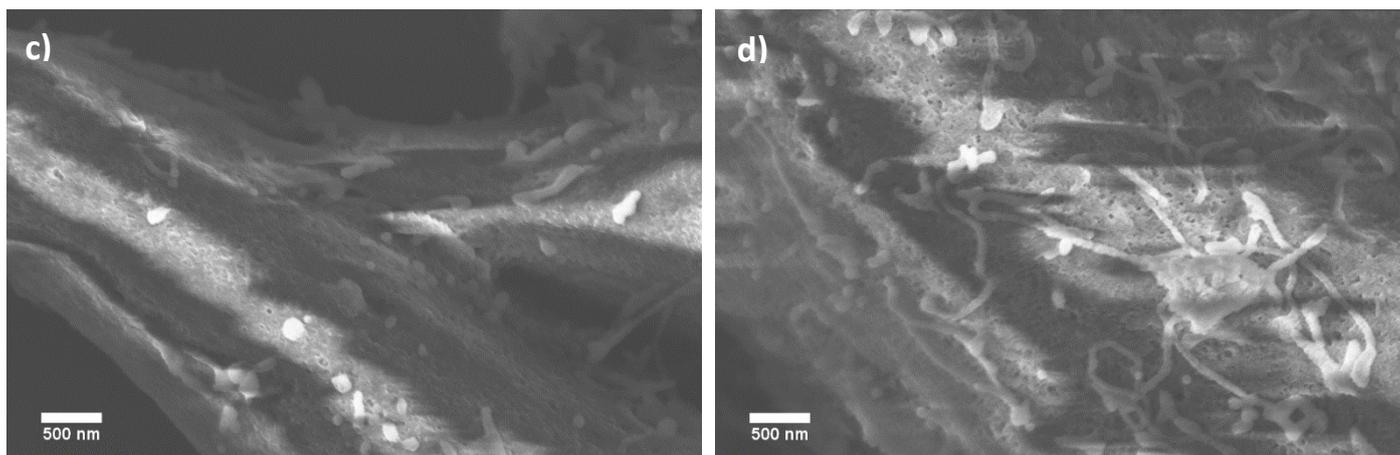


Figure III.16 - Images MEB en électrons rétrodiffusés de cellules B16F10 sur un wafer de silicium :
(a)(b) Cellules contrôles et (c)(d) Cellules exposées aux NPs

Avec le protocole utilisé, la structure des cellules est bien conservée (Figure III.16 a et b). Aucune NP n'a été repérée sur les cellules exposées (Figure III.16 c et d). Même si la présence de quelques NPs a pu être manquée (difficulté d'observation due à leur petite taille), ce résultat semble indiquer qu'une grande partie de l'or détecté en ICP-MS provient de NPs internalisées. En effet, avec les conditions de mesure choisies ici, la profondeur analysée par les électrons rétrodiffusés n'est que de 10 nm environ pour l'or.¹⁵⁰ Seules les NPs situées très proches de la surface des cellules sont donc observables. L'utilisation de la microscopie électronique en transmission a ensuite permis de déterminer leur localisation intracellulaire.

2. Observation en microscopie électronique en transmission

L'observation de cellules en TEM nécessite de préparer des coupes ultra-fines, afin de permettre aux électrons de traverser l'échantillon. Pour cela, les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde, déshydratées dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, incluses dans une résine époxy, avant d'être découpées avec un ultramicrotome. Divers contrastants peuvent être utilisés pour rendre les structures biologiques visibles, comme le tétr oxyde d'osmium, le citrate de plomb, ou encore l'acétate d'uranyle. Dans notre étude, plusieurs protocoles ont été utilisés (voir leur description détaillée en Annexe A), leurs spécificités seront décrites par la suite. Tous les tests en présence de NPs (hors contrôles) ont été effectués avec les Au-PMAA(10,6-A). Les cellules ont été exposées à une concentration en or de 22 µg/mL durant 18 heures, de manière à reproduire les conditions utilisées pour les tests d'internalisation. L'ensemble des protocoles a été mis au point et réalisé en collaboration avec les ingénieures de la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Cynthia Gillet et Claire Boulogne. Les observations en TEM ont été réalisées sur cette même plateforme.

Dans un premier temps, des observations ont été réalisées sur des cellules préparées sans osmium, mais avec de l'acétate d'uranyle. Un échantillon d'images représentatif des contrôles (sans NPs) et des échantillons avec NPs sont présentés sur la Figure III.17. Pour faciliter l'interprétation, la localisation du noyau (N) et du cytoplasme (C) est précisée sur les images.

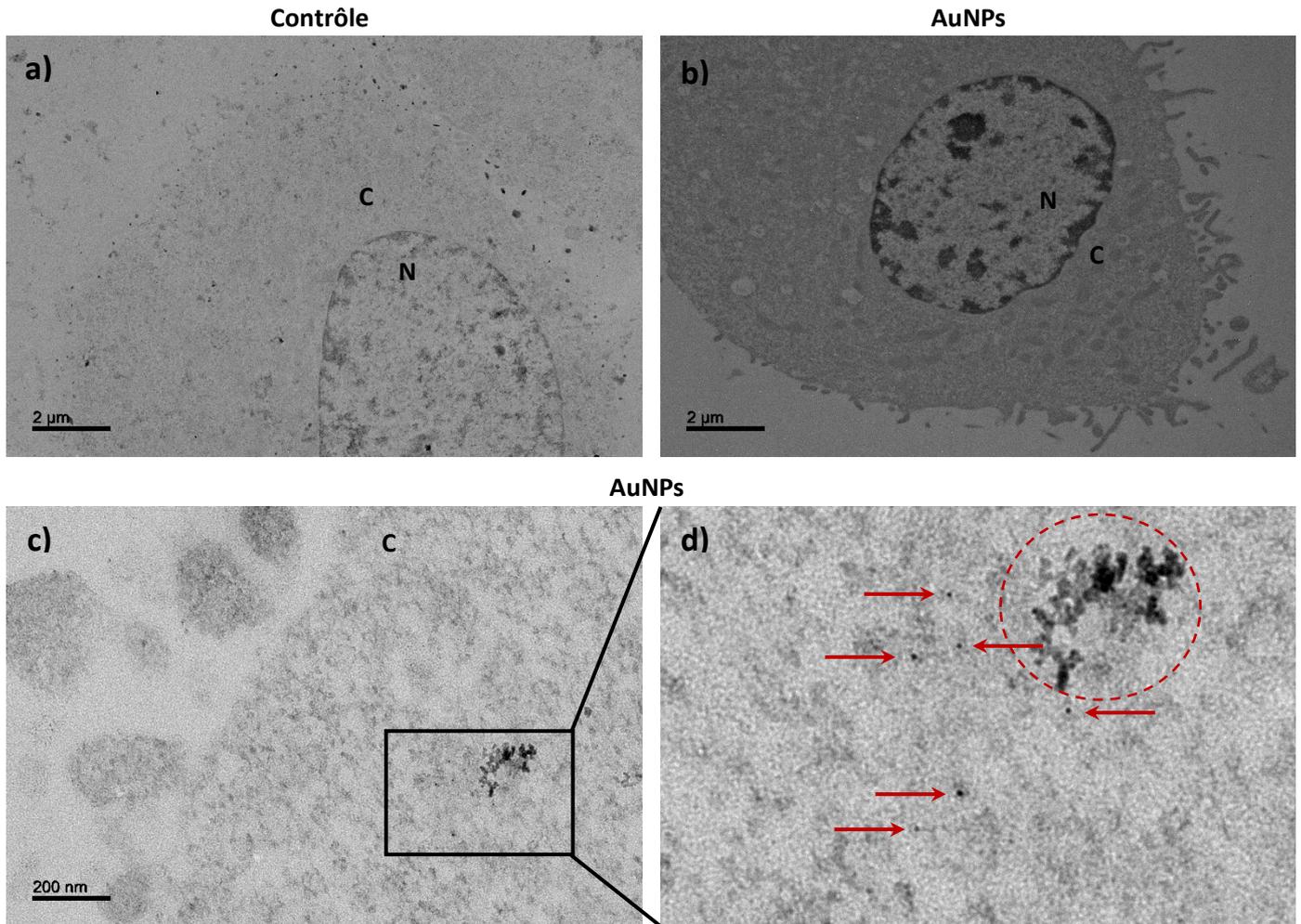


Figure III.17 - Images TEM de cellules B16F10
 (a) Sans exposition à des NPs (Contrôle) et (b)(c)(d) Après exposition à des Au-PMAA (AuNPs) (d = zoom d'une zone de c)

Les images obtenues mettent en évidence un manque de contraste, les compartiments et membranes cellulaires n'étant pas toujours bien visibles. Dans les échantillons exposés aux NPs, certaines images semblent mettre en évidence la présence de NPs dans le cytoplasme (flèches rouges sur la Figure III.17d). Leur observation est toutefois particulièrement difficile, compte tenu de leur petite taille. Peu de NPs ont ainsi été repérées. Des structures très contrastées, de tailles beaucoup plus importantes, ont également été observées, comme sur la Figure III.17d (cercle rouge). La résolution n'étant pas optimale, nous ne pouvons pas conclure sur la nature de ces structures, qui pourraient correspondre à des agrégats de NPs.

Afin d'améliorer les conditions d'observation, une deuxième série d'échantillons a été préparée. Cette fois, l'osmium a été utilisé, pour fixer et renforcer le contraste des structures lipidiques. En outre, certains échantillons ont été traités avec une solution d'amplification à l'argent (*silver enhancement*), qui a pour objectif d'accroître la taille des AuNPs en effectuant la réduction d'ions argent en métal directement sur les AuNPs, qui jouent le rôle de sites de nucléation.¹⁵¹ Ce procédé peut être utilisé sur

des cellules ou des tissus, après fixation, pour faciliter l'identification des AuNPs.¹⁵²⁻¹⁵⁴ L'amplification à l'argent a parfois été précédée d'un traitement avec de la saponine, qui permet de perméabiliser les membranes pour favoriser la pénétration de la solution. Parmi les différentes conditions testées (voir détails en Annexe A), nous avons finalement retenu celle obtenue par un traitement d'amplification à l'argent de 10 minutes, sans utilisation de saponine. Le risque que nous avons identifié avec cette dernière était en effet d'induire, dans les structures cellulaires perméabilisées, des déplacements de NPs post-fixation qui fausseraient les interprétations. Il faut également garder à l'esprit que l'argent peut amplifier des impuretés, et pas seulement les AuNPs.

Plusieurs structures nanométriques contrastées ont été observées dans les cellules exposées aux NPs. Un exemple est présenté sur la Figure III.18a. Afin de confirmer que les objets repérés sont bien des NPs, nous avons tout d'abord effectué des observations en champ sombre en TEM à balayage (*Scanning TEM* en anglais, ou STEM), ainsi que des analyses en EDX. Celles-ci ont été effectuées sur des zones, dans les cellules, où nous pensons avoir identifié des regroupements de NPs, et également sur des impuretés contrastées en-dehors de la cellule, potentiellement amplifiées à l'argent et pouvant ressembler à des NPs.

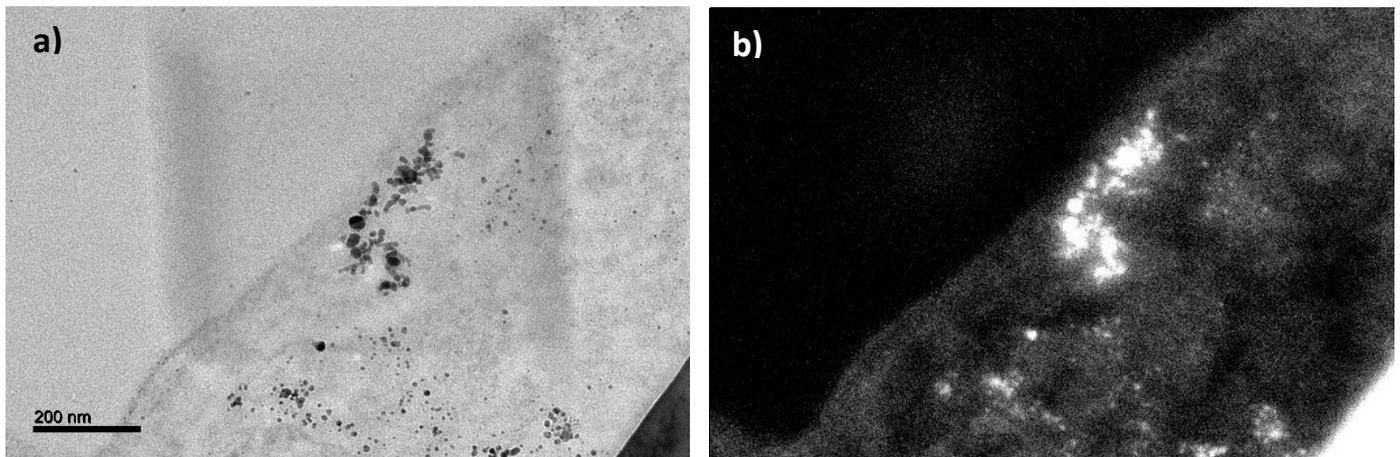


Figure III.18 - Comparaison des images obtenues en (a) TEM champ clair et (b) STEM champ sombre pour des cellules B16F10 après exposition à des Au-PMAA(10,6-A) pendant 18 heures et traitées avec du silver enhancement

Sur la Figure III.18, on peut comparer une image obtenue en champ clair en TEM classique avec la même zone observée en champ sombre en STEM. On voit que les particules sphériques, sombres sur l'image en champ clair, apparaissent très lumineuses en champ sombre et sont donc facilement identifiables, même si la résolution est moins bonne qu'en TEM classique dans notre cas (limitation liée à l'appareil utilisé). Comme dit précédemment, en champ sombre, l'intensité est liée au carré du numéro atomique. Le très fort contraste observé semble donc renforcer notre hypothèse selon laquelle ces particules sont bien nos AuNPs. Des analyses EDX ont ensuite été effectuées sur cette même zone. Le carré plus sombre visible sur la Figure III.18a provient d'ailleurs de l'impact du faisceau

durant l'analyse. Le spectre obtenu est présenté sur la Figure III.19, en comparaison avec celui provenant d'une zone comportant des impuretés. Le cuivre provient de la grille et le plomb d'un des agents de contraste utilisés (citrates de plomb). Sur le premier spectre, on peut remarquer un petit pic localisé au niveau de l'énergie correspondant aux rayons X de type $L\alpha$ caractéristiques de l'or (9,712 keV). Ce pic n'étant pas présent sur le spectre des impuretés, on peut donc conclure que les objets identifiés sont bien des AuNPs.

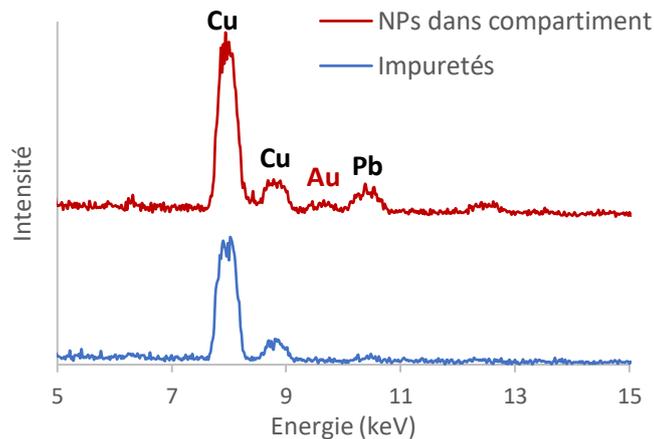


Figure III.19 - Analyses EDX pour confirmer la présence d'or : comparaison de la zone visible sur la Figure III.18 avec une zone comportant des impuretés

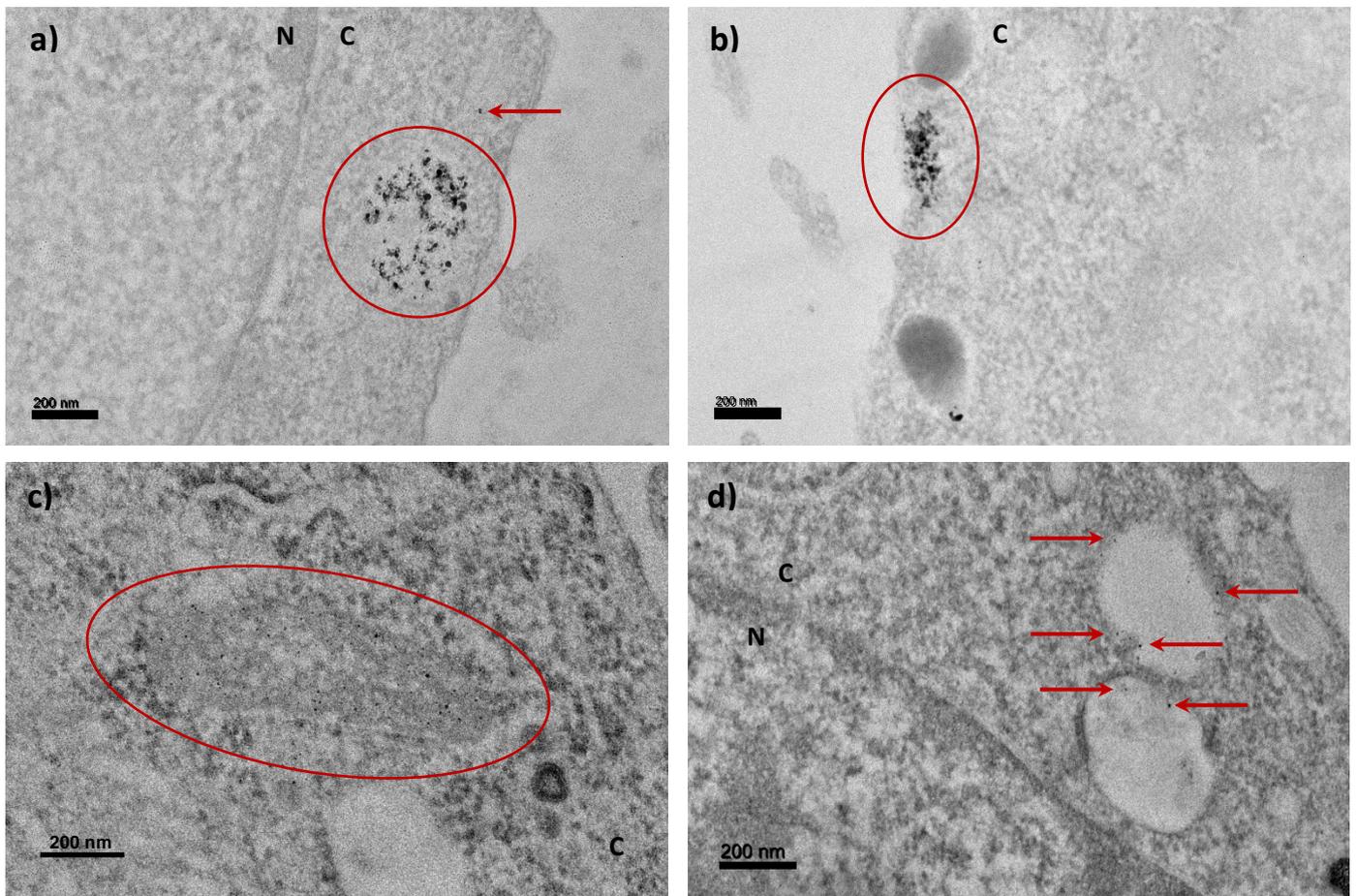
Après cette confirmation, nous avons pu étudier plus en détails la localisation des NPs. Un échantillon d'images représentatif des observations effectuées est visible sur la Figure III.20. Les images obtenues à partir du contrôle ne sont pas présentées ici, mais elles ne comportent aucune des structures indiquées en rouge sur la Figure III.20, qui correspondent aux zones où des NPs ont été identifiées.

Parmi les observations effectuées, les NPs ont été repérées sous plusieurs formes et dans différentes parties de la cellule :

- Beaucoup d'entre elles semblent regroupées, voire agrégées, dans le cytoplasme (Figure III.20 a et b), sans membrane apparente autour d'elles. L'agrégation est cependant à nuancer, puisqu'elle peut provenir d'une fusion des NPs due à l'amplification à l'argent. En effet, ces agrégats sont souvent positionnés près de la membrane cellulaire, et il est possible qu'ils correspondent à des NPs qui ont été beaucoup amplifiées, étant plus accessibles que celles se trouvant dans des compartiments ou plus à l'intérieur de la cellule. Quelques NPs isolées ont également été observées dans le cytoplasme (Figure III.20 a et f).
- D'autres NPs semblent se situer à l'intérieur de compartiments cellulaires. Certains ont été clairement identifiés, comme des mitochondries (Figure III.20c) et un autophagosome (Figure III.20g). Le type de structure visible sur la Figure III.20h semble quant à lui être un mélanosome, structure caractéristique des cellules produisant de la mélanine, comme c'est le cas ici (cellules

de mélanome murin).^{155,156} Il est cependant difficile de conclure sur la nature des vésicules peu denses aux électrons repérées à plusieurs reprises (Figure III.20 d, e, f). On peut supposer que ce sont des endosomes précoces, puisqu'un des mécanismes d'internalisation des NPs les plus courants est l'endocytose et que leur morphologie semble similaire à celle référencée dans la littérature.¹⁵⁷ Toutefois, leur double membrane caractéristique, issue de leur formation à partir de la membrane cellulaire, n'apparaît pas clairement sur les images.

- Plusieurs NPs isolées ont également été observées à l'intérieur du noyau (Figure III.20 e et f).
- Enfin, on peut noter qu'aucune NP ne semble être en simple interaction avec la membrane, sans être internalisée, ce qui confirme les résultats obtenus en MEB.



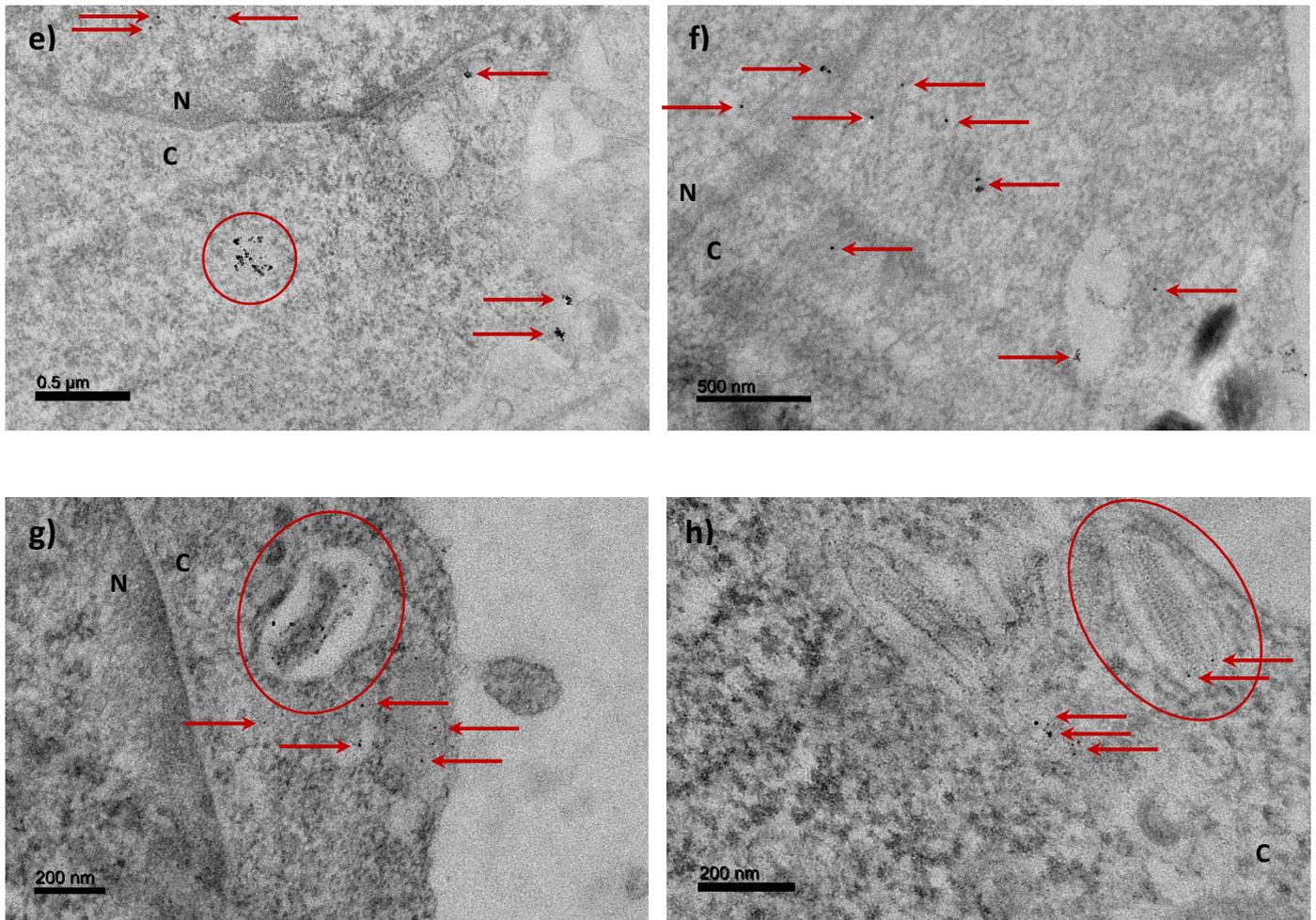


Figure III.20 - Images TEM de cellules B16F10 après exposition à des Au-PMAA(10,6-A) pendant 18 heures et amplifiées à l'argent

Si nos NPs pénètrent dans les cellules par la voie d'endocytose, il est logique d'en retrouver dans des vésicules, qui doivent *a priori* être des endosomes, ou bien des lysosomes, qui sont leur évolution et qui ont pour fonction d'assurer la digestion cellulaire.¹⁵⁸ Le fait que les NPs soient plusieurs dans un même compartiment peut également renforcer cette hypothèse d'endocytose, puisque plusieurs modèles ont montré que les petites NPs ($R < 20$ nm) ne peuvent être endocytées seules, mais uniquement à plusieurs.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

La présence de NPs dans le cytoplasme peut, elle, s'expliquer de deux manières : elles ont pu s'échapper des endosomes/lysosomes après internalisation par endocytose, ou bien elles ont pénétré dans la cellule par un autre mécanisme. L'évasion endosomale (*endosomal escape*) est un phénomène qui a déjà été observé et exploité dans de nombreuses études, en particulier dans le cadre de la délivrance de gènes.¹⁶² Plusieurs polymères ont ainsi été utilisés, impliquant différents mécanismes, parmi lesquels le *proton sponge effect* est le plus répandu (Figure III.21a). Il repose sur la capacité de certains polymères à agir comme des tampons dans une gamme de pH entre 5 et 7. Lors de l'acidification des endosomes (pH de 5,5 à 6,3 pour les endosomes, et d'environ 4,7 pour les

lysosomes¹⁶³), les polymères se protonent et tamponnent le milieu, empêchant la diminution du pH. Pour tenter d'atteindre le pH caractéristique de l'endosome/du lysosome, une quantité importante d'ions H^+ continue alors d'être pompée dans le compartiment, nécessitant également un afflux d'ions chlorure pour maintenir un équilibre des charges. La forte pression osmotique ainsi générée finit par provoquer la formation de pores dans la membrane, voire la rupture complète de l'endosome ou du lysosome, ce qui permet de libérer les NPs dans le cytoplasme.^{163,164} La plupart des polymères utilisés dans ce but contiennent des amines tertiaires, comme le PDMAEMA par exemple.^{165,166} Certains polymères comprenant des acides carboxyliques, dont le PMAA, ont également montré des propriétés de *proton sponge effect*.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ En plus de ce mécanisme, certains auteurs avancent que l'hydrophobicité de ces polymères à pH acide (protonation des groupes carboxylates) pourrait entraîner des interactions avec les lipides et induire une déstabilisation de la membrane conduisant également à une évasion endosomale (Figure III.21b).¹⁶⁷ Ainsi, il est possible que certaines des Au-PMAA utilisées se soient échappées des endosomes par l'un ou l'autre de ces mécanismes.

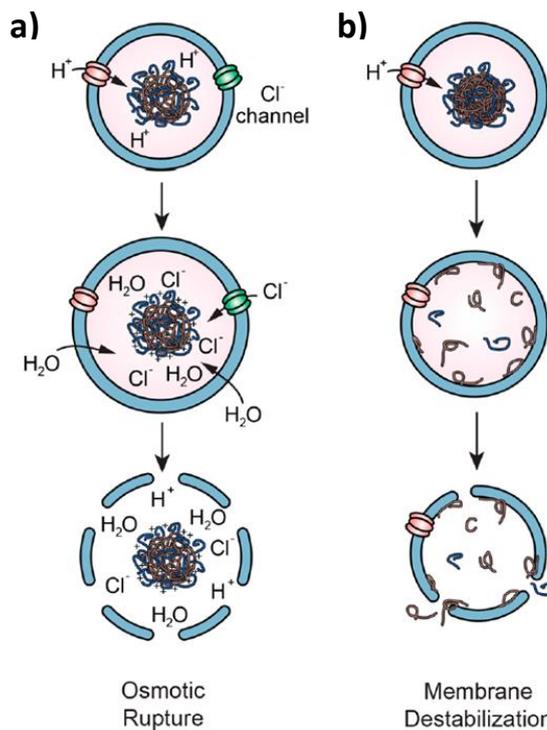


Figure III.21 - Schématisation de deux mécanismes d'évasion endosomale : (a) *proton sponge effect* et (b) déstabilisation de la membrane¹⁷⁰

Une autre possibilité est que nos NPs aient été internalisées par la cellule via un autre mécanisme que l'endocytose, comme la diffusion passive. Leur présence dans divers compartiments cellulaires, ainsi que dans le cytoplasme et le noyau, va dans ce sens puisqu'elle démontre une absence de spécificité. Lund *et al.* avaient ainsi prouvé, en testant différents inhibiteurs d'endocytose, que la captation de leurs petites nanoparticules d'or (2 nm de diamètre) ne se faisait pas par cette voie.⁹⁸ Ils ont émis

l'hypothèse qu'elles pénétraient par diffusion via des pores dans la membrane cellulaire, soit déjà existants, soit qu'elles créaient elles-mêmes. Cependant, les auteurs avaient également observé, après 18 heures d'incubation, une accumulation de NPs agrégées dans des structures ressemblant à des endosomes. Ils expliquent cette évolution par un échange, dans le cytoplasme, de ligands thiols en surface des AuNPs : si les thiols (glutathion et cystéine) naturellement présents dans les cellules déplacent la couronne existante, leur petite taille pourrait ne plus suffire à stabiliser les NPs, et on observerait alors une agrégation. Cet échange intracellulaire de ligands thiols avait déjà été montré auparavant, en particulier avec le glutathion.¹⁷¹ Dans notre cas, il pourrait être favorisé par le fait que nos ligands sont des macromolécules, comme l'ont démontré Smith *et al.*¹⁷² Les auteurs suggèrent que cet échange facilité peut s'expliquer par un greffage moins dense de la couronne, par rapport à des petites molécules. Cependant, il a également été mis en évidence que les ligands anioniques résistaient bien mieux aux échanges avec les thiols intracellulaires que les cationiques, grâce aux répulsions électrostatiques.¹⁷³ On peut donc supposer que le PMAA utilisé ici ne subit pas trop d'échanges. Au-delà des hypothèses soulevées de pénétration par diffusion et d'échange de ligands, l'étude de Lund *et al.* souligne l'importance de la durée d'incubation avec les NPs, et semble montrer une évolution dans le temps des processus d'internalisation, et surtout de l'état intracellulaire des NPs.

Concernant la pénétration de NPs non agrégées dans le noyau, nos observations concordent avec d'autres études réalisées sur de petites NPs.^{89-91,142} Elles pourraient, là encore, avoir pénétré dans le noyau par simple diffusion passive, puisque les pores nucléaires laissent passer les molécules de taille inférieure à 9 nm.¹⁷⁴ En effet, même si nos NPs ont un diamètre plus grand, le cœur d'or est lui beaucoup plus petit, et on peut supposer que la flexibilité des chaînes polymères leur permet tout de même de passer à travers les pores nucléaires.

La localisation de nos NPs dans les mitochondries est plus surprenante. Seulement quelques études ont rapporté de telles observations pour des AuNPs, en particulier dans le cas de NPs cationiques.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Il a été montré que la membrane externe des mitochondries est perméable à des AuNPs de 3 nm de diamètre, mais pas de 6 nm.¹⁷⁸ Même en considérant une certaine flexibilité des chaînes polymères, il semble donc peu probable que nos NPs aient pu simplement diffuser à travers cette membrane. La charge négative de la membrane des mitochondries ne peut pas non plus expliquer l'interaction avec nos NPs anioniques.^{175,176} Schaublin *et al.* ont cependant observé un stress mitochondrial après exposition à des AuNPs chargées négativement.¹¹¹ Ils expliquent cet effet par une déstabilisation du potentiel de la membrane des mitochondries, mais ne s'intéressent pas à la pénétration des NPs dans celles-ci. Des tests supplémentaires seront donc nécessaires pour comprendre ce phénomène d'internalisation mitochondriale des Au-PMAA.

Grâce à ces observations en TEM, nous avons pu identifier les différentes localisations intracellulaires des NPs. Leur interprétation laisse entrevoir deux mécanismes possibles d'internalisation, par diffusion passive ou par endocytose. Les images obtenues ont également mis en évidence un phénomène d'agrégation des NPs dans certaines zones du cytoplasme. Cette agrégation reste toutefois sujette à caution puisque l'amplification à l'argent a pu induire la fusion des coeurs des NPs.

Les analyses menées en MEB et TEM ont permis d'identifier les différentes localisations intracellulaires des Au-PMAA, et d'émettre des hypothèses concernant les mécanismes d'internalisation et le devenir des NPs à l'intérieur de la cellule. Des tests complémentaires devront être réalisés par la suite afin de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Concernant l'internalisation par endocytose, on pourrait par exemple réaliser des tests de captation à 4°C. A cette température, aucune conversion ATP/ADP (adénosine triphosphate/adénosine diphosphate) n'est possible. Puisque c'est cette réaction qui fournit l'énergie dans les cellules, les mécanismes nécessitant de l'énergie, comme l'endocytose, ne peuvent avoir lieu. Ce test à 4°C permettrait donc de déterminer si les NPs pénètrent ou non par endocytose.^{179,180} Un traitement avec de l'azoture de sodium permet lui aussi d'empêcher l'endocytose.¹⁷⁹ On peut également envisager l'utilisation d'inhibiteurs de certains types spécifiques d'endocytose, pour obtenir des informations plus précises.^{98,106,181} D'autre part, l'évasion endosomale pourrait être confirmée par des tests mettant en jeu la calcéine. C'est un fluorophore qui présente une fluorescence très localisée et peu intense lorsqu'il est situé dans les endosomes, mais dont la libération dans le cytoplasme entraîne une fluorescence intense et diffuse. Comme la calcéine ne peut pas passer à travers les membranes, la caractérisation de son signal de fluorescence intracellulaire permet de déterminer si les NPs induisent ou non une évasion endosomale.^{165,182} Il serait également intéressant d'effectuer une analyse des noyaux en ICP-MS, afin de quantifier le pourcentage de NPs ayant pénétré dans le noyau.^{89,90} Enfin, l'étude de l'ensemble de ces mécanismes à différents temps d'exposition pourrait apporter des informations sur l'évolution des processus d'internalisation.

Outre la réalisation de nouveaux tests pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu dans le cas du PMAA, il faudra également caractériser l'internalisation des autres types de NPs, afin de déterminer comment la couronne polymère impacte les mécanismes d'internalisation. Les NPs comportant du PDMAEMA, de par leur caractère cationique, risquent par exemple d'affecter l'intégrité de la membrane cellulaire, pouvant y créer des pores ou induire son amincissement.^{107,108} Elles pourraient également affecter la membrane des mitochondries. L'association du PDMAEMA avec le PMAA pourrait cependant contrer ces effets délétères sur les membranes, puisqu'il a été montré que les NPs zwitterioniques pouvaient pénétrer la membrane cellulaire sans y induire de défaut.¹⁸³ Les NPs

comprenant des monomères MAnBu plus hydrophobes pourraient quant à elles agir à la manière de *cell-penetrating peptides*, dont le caractère amphiphile semble expliquer leur pénétration directe à travers la membrane cellulaire, sans dommage sur cette dernière.¹¹⁵ La capacité des NPs à s'échapper des endosomes constituera également un critère d'évaluation important, ainsi que leur propension à pénétrer dans le noyau.

D. LES NPs PEUVENT-ELLES ÊTRE ÉLIMINÉES ?

Si l'on suit le cheminement des NPs à l'intérieur des cellules, on arrive nécessairement à la question de leur élimination. Deux voies sont envisageables : soit les NPs finissent par être évacuées de la cellule, par un processus d'exocytose par exemple, soit elles restent dans la cellule, subissant éventuellement des dégradations. L'évacuation des NPs par les cellules reste un phénomène peu étudié, et les résultats obtenus par les rares articles traitant ce sujet sont très disparates. Chithrani *et al.* ont par exemple montré en 2007 une exocytose des AuNPs internalisées extrêmement rapide et efficace : 40% des NPs internalisées sont évacuées en 1 heure dans le cas de AuNPs de 14 nm de diamètre.¹⁷⁹ Une autre étude réalisée sur plusieurs lignées cellulaires met en évidence un taux d'exocytose d'au moins 20% des AuNPs internalisées, après seulement 3 heures post-incubation.¹⁸¹ Le taux atteint même 40% chez certaines lignées. Des observations similaires ont également été rapportées pour des *quantum dots* (temps de demi-vie de 22 minutes avec plus de 30% des NPs évacuées).¹⁸⁴ Au contraire, Verma *et al.* n'ont noté aucune élimination de AuNPs après 6 heures post-incubation.¹¹⁵ L'origine de ces différences pourrait provenir du mécanisme d'internalisation et de la localisation intracellulaire des NPs : la dernière étude concerne des AuNPs ayant la propriété de pénétrer par simple diffusion à travers la membrane cellulaire, tandis que les autres ont montré que la captation de leurs NPs s'effectuait par endocytose. Il semble alors raisonnable de penser que les NPs endocytées peuvent être directement évacuées par exocytose, sans jamais quitter l'intérieur du compartiment endosomique, tandis que celles localisées dans le cytoplasme ne peuvent être éliminées par cette voie. Enfin, il est important de noter que la division cellulaire constitue un autre moyen pour la cellule de réduire le nombre de NPs internalisées, puisqu'elles se retrouvent réparties entre les deux cellules filles.¹⁸⁵

Pour étudier l'élimination de nos Au-PMAA(10,6-A), nous avons réalisé une internalisation dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment : incubation avec une solution contenant 22 µg/mL d'or pendant 18 heures. Après cette exposition, le milieu contenant les NPs a été aspiré, les cellules ont été lavées 3 fois au DPBS, puis replacées dans un nouveau milieu de culture sans NPs. Les différents échantillons ont alors été trypsinés après 1, 2, 4, 6 ou 8 heures post-lavage, puis analysés en ICP-MS. Chaque condition a été réalisée en triplicata. Les résultats sont présentés sur la Figure III.22.

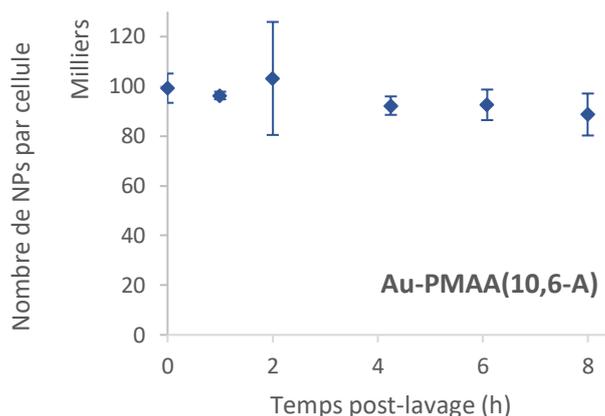


Figure III.22 - Cinétique d'élimination des Au-PMAA(10,6-A) dans les cellules B16F10 après une exposition de 18 heures à une concentration en or de 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La cinétique obtenue montre que les NPs internalisées sont maintenues dans la cellule, puisque 90% de la quantité d'or est encore présente après 8 heures post-lavage. Il semblerait que la quantité diminue au cours du temps, mais cette évolution n'est pas significative sur la durée observée. Une fois internalisées, les Au-PMAA ne sont donc pas expulsées rapidement des cellules. D'après l'analyse de la littérature effectuée plus haut, ce résultat tend à montrer que nos NPs ne sont pas bloquées dans les endosomes : soit elles sont internalisées par d'autres mécanismes, soit elles ont la capacité à s'échapper des endosomes/lysosomes.

Là encore, il faudra analyser et comparer les résultats pour les différentes couronnes polymères. Leur impact sur l'internalisation se retrouvera très certainement sur l'élimination, puisque les deux phénomènes semblent liés. Dans une perspective d'utilisation en radiothérapie, la question de la dégradation sera également primordiale, puisque le format même de nanoparticule joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de radiosensibilisation (réactivité de la surface d'or et des molécules d'eau à l'interface,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ émission accrue d'électrons secondaires par rapport au matériau massif¹⁸⁹). La dégradation intracellulaire des NPs pourrait ainsi être étudiée par la suite, afin de déterminer si certains polymères assurent une meilleure protection que d'autres. De manière plus générale, l'élimination des NPs est un sujet important dans le cadre d'applications médicales. Leur persistance prolongée à l'intérieur des cellules pourrait induire de la toxicité sur le long terme, et c'est donc un aspect qu'il sera nécessaire d'étudier dans la suite du projet.

L'ensemble de cette étude portant sur l'internalisation de nos NPs a permis d'aborder un premier aspect de leur interaction avec les cellules. Nous avons tout d'abord pu montrer que l'ensemble de nos Au-polyméthacrylates étaient internalisées, mais dans des proportions diverses. Les structures de nos NPs étant très proches, avec des ligands de masses molaires comparables, la comparaison des

résultats obtenus pour les différents types de NPs a permis d'identifier de manière fiable l'impact des propriétés physico-chimiques de la couronne polymère. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une captation accrue pour les ligands polymères présentant un caractère hydrophobe ou cationique, même partiel, tandis que la taille des ligands ne semble pas induire de différence notable. Les tests réalisés sur les AuNPs fonctionnalisées par des protéines ont en outre montré la possibilité d'accroître le nombre de NPs internalisées en ciblant des récepteurs spécifiques des cellules exposées.

Concernant les mécanismes qui régissent l'internalisation, les expériences supplémentaires menées sur les Au-PMAA ont permis de démontrer plusieurs points intéressants. Tout d'abord, les deux études cinétiques ont révélé une internalisation rapide (or détecté après 1h d'incubation) et prolongée (pas de saturation après 24h), et une élimination quasi inexistante. Les observations en microscopie électronique ont ensuite confirmé que les NPs étaient bien internalisées et pas simplement adsorbées sur la membrane plasmique. Les localisations intracellulaires des NPs, déterminées en TEM, se sont révélées très diverses : cytoplasme, vésicules, mitochondries, et noyau notamment. Les images n'ont cependant pas permis de déterminer les mécanismes d'internalisation, qui devront faire l'objet d'études supplémentaires.

Pour poursuivre cette étude, outre les expériences à réaliser pour déterminer les mécanismes exacts d'internalisation des différents types de NPs, il pourrait être intéressant de comparer la quantité de NPs captées par d'autres lignées cellulaires, cancéreuses ou non. Certains auteurs ont en effet observé des captations préférentielles chez les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.¹⁴²

IV. CYTOTOXICITÉ

Dans une perspective d'utilisation en médical, la cytotoxicité des NPs est une question fondamentale. Une fois les NPs internalisées, leurs interactions avec les différents constituants cellulaires (ADN, membranes, mitochondries, etc.) peuvent dérégler certains mécanismes et induire la mort de la cellule. Les voies sont multiples et diffèrent selon le type de NPs.¹⁹⁰ Dans le cas des AuNPs, de nombreuses études ont été réalisées, résumées dans plusieurs revues bibliographiques.¹⁹¹⁻¹⁹³ Cependant, la grande variété des NPs utilisées (taille, forme, ligands, fonctionnalisation) et des conditions appliquées (lignée cellulaire, ratio cellules/NPs, temps d'exposition, type de test, etc.) rend difficile la comparaison de l'ensemble des résultats publiés.

Certaines tendances ont tout de même pu être identifiées concernant l'impact des propriétés physico-chimiques des AuNPs sur leur toxicité. Ainsi, la charge de surface semble jouer un rôle important : une étude rapporte une toxicité accrue des NPs cationiques par rapport aux anioniques,¹⁹⁴ tandis que

d'autres distinguent plutôt les NPs chargées comme étant plus toxiques que les NPs neutres.¹¹¹ Cependant, les mécanismes à l'origine de cette toxicité semblent différer selon la nature de la charge.^{111,195} Le cas du ligand citrate, chargé négativement, a été traité en particulier car il est souvent utilisé comme agent stabilisant dans les synthèses de AuNPs. L'équipe de Kirkpatrick a montré qu'il induit une certaine toxicité.^{196,197} Outre la charge, l'hydrophobicité semble également avoir un impact. Il a ainsi été montré que plus les ligands sont hydrophobes, plus les AuNPs sont toxiques.¹⁹⁸

Dans ce projet, notre objectif étant d'utiliser nos AuNPs en radiosensibilisation, nous cherchons des NPs ne présentant aucune toxicité intrinsèque, mais capables d'augmenter les dommages provoqués par les rayonnements. Des tests de cytotoxicité ont donc été effectués en amont des études sous irradiation, afin de s'assurer que la nature même des NPs ne génère pas d'effet toxique chez la cellule. La méthode choisie ici pour évaluer la toxicité des NPs va être décrite dans une première partie, avant de détailler les résultats obtenus concernant l'impact de la longueur de la couronne polymère, l'impact de sa nature, et enfin l'impact de la doxorubicine et des protéines greffées.

A. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE UTILISÉE

Pour réaliser ces tests, nous avons choisi de nous conformer à la norme NF EN ISO 10993-5, qui concerne les méthodes d'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des dispositifs médicaux, et dont l'application est préconisée par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) dans le cas des nanoparticules utilisées pour le traitement du cancer.¹⁹⁹ La toxicité des NPs a ainsi été évaluée par un test de viabilité cellulaire nommé test MTT, du nom du composé chimique utilisé, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium. Ce sel de tétrazolium peut être réduit en cristaux de formazan violets par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale (Figure III.23). La quantité de cristaux formés est ainsi proportionnelle au nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives. La mesure de l'absorbance après dissolution des cristaux permet donc de quantifier la viabilité cellulaire.

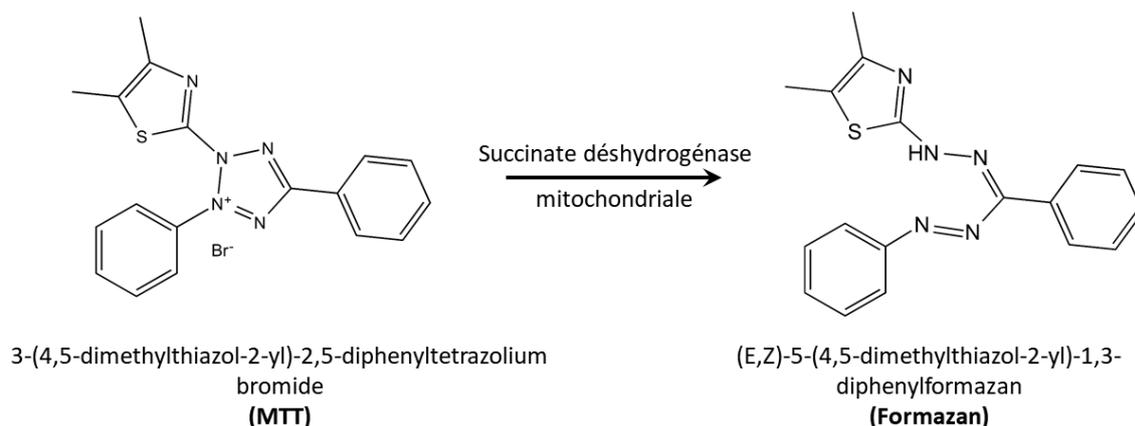


Figure III.23 - Réaction de réduction du MTT en formazan

La lignée utilisée pour ces tests correspond à des fibroblastes murins, appelée L929. Contrairement aux B16F10 utilisées en internalisation, ce sont des cellules saines. L'exposition aux NPs dure 48 heures, à la suite desquelles le test MTT est réalisé. Chaque condition est réalisée en six exemplaires. Pour l'ensemble des tests de cytotoxicité, nous avons à nouveau choisi de travailler à concentration en or constante, et ce sur une large gamme de concentrations allant de 0,1 à 50 µg/mL d'or. Les détails du protocole expérimental sont disponibles en Annexe A. Concernant l'analyse des résultats, la norme NF EN ISO 10993-5 considère qu'il y a une toxicité lorsque la viabilité cellulaire est inférieure à 70%. Des tests statistiques basés sur des modèles linéaires ont en outre été effectués pour certains résultats. La significativité est évaluée en termes de p-valeur (détails en Annexe A).

B. VARIATION DE LA LONGUEUR DE LA COURONNE PMAA

Nous avons d'abord voulu étudier si la longueur des chaînes PMAA greffées pouvait avoir un impact sur la toxicité des NPs. La comparaison des résultats obtenus pour trois longueurs de chaînes différentes est présentée sur la Figure III.24.

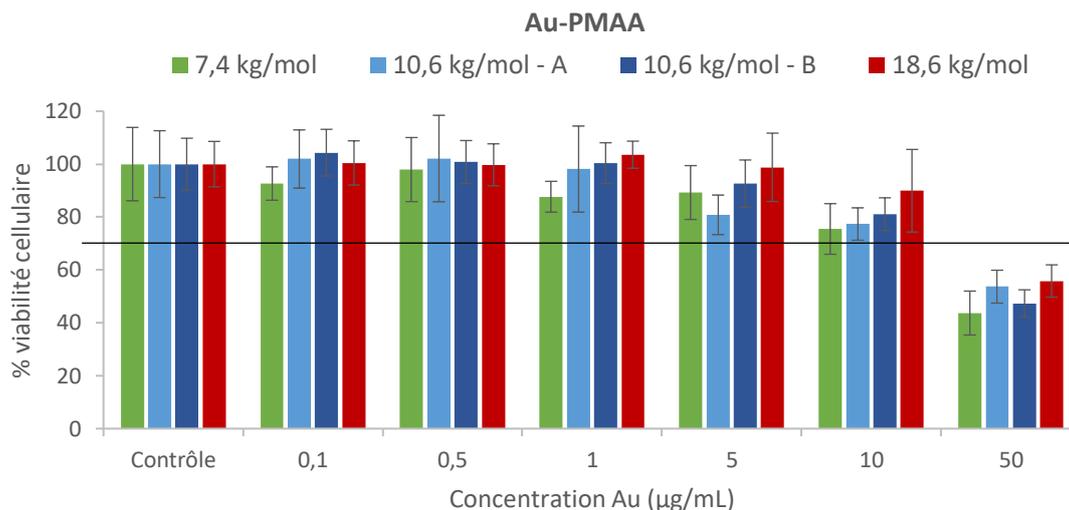


Figure III.24 - Cytotoxicité des NPs Au-PMAA sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures

Pour les quatre Au-PMAA analysées, on n'observe aucune toxicité pour des concentrations d'or inférieures à 50 µg/mL (viabilité au-dessus du seuil de toxicité). Cela montre que les NPs ne deviennent toxiques qu'à très forte concentration. Ce résultat est cohérent avec la littérature, puisque Yilmaz *et al.* ont eux aussi mis en évidence la faible toxicité de leurs Au-PMAA.²⁰⁰

Une étude similaire de l'impact de la masse molaire, effectuée pour des chaînes PEG en surface de AuNPs, n'avait montré aucun impact de la masse molaire du polymère.¹¹⁷ Ici, les résultats semblent également assez proches au premier abord. Nous avons réalisé un test statistique pour confirmer cette impression. Aucune différence n'est identifiée entre les deux Au-PMAA(10,6), ce qui montre une bonne reproductibilité. En les comparant aux autres Au-PMAA, le test statistique semble indiquer une diminution de la toxicité lorsque la longueur de chaîne augmente, mais seulement pour une p-valeur comprise entre 0,05 et 0,1. L'effet n'est donc pas très significatif, et il faudrait confirmer ces résultats en répétant l'expérience de nombreuses fois. Dans tous les cas, cela tend à montrer que ce n'est pas la quantité d'or internalisée qui détermine la toxicité des NPs, puisque les tests de captation avaient mis en évidence une quantité deux fois plus importante dans le cas des chaînes de 18,6 kg/mol.

C. VARIATION DE LA NATURE DE LA COURONNE

Après l'impact de la longueur de chaîne, nous avons cherché à déterminer celui de la nature des polyméthacrylates greffés sur la toxicité des AuNPs. Les résultats obtenus pour les différentes couronnes sont présentés sur la Figure III.25.

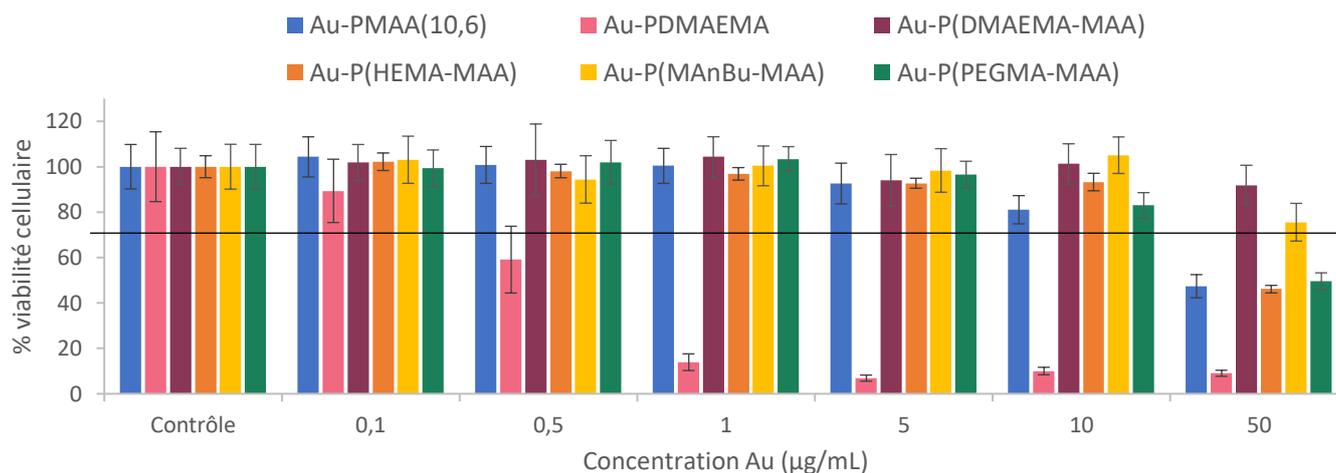


Figure III.25 - Cytotoxicité des NPs Au-PMAA(10,6), Au-PDMAEMA, Au-P(DMAEMA-MAA), Au-P(HEMA-MAA), Au-P(MAnBu-MAA) et Au-P(PEGMA-MAA) sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures

L'observation des résultats montre que la présence des monomères HEMA, MAnBu et PEGMA ne semble pas induire de forte différence de toxicité par rapport au PMAA seul, excepté à la plus forte concentration. Le PDMAEMA, lui, se révèle extrêmement toxique, ce qui confirme donc les observations réalisées sur les tests d'internalisation. Cette toxicité du PDMAEMA était attendue, elle a déjà été montrée à plusieurs reprises dans la littérature.^{122,201} Comme dit précédemment, elle pourrait s'expliquer par la capacité des NPs cationiques à affecter l'intégrité de la membrane cellulaire,^{107,108} ou bien à induire une rupture physique des endosomes, même si ce dernier point reste sujet à débat.^{166,201} Récemment, il a également été montré que les NPs cationiques peuvent être internalisées dans les mitochondries et entraîner des dysfonctionnements chez celles-ci.¹⁷⁷ Ici, la copolymérisation du PDMAEMA avec le PMAA semble toutefois inhiber cette toxicité de manière efficace, puisque les Au-P(DMAEMA-MAA) ne présentent aucune toxicité sur l'ensemble des concentrations testées.

Même si la toxicité du PDMAEMA est un résultat attendu, nous avons tout de même cherché à confirmer qu'elle ne provenait pas du cuivre issu du catalyseur d'ATRP, qui pourrait être encore présent sous forme de traces. En effet, les amines du PDMAEMA pourraient complexer les ions Cu^{2+} . Nous avons donc analysé en ICP-MS la quantité de cuivre présente dans les ligands DS-PMAA (DS04) et DS-PDMAEMA. Les résultats sont résumés sur le Tableau III.3. Les pourcentages massiques obtenus sont très faibles, et ce pour les deux polymères, mais la quantité de cuivre est effectivement plus importante dans le cas du PDMAEMA. Si l'on applique ce pourcentage à la quantité de polymère présente pour 50 µg/mL d'or (soit la concentration maximale utilisée pour les tests de cytotoxicité), on obtient des concentrations en cuivre extrêmement faibles, de l'ordre du ng/mL (Tableau III.3). En outre, on fait ici abstraction de l'éventuelle élimination de cuivre lors de la synthèse et des lavages des NPs. Ces valeurs correspondent donc à des maximums. Or, les études de toxicité des ions Cu^{2+}

montrent qu'aucune toxicité n'est observée sur les L929 en-dessous de 1 µg/mL.²⁰² La toxicité des Au-PDMAEMA ne peut donc pas provenir de la présence de cuivre dans l'échantillon.

Tableau III.3 - Analyses des traces de cuivre dans les polymères

	DS-PMAA (DS04)	DS-PDMAEMA
% _w Cu (ICP-MS)	4,2.10 ⁻⁴	10,5.10 ⁻⁴
Concentration Cu maximale pour 50 µg/mL d'or (µg/mL)	1,7.10 ⁻³	7,9.10 ⁻³

Outre le cuivre, nous avons également voulu déterminer si la toxicité observée pour les Au-PDMAEMA provenait uniquement du polymère, ou bien si elle était accentuée par le fait qu'il entraîne une présence accrue d'or dans les cellules. Un test MTT a donc été effectué pour comparer les Au-PDMAEMA avec le PDMAEMA seul, en même proportion (Figure III.26). Les concentrations supérieures à 1 µg/mL d'or (équivalent à 15 µg/mL de doxorubicine) ne sont pas représentées, ni considérées, car la forte internalisation des Au-PDMAEMA entraîne un artefact au niveau de la mesure d'absorbance sur laquelle repose le calcul de la viabilité.

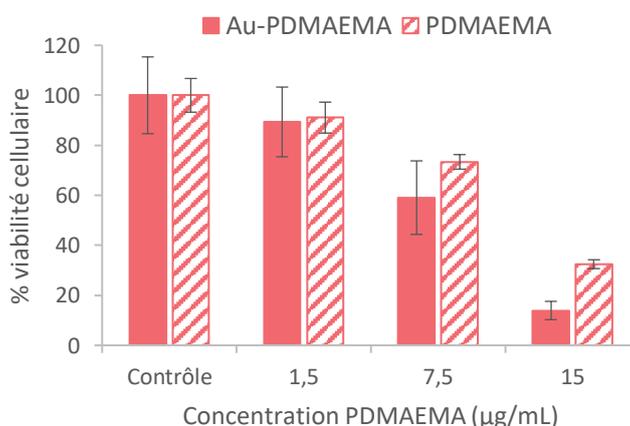


Figure III.26 - Cytotoxicité des NPs Au-PDMAEMA et du PDMAEMA seul sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures

Les résultats montrent que le PDMAEMA seul est lui aussi très toxique, ce qui prouve bien un effet majoritaire du polymère. On observe cependant une toxicité accrue des Au-PDMAEMA par rapport au polymère seul, confirmée par le test statistique (p-valeur < 0,001). L'or internalisé peut donc avoir un rôle dans l'effet toxique des NPs. On pourrait aussi supposer que les mécanismes d'internalisation, et plus généralement d'interactions avec les cellules, sont impactés par le format de nanoparticule, et induisent donc des phénomènes différents.

Concernant les autres NPs synthétisées, celles-ci ne deviennent toxiques qu'à une concentration en or de 50 µg/mL. A cette concentration, des différences importantes sont observées d'une couronne

polymère à l'autre, avec des résultats inattendus, puisque les Au-P(DMAEMA-MAA) sont les moins toxiques. Nous avons cherché à déterminer si ces différences ne provenaient pas d'un biais d'expérience, qui serait la proportion d'eau dans la solution à 50 µg/mL. En effet, toutes les solutions ont été préparées à partir d'une solution mère de 10 mg/mL de NPs, préparée par pesée. Or, le pourcentage d'or varie énormément entre les NPs (voir § III.B du chapitre 2), et le volume de solution mère prélevé pour atteindre les 50 µg/mL d'or varie donc de la même manière. Ainsi, on a 11% d'eau dans le cas des Au-P(PEGMA-MAA) mais seulement 1% pour les Au-P(DMAEMA-MAA). Un test MTT a donc été réalisé pour des proportions de 1 et 10% d'eau dans le milieu (Figure III.27).

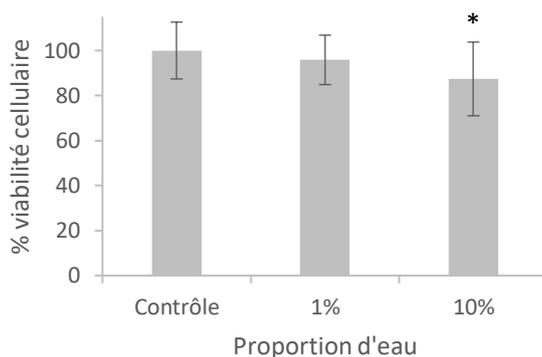


Figure III.27 - Cytotoxicité de l'eau sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures. * $p < 0,05$ comparé au contrôle

Les résultats obtenus montrent un effet significatif (p -valeur $< 0,05$) de l'eau lorsque sa proportion atteint 10% du milieu de culture. On peut supposer que l'ajout d'eau rend ici la solution hypotonique par rapport au cytoplasme des cellules, et génère donc un flux d'eau osmotique vers l'intérieur de celles-ci, entraînant une augmentation du volume des cellules qui peut aller jusqu'à provoquer la rupture de leur membrane.²⁰³ D'après les pourcentages de viabilité observés, le seul effet de l'eau ne suffit pas à expliquer la toxicité observée pour les NPs à la concentration la plus élevée, mais il pourrait affaiblir les cellules et ainsi augmenter la toxicité des NPs par un effet cumulatif. Les résultats à 50 µg/mL ne sont donc pas considérés dans la suite. Pour pouvoir réellement comparer la toxicité des NPs à cette concentration, il faudrait donc travailler à pourcentage d'eau constant pour tous les types de NPs.

Si l'on effectue un test statistique sans considérer les résultats obtenus pour 50 µg/mL d'or, on n'obtient aucune différence significative pour l'ensemble des copolymères par rapport aux Au-PMMA de référence. Ainsi, l'augmentation du nombre de NPs internalisées et de la masse d'or présente dans les cellules, montrée lors des tests de captation pour les Au-P(DMAEMA-MAA), Au-P(MAnBu-MAA) et Au-P(PEGMA-MAA) (§ III.B.2), ne semble pas induire de toxicité supplémentaire.

D. IMPACT DE LA DOXORUBICINE GREFFÉE

Dans le chapitre 2 (§ IV.A), nous avons montré la possibilité de greffer sur nos NPs la doxorubicine, qui est un agent thérapeutique utilisé en chimiothérapie. L'objectif est de pouvoir combiner l'effet radiosensibilisant des AuNPs et l'effet cytotoxique de la doxorubicine. Nous avons donc évalué la toxicité de la molécule greffée, afin de déterminer si le greffage altère ses propriétés de toxicité. La comparaison a été effectuée par rapport à la doxorubicine libre préparée aux mêmes concentrations et en présence de Au-PMAA, pour inclure l'effet des NPs sur les cellules. Les conditions sont identiques à celles utilisées pour le reste des NPs. Les résultats sont présentés sur la Figure III.28.

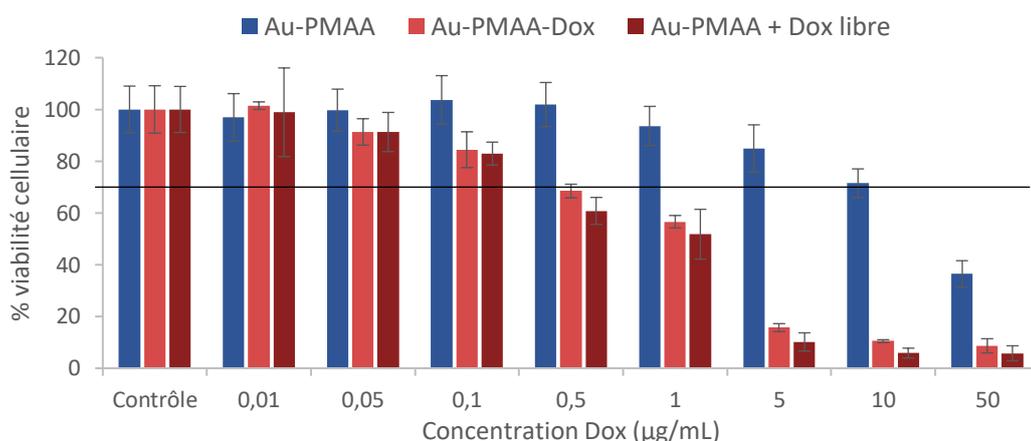


Figure III.28 - Cytotoxicité des Au-PMAA, Au-PMAA-Dox et Au-PMAA + Dox libre sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures

La comparaison des viabilités cellulaires obtenues pour les différents composés analysés met en évidence la toxicité de la doxorubicine greffée et non greffée. Les Au-PMAA-Dox et Au-PMAA + Dox libre sont ainsi bien plus toxiques que les Au-PMAA, et ce dès 0,5 µg/mL de doxorubicine (soit 0,87 µM) si l'on considère le seuil à 70% établi par la norme NF EN ISO 10993-5. Les viabilités obtenues sont d'ailleurs du même ordre que celles rapportées dans la littérature pour la doxorubicine seule, dans des conditions d'évaluation proches (test MTT réalisé sur des L929 avec une exposition de 48 heures).²⁰⁴

Les résultats obtenus pour Au-PMAA-Dox et Au-PMAA + Dox libre semblent très proches. Le test statistique montre une différence significative entre les deux composés, avec une toxicité légèrement accrue des Au-PMAA + Dox libre (p -valeur < 0,001). Le greffage semble donc avoir atténué la toxicité de la doxorubicine, mais l'effet reste faible. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'amine utilisée pour le greffage est impliquée dans l'intercalation de la doxorubicine entre les brins d'ADN (Figure III.29), qui est un des mécanismes de toxicité de la molécule.²⁰⁵

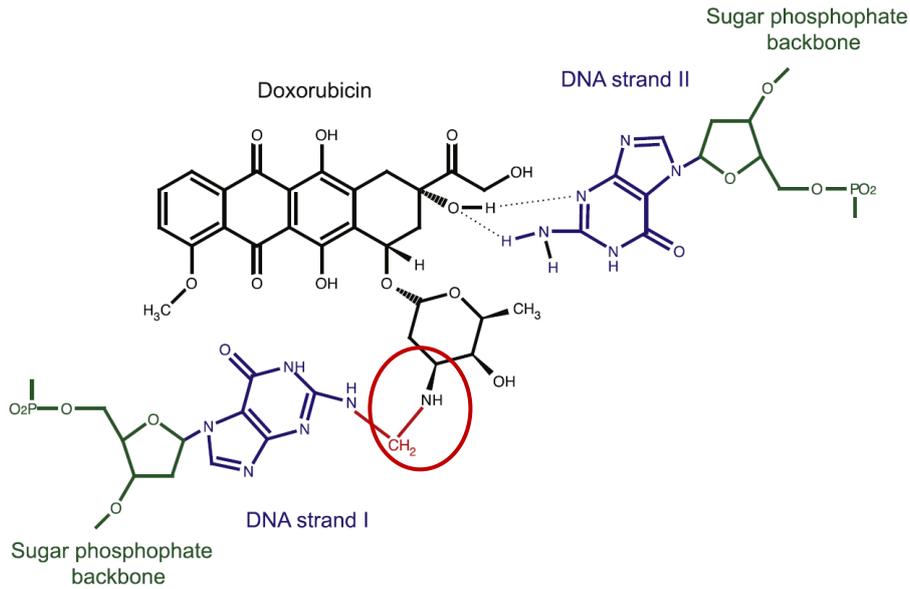


Figure III.29 - Schématisation de la structure du complexe ADN-doxorubicine ²⁰⁵

Par la suite, il faudra également tester la toxicité de ces nanoparticules sur des cellules cancéreuses, pour s'assurer de l'efficacité de la doxorubicine greffée sur les tumeurs.

E. IMPACT DES PROTÉINES GREFFÉES

Deux NPs greffées de protéines avaient été obtenues dans le chapitre 2 (§ IV.B), l'une avec la BSA et l'autre avec la lactoferrine. Dans le cas de cette dernière, l'objectif était de favoriser l'internalisation dans les cancers du cerveau, ce qui semble prometteur d'après les résultats *in vitro* (§ III.B.3). Au-delà des aspects de captation cellulaire, il est également nécessaire d'évaluer la toxicité de ces NPs greffées, via un protocole similaire à celui utilisé pour les autres NPs. Les Au-PMAA-Lf sont comparées aux Au-PMAA-BSA, la BSA servant ici de protéine référence. Les résultats sont présentés sur la Figure III.30.

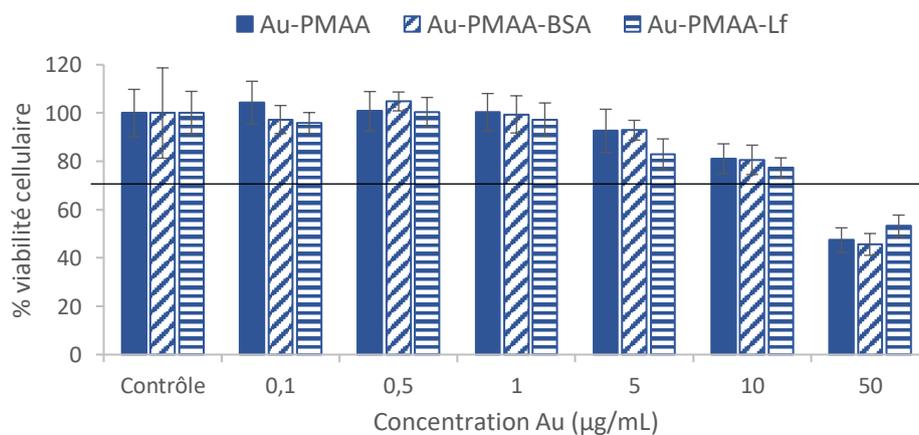


Figure III.30 - Cytotoxicité des Au-PMAA, Au-PMAA-BSA et Au-PMAA-Lf sur les cellules L929 après une exposition de 48 heures

Les Au-PMAA-BSA et Au-PMAA-Lf présentent des résultats similaires à ceux des Au-PMAA, ce que confirme le test statistique réalisé. Ce résultat montre que le greffage de protéines n'induit pas de toxicité supplémentaire. Il serait intéressant d'effectuer le même test sur une lignée de cancer du cerveau, telle que celle utilisée en internalisation (§ III.B.3). Cela permettrait par exemple de déterminer si la captation accrue des Au-PMAA-Lf génère une toxicité plus importante.

Cette étude de toxicité effectuée sur l'ensemble de la gamme de NPs synthétisées montre que les Au-PMAA et leur dérivés (copolymères ou surgreffage de protéines) ne sont toxiques qu'à forte concentration, même pour un temps d'incubation prolongé. Seules les Au-PDMAEMA ont montré un fort effet toxique, ce qui était un résultat attendu, ainsi que les Au-PMAA-Dox, ce qui a permis de mettre en évidence un bon maintien des effets cytotoxiques de l'agent de chimiothérapie greffé.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les différentes études présentées dans ce chapitre ont permis de caractériser les interactions de nos AuNPs greffées polymères avec les constituants biologiques, à la fois à l'échelle moléculaire (protéines du milieu de culture et de la matrice extracellulaire) et cellulaire. Pour cela, nous avons développé plusieurs méthodes, telles que l'utilisation de la diffusion des rayons X aux petits angles pour évaluer la stabilité colloïdale en milieux biologiques, ou l'utilisation d'un modèle de MEC pour étudier la diffusion des NPs. Au-delà des résultats obtenus pour nos objets, ces méthodes pourront être appliquées par la suite à d'autres types de NPs.

A partir du jeu de données collectées dans ce chapitre (résumées dans le Tableau III.4), nous pouvons identifier des tendances qui permettent de déterminer quelles caractéristiques des ligands sont favorables à l'une ou l'autre des propriétés que l'on recherche pour nos NPs. Nous avons ainsi pu montrer que la présence de tout ligand polyméthacrylate constitue un avantage indéniable pour assurer la stabilité colloïdale des NPs. Le comportement des NPs vis-à-vis de la MEC ou des cellules dépend, lui, des propriétés physico-chimiques des ligands. Certaines caractéristiques ont ainsi pu être identifiées comme critiques, notamment la présence de charges positives et de parties hydrophobes. Ces tendances sont schématisées sur la Figure III.31.

Tableau III.4 - Résumé des résultats obtenus pour la caractérisation des comportements de nos NPs vis-à-vis de différents systèmes biologiques

	Stabilité colloïdale en milieux biologiques	Diffusion dans la MEC	Captation cellulaire	Absence de cytotoxicité
PMAA	++	++	+	++
PDMAEMA	++	-	+++	-
P(DMAEMA-MAA)	++	+	+++	++
P(HEMA-MAA)	++	++	+	++
P(MAnBu-MAA)	++	-	+	++
P(PEGMA-MAA)	++	++	++	++

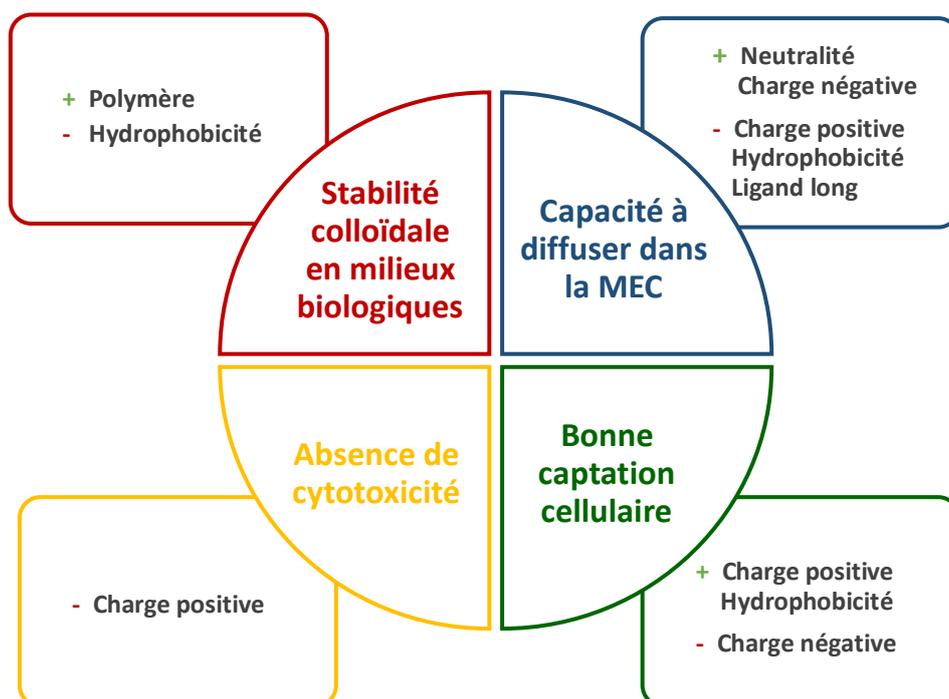


Figure III.31 - Résumé des caractéristiques des NPs étant favorables ou défavorables aux différentes propriétés généralement recherchées pour une NP à visée médicale

La diversité des comportements résumés dans le Tableau III.4 et la Figure III.31 souligne la difficulté à mettre au point une NP optimale, certaines propriétés pouvant favoriser fortement un phénomène recherché, tout en induisant un comportement indésirable sur un autre aspect. Le cas du PDMAEMA illustre par exemple cet effet, puisqu'il permet une excellente internalisation mais génère également une grande toxicité. La possibilité de combiner différentes propriétés dans un même ligand en utilisant des copolymères constitue donc un avantage indéniable dans cette quête de la NP idéale, comme le montrent les bonnes performances des Au-P(DMAEMA-MAA) en captation et toxicité.

Cette diversité des comportements peut aussi être tournée en avantage : plutôt que de chercher à obtenir un type de NP qui présente toutes les qualités, on peut envisager d'utiliser plusieurs NPs pour combiner leurs propriétés. On pourrait par exemple imaginer une injection intratumorale de NPs qui

diffusent à des vitesses différentes, afin d'obtenir des « vagues » successives de NPs qui pourraient être avantageuses en radiosensibilisation, les traitements par radiothérapie étant souvent réalisés de manière fractionnée. Sur le plan de la captation cellulaire, l'utilisation combinée de plusieurs NPs pourrait permettre d'exploiter simultanément différents mécanismes de captation, afin de maximiser la quantité internalisée, mais aussi de cibler plusieurs localisations intracellulaires. La caractérisation approfondie des comportements des différentes NPs est donc indispensable pour pouvoir envisager de telles applications.

Pour la suite du projet, nous avons déjà mentionné que l'internalisation devra être étudiée de manière plus détaillée. L'ensemble des méthodologies mises au point dans le cas du PMAA pourront tout d'abord être appliquées aux autres ligands polymères. La détermination des mécanismes d'internalisation sera également primordiale, comme cela a déjà été détaillé dans ce chapitre. Au-delà du processus même d'internalisation, le suivi de l'intégrité des NPs internalisées nous semble être un autre aspect important. S'il a été relativement négligé dans la littérature, cela provient vraisemblablement de la difficulté à analyser les éventuelles modifications que peuvent subir les NPs dans la cellule (agrégation, dissolution, échanges de ligands, etc.). L'observation en TEM montre par exemple ses limites car elle ne permet pas de visualiser les ligands organiques, ni de quantifier des phénomènes fins de dissolution ou d'agrégation, notamment dans le cas de très petites NPs comme celles utilisées dans ce projet.

La dégradation la plus fréquemment observée pour les AuNPs dans la littérature est l'agrégation, à la fois *in vitro*^{91,142,206} et *in vivo*.^{152,207} Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a pu quantifier le phénomène, puisque les analyses reposent exclusivement sur des observations en TEM. Afin d'évaluer par une mesure *in situ* l'état intracellulaire des NPs, nous avons réalisé au cours de cette thèse des mesures en SAXS directement sur des cellules ayant été exposées à des NPs. L'objectif était d'analyser les NPs internalisées, afin de caractériser leur état d'agrégation. Pour cela, des cellules ont été exposées à des Au-PMAA(10,6) à une concentration de 22 µg/mL d'or pendant 18 heures. Après lavages et centrifugations, le culot cellulaire a été injecté dans un capillaire que nous avons analysé en SAXS. Le même protocole a été appliqué à des cellules non exposées aux NPs, afin de constituer un contrôle.

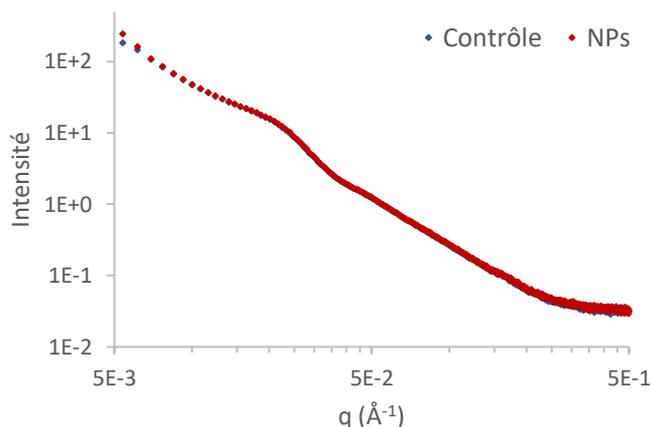


Figure III.32 - Courbes SAXS des cellules contrôles et des cellules exposées aux NPs

Les résultats (Figure III.32) ne permettent pas d'identifier un signal caractéristique des AuNPs. Il est probable que la sensibilité du SAXS n'est ici pas assez élevée, puisque la concentration d'or estimée dans le capillaire est de 60 μM . On pourrait réitérer l'expérience avec des NPs internalisées dans de plus grandes proportions, comme les Au-P(DMAEMA-MAA), mais cela souligne la difficulté à trouver une méthode *in situ* suffisamment sensible pour caractériser avec précision l'état d'agrégation des NPs.

Une autre possibilité serait d'utiliser la microscopie optique en champ sombre, déjà évoquée précédemment. Elle peut en effet être couplée à une analyse spectrale de la lumière diffusée, ce qui permet de discriminer à l'intérieur des cellules différents types de AuNPs,^{82,154} mais aussi différents états d'agrégation, car le spectre diffusé s'en trouve modifié.^{208,209} Sans permettre une analyse aussi précise que le SAXS, cette technique d'imagerie peut apporter des informations quantitatives sur les proportions respectives de NPs bien dispersées et de NPs agrégées. Elle est cependant limitée à l'analyse de NPs de taille supérieure à 10 nm, et ne serait donc pas applicable dans notre cas.

Sans utiliser de méthode *in situ*, le défi consiste alors à extraire les NPs internalisées pour pouvoir les analyser *ex situ*. Des techniques d'ultracentrifugation pourraient par exemple être envisagées après la lyse des cellules, de manière à faire précipiter sélectivement les AuNPs en exploitant leur forte densité. Les techniques plus classiques de caractérisation pourraient alors être utilisées. Cependant, il faut garder à l'esprit que le risque de modification des NPs durant le processus d'extraction est assez grand.

Outre l'agrégation, le cœur métallique peut subir d'autres modifications, telles qu'une dissolution partielle ou une réorganisation. Il a par exemple été montré que des AuNPs stabilisées par des thiols (petites molécules) peuvent être progressivement dégradées par l'environnement acide des lysosomes, entraînant ainsi un relargage d'ions métalliques à l'intérieur de la cellule qui peut induire une toxicité.²¹⁰ Les auteurs suggèrent que la présence de ligands stables et robustes pourrait toutefois limiter ce phénomène. Une dégradation des cœurs d'or a également été observée *in vivo* à long terme

(> 7 jours) dans le cas de NPs cœur-coquille recouvertes d'oxyde de fer, situées dans les lysosomes de macrophages.²¹¹ Après dégradation de la coquille, les observations en TEM mettent tout d'abord en évidence une érosion des cœurs d'or, puis leur réorganisation en chapelets ou autres structures.

Ces aspects de dissolution partielle pourraient être étudiés en analysant en ICP-MS la quantité d'or présente dans des solutions cellulaires centrifugées à travers des tubes concentrateurs, de manière à éliminer le signal provenant des NPs et ne conserver que celui correspondant aux éventuels ions issus de leur dégradation. Des analyses par spectroscopie d'absorption X (XAS) sur synchrotron pourraient également permettre d'étudier *in situ* la spéciation de l'or et de détecter la libération d'or sous forme ionique, comme cela a été réalisé par Wang *et al.*²¹²

Le suivi intracellulaire des ligands se révèle encore plus complexe, notamment car les ligands, souvent de nature organique, sont constitués des mêmes atomes que l'ensemble du vivant. Les ligands risquent notamment d'être dégradés par le milieu intracellulaire. Un phénomène de saponification a par exemple été montré pour diverses molécules, dont plusieurs monomères méthacrylates, sous l'action de certaines enzymes comme les estérases, présentes dans les cellules.²¹³⁻²¹⁵ Les polyméthacrylates semblent toutefois être plus résistants à l'hydrolyse que leurs monomères.²¹⁵⁻²¹⁷ Mais il est très difficile d'analyser ces possibles dégradations directement dans la cellule.

Repérer l'éventuelle dissociation des ligands et des NPs est également ardu. Une des stratégies utilisées repose sur le marquage par fluorescence. Sée *et al.* ont ainsi greffé un fluorophore sur les ligands de leurs AuNPs : celles-ci inhibent la fluorescence du marqueur par transfert d'énergie, mais uniquement lorsque les deux objets sont proches, c'est-à-dire lorsque le ligand se situe encore en surface de la NP. *In vitro*, les auteurs observent une augmentation de la fluorescence qui traduit donc une dissociation des ligands.²¹⁸ La nécessité de greffer un fluorophore est un désavantage de cette technique, car sa présence peut modifier les propriétés de surface des NPs, et donc leur comportement *in vitro*. La quantification est en outre difficile. Une autre technique combinant ICP-MS et LDI-MS (désorption-ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse) a été développée par l'équipe de Rotello.²¹⁹ La LDI-MS permet de quantifier les ligands qui sont encore présents à la surface de NPs internalisées. La comparaison avec la quantité d'or détectée en ICP-MS permet alors de déduire la proportion de ligands dissociés des NPs. Cette technique ne nécessite aucun marquage, mais elle ne permet pas actuellement de détecter tous les types de ligands. De plus, elle ne donne aucune information concernant la localisation des différents constituants de la NP, à moins d'effectuer les analyses sur des constituants cellulaires préalablement isolés.

Les techniques actuelles ne semblent donc pas permettre d'effectuer un suivi à la fois de l'intégrité des NPs et de la localisation de leurs constituants. Les récents développements des analyses isotopiques par SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*) ou EELS vibrationnel (*Electron Energy-Loss Spectroscopy*) en microscopie électronique pourraient cependant permettre à terme l'identification, avec une bonne résolution spatiale, de composés préalablement marqués par des isotopes (Figure III.33).^{220,221} Des cartographies isotopiques pourraient aussi être envisagées avec la technique AFM-IR, même si la résolution spatiale est moins bonne qu'en TEM.²²² Cela pourrait ouvrir la voie à tout un champ d'étude jusqu'ici peu exploré, en utilisant un marquage isotopique des ligands organiques.

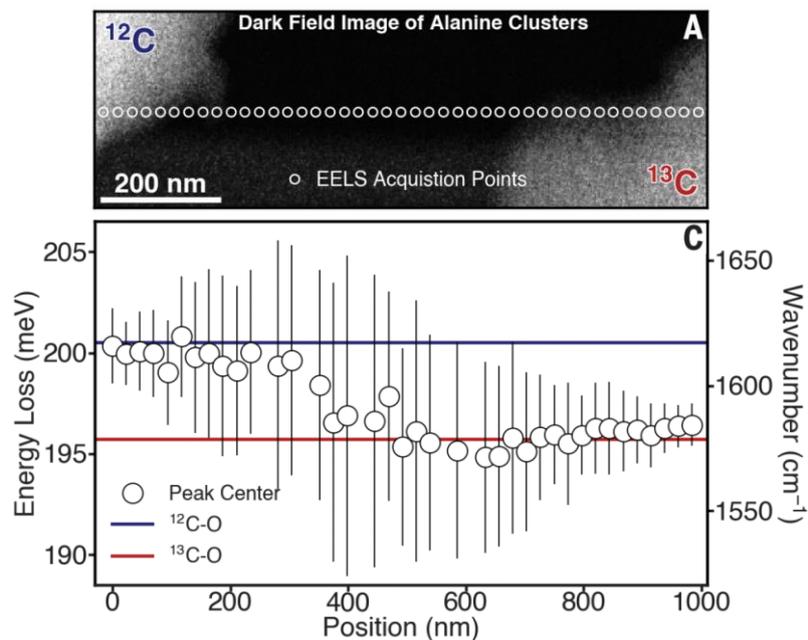


Figure III.33 - Analyse isotopique à haute résolution spatiale réalisée par EELS vibrationnel dans un TEM
 (a) Image en champ sombre montrant les deux zones isotopiques
 (b) Evolution de la position du pic de la liaison C-O le long du profil repéré sur (a)²²¹

Dans une perspective plus spécifique d'utilisation de nos NPs pour traiter les cancers du cerveau, le passage de la barrière hémato-encéphalique (*Blood Brain Barrier* en anglais, ou BBB) reste un critère clé. Pour prédire la perméabilité des NPs, nous avons utilisé un test nommé PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), qui utilise des membranes artificielles recouvertes de lipides pour modéliser les membranes biologiques, et en particulier la BBB (Figure III.34).²²³

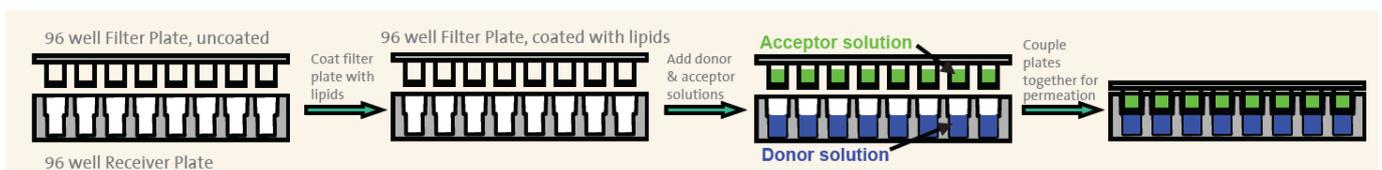


Figure III.34 - Schématisation du principe du test PAMPA pour prédire la perméabilité des NPs à travers la BBB²²⁴

Ce test a été appliqué à plusieurs de nos AuNPs, mais aucune n'a été détectée dans le compartiment accepteur, ce qui tend à montrer qu'elles ne peuvent passer la BBB par simple diffusion passive. Ce résultat est toutefois sujet à caution, puisque les NPs semblaient adsorbées sur la membrane. Des modèles de PAMPA plus perfectionnés pourraient être testés, comme celui commercialisé par Corning®, qui est caractérisé par une couche de lipides structurée, plus représentative de la BBB.²²⁴ On pourrait également tester des modèles cellulaires de BBB, qui, eux, prennent en compte à la fois la perméabilité par diffusion passive et par des mécanismes actifs.²²⁵ Prades *et al.* ont par exemple montré que leurs AuNPs conjuguées à des peptides ciblant la transferrine présentaient une bonne perméabilité pour les modèles cellulaires, mais aucune pour les tests PAMPA.²²⁶ L'évaluation *in vitro* du passage de la BBB par nos Au-PMAA-Lf devra donc être effectuée sur des modèles cellulaires, puisqu'on s'attend plutôt à des mécanismes actifs liés aux récepteurs spécifiques de la lactoferrine situés sur certaines cellules constituant la BBB.²²⁷

Les perspectives évoquées ici soulignent la multitude de tests nécessaires pour caractériser de manière complète le comportement des NPs *in vitro*, et ainsi espérer prédire celui qu'elles auront *in vivo*. Toutes ces considérations ne s'appliquent pas uniquement au contexte de la radiosensibilisation, mais bien à toutes les NPs à visée médicale. L'étude plus spécifique du comportement de nos NPs sous irradiation va maintenant faire l'objet du chapitre suivant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Carlander, U., Midander, K., Hedberg, Y. S., Johanson, G., Bottai, M. & Karlsson, H. L. Macrophage-Assisted Dissolution of Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Bio Mater.* (2019).
2. Skebo, J. E., Grabinski, C. M., Schrand, A. M., Schlager, J. J. & Hussain, S. M. Assessment of Metal Nanoparticle Agglomeration, Uptake, and Interaction Using High-Illuminating System. *Int. J. Toxicol.* **26**, 135–141 (2007).
3. Albanese, A. & Chan, W. C. W. Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. *ACS Nano* **5**, 5478–5489 (2011).
4. Halamoda-Kenzaoui, B., Ceridono, M., Urbán, P., Bogni, A., Ponti, J., Gioria, S. & Kinsner-Ovaskainen, A. The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation. *J. Nanobiotechnology* **15**, 48 (2017).
5. Cho, E. C., Zhang, Q. & Xia, Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 385–391 (2011).
6. Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W. J. & Bruinink, A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **168**, 121–131 (2007).
7. Byrne, H., McNamara, A. & Kuncic, Z. Impact of nanoparticle clustering on dose radio-enhancement. *Radiat. Prot. Dosimetry* 1–5 (2018).
8. Covington, A. K. & Robinson, R. A. Reference standards for the electrometric determination, with ion-selective electrodes, of potassium and calcium in blood serum. *Anal. Chim. Acta* **78**, 219–223 (1975).
9. Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 77–89 (2009).
10. Izak-Nau, E., Voetz, M., Eiden, S., Duschl, A. & Puentes, V. F. Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 56 (2013).
11. Aldewachi, H., Woodroffe, N. & Gardiner, P. Study of the Stability of Functionalized Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Dipeptidyl Peptidase IV. *Appl. Sci.* **8**, 2589 (2018).
12. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
13. Caracciolo, G., Farokhzad, O. C. & Mahmoudi, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* **35**, 257–264 (2017).
14. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
15. Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D. & Stark, W. J. Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9370–9376 (2005).
16. Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J. & Hussain, S. M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol. Sci.* **101**, 239–253 (2008).
17. Lacerda, S. H. D. P., Park, J. J., Meuse, C., Pristiniski, D., Becker, M. L., Karim, A. & Douglas, J. F. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano* **4**, 365–379 (2010).

18. Rausch, K., Reuter, A., Fischer, K. & Schmidt, M. Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum. *Biomacromolecules* **11**, 2836–2839 (2010).
19. Petri-Fink, A., Steitz, B., Finka, A., Salaklang, J. & Hofmann, H. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 129–137 (2008).
20. Allouni, Z. E., Cimpan, M. R., Høl, P. J., Skodvin, T. & Gjerdet, N. R. Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **68**, 83–87 (2009).
21. Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E. M. V., Godwin, H., Nel, A. E. & Zink, J. I. Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7309–7314 (2010).
22. Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R. & Pompa, P. P. Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *ACS Nano* **4**, 7481–7491 (2010).
23. López-Sanz, S., Fariñas, N. R., Martín-Doimeadios, R. del C. R. & Ríos, Á. Analytical strategy based on asymmetric flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS and complementary techniques to study gold nanoparticles transformations in cell culture medium. *Anal. Chim. Acta* (2018).
24. Zhang, D., Neumann, O., Wang, H., Yuwono, V. M., Barhoumi, A., Perham, M., Hartgerink, J. D., Wittung-Stafshede, P. & Halas, N. J. Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH. *Nano Lett.* **9**, 666–671 (2009).
25. Ann Alex, S., Chakraborty, D., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. A comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization. *RSC Adv.* **6**, 52683–52694 (2016).
26. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
27. Ghosh, S. K. & Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **107**, 4797–4862 (2007).
28. Thermo Fisher Scientific. DPBS - Technical Resources - Media Formulations. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.147.html>.
29. Thermo Fisher Scientific. DMEM - Technical Resources - Media Formulations. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.176.html>.
30. Sigma-Aldrich. Fetal Bovine Serum - Specification Sheet. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/DataSheetPage.do?brandKey=SIGMA&symbol=F7524>.
31. Jiang, X., Jiang, J., Jin, Y., Wang, E. & Dong, S. Effect of Colloidal Gold Size on the Conformational Changes of Adsorbed Cytochrome c: Probing by Circular Dichroism, UV–Visible, and Infrared Spectroscopy. *Biomacromolecules* **6**, 46–53 (2005).
32. Johnston, B. D. *et al.* Colloidal Stability and Surface Chemistry Are Key Factors for the Composition of the Protein Corona of Inorganic Gold Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1701956 (2017).
33. Less, J. R., Posner, M. C., Boucher, Y., Borochoy, D., Wolmark, N. & Jain, R. K. Interstitial Hypertension in Human Breast and Colorectal Tumors. *Cancer Res.* **52**, 6371–6374 (1992).
34. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406 (2012).

35. Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., Tomaso, E. di, Brown, E. B., Izumi, Y., Campbell, R. B., Berk, D. A. & Jain, R. K. Role of tumor–host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: Cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4628–4633 (2001).
36. Dai, Q., Wilhelm, S., Ding, D., Syed, A. M., Sindhvani, S., Zhang, Y., Chen, Y. Y., MacMillan, P. & Chan, W. C. W. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. *ACS Nano* (2018).
37. Jain, R. K. & Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 653–664 (2010).
38. Ramanujan, S., Pluen, A., McKee, T. D., Brown, E. B., Boucher, Y. & Jain, R. K. Diffusion and Convection in Collagen Gels: Implications for Transport in the Tumor Interstitium. *Biophys. J.* **83**, 1650–1660 (2002).
39. Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C. & Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **9**, 1909–1915 (2009).
40. Hansing, J., Ciemer, C., Kim, W. K., Zhang, X., DeRouchey, J. E. & Netz, R. R. Nanoparticle filtering in charged hydrogels: Effects of particle size, charge asymmetry and salt concentration. *Eur. Phys. J. E* **39**, 53 (2016).
41. Lieleg, O., Baumgärtel, R. M. & Bausch, A. R. Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophys. J.* **97**, 1569–1577 (2009).
42. Mattix, B., Moore, T., Uvarov, O., Pollard, S., O'Donnell, L., Park, K., Horne, D., Dhulekar, J., Reese, L., Nguyen, D., Kraveka, J., Burg, K. & Alexis, F. Effects of polymeric nanoparticle surface properties on interaction with brain tumor environment. *Nano LIFE* **03**, 1343003 (2013).
43. Stylianopoulos, T., Poh, M.-Z., Insin, N., Bawendi, M. G., Fukumura, D., Munn, L. L. & Jain, R. K. Diffusion of Particles in the Extracellular Matrix: The Effect of Repulsive Electrostatic Interactions. *Biophys. J.* **99**, 1342–1349 (2010).
44. Pluen, A., Netti, P. A., Jain, R. K. & Berk, D. A. Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels: Comparison of Linear and Globular Configurations. *Biophys. J.* **77**, 542–552 (1999).
45. Netti, P. A., Berk, D. A., Swartz, M. A., Grodzinsky, A. J. & Jain, R. K. Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. *Cancer Res.* **60**, 2497–2503 (2000).
46. Chen, Z.-J., Broaddus, W. C., Viswanathan, R. R., Raghavan, R. & Gillies, G. T. Intraparenchymal drug delivery via positive-pressure infusion: experimental and modeling studies of poroelasticity in brain phantom gels. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **49**, 85–96 (2002).
47. Chen, Z.-J., Gillies, G. T., Broaddus, W. C., Prabhu, S. S., Fillmore, H., Mitchell, R. M., Corwin, F. D. & Fatouros, P. P. A realistic brain tissue phantom for intraparenchymal infusion studies. *J. Neurosurg.* **101**, 314–322 (2004).
48. Salloum, M., Ma, R. H., Weeks, D. & Zhu, L. Controlling nanoparticle delivery in magnetic nanoparticle hyperthermia for cancer treatment: Experimental study in agarose gel. *Int. J. Hyperthermia* **24**, 337–345 (2008).
49. Sigma-Aldrich. Hydrogels for 3D cell culture. *Sigma-Aldrich* <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-hydrogels.html>.
50. Wolf, K., Lindert, M. te, Krause, M., Alexander, S., Riet, J. te, Willis, A. L., Hoffman, R. M., Figdor, C. G., Weiss, S. J. & Friedl, P. Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol* **201**, 1069–1084 (2013).
51. Tomasetti, L., Liebl, R., Wastl, D. S. & Breunig, M. Influence of PEGylation on nanoparticle mobility in different models of the extracellular matrix. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **108**, 145–155 (2016).

52. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378–386 (2005).
53. Abrams, G. A., Goodman, S. L., Nealey, P. F., Franco, M. & Murphy, C. J. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* **299**, 39–46 (2000).
54. Soofi, S. S., Last, J. A., Liliensiek, S. J., Nealey, P. F. & Murphy, C. J. The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **167**, 216–219 (2009).
55. Kuhn, S. J., Finch, S. K., Hallahan, D. E. & Giorgio, T. D. Proteolytic Surface Functionalization Enhances In Vitro Magnetic Nanoparticle Mobility through Extracellular Matrix. *Nano Lett.* **6**, 306–312 (2006).
56. Zaman, M. H., Trapani, L. M., Sieminski, A. L., MacKellar, D., Gong, H., Kamm, R. D., Wells, A., Lauffenburger, D. A. & Matsudaira, P. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10889–10894 (2006).
57. Anguiano, M., Castilla, C., Maška, M., Ederra, C., Peláez, R., Morales, X., Muñoz-Arrieta, G., Mujika, M., Kozubek, M., Muñoz-Barrutia, A., Rouzaut, A., Arana, S., Garcia-Aznar, J. M. & Ortiz-de-Solorzano, C. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis. *PLOS ONE* **12**, e0171417 (2017).
58. Hoshiba, T., Chen, G., Endo, C., Maruyama, H., Wakui, M., Nemoto, E., Kawazoe, N. & Tanaka, M. Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation. *Stem Cells Int.* **2016**, e6397820 (2015).
59. Kihara, T., Ito, J. & Miyake, J. Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *PLoS ONE* **8**, e82382 (2013).
60. Sedláček, P., Smilek, J. & Klučáková, M. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments. *React. Funct. Polym.* **75**, 41–50 (2014).
61. Leung, D. H., Kapoor, Y., Alleyne, C., Walsh, E., Leithead, A., Habulihaz, B., Salituro, G. M., Bak, A. & Rhodes, T. Development of a Convenient In Vitro Gel Diffusion Model for Predicting the In Vivo Performance of Subcutaneous Parenteral Formulations of Large and Small Molecules. *AAPS PharmSciTech* **18**, 2203–2213 (2017).
62. Raeesi, V. & Chan, W. C. Improving nanoparticle diffusion through tumor collagen matrix by photo-thermal gold nanorods. *Nanoscale* **8**, 12524–12530 (2016).
63. Ye, F., Larsen, S. W., Yagmur, A., Jensen, H., Larsen, C. & Østergaard, J. Real-time UV imaging of piroxicam diffusion and distribution from oil solutions into gels mimicking the subcutaneous matrix. *Eur. J. Pharm. Sci.* **46**, 72–78 (2012).
64. Jensen, S. S., Jensen, H., Møller, E. H., Cornett, C., Siepmann, F., Siepmann, J. & Østergaard, J. In vitro release studies of insulin from lipid implants in solution and in a hydrogel matrix mimicking the subcutis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **81**, 103–112 (2016).
65. Attaluri, A., Ma, R. & Zhu, L. Quantification of Nanoparticle Distribution in Tissue After Direct Injection Using MicroCT Imaging. in *2010 14th International Heat Transfer Conference* 15–19 (American Society of Mechanical Engineers, 2010).
66. Alderden, R. A., Mellor, H. R., Modok, S., Hall, M. D., Sutton, S. R., Newville, M. G., Callaghan, R. & Hambley, T. W. Elemental Tomography of Cancer-Cell Spheroids Reveals Incomplete Uptake of Both Platinum(II) and Platinum(IV) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13400–13401 (2007).

67. Kuhn, S. J., Hallahan, D. E. & Giorgio, T. D. Characterization of Superparamagnetic Nanoparticle Interactions with Extracellular Matrix in an in Vitro System. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 51–58 (2006).
68. Beckhoff, B., Kanngießer, B., Langhoff, N., Wedell, R. & Wolff, H. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. (Springer Science & Business Media, 2007).
69. Henke, B. L., Gullikson, E. M. & Davis, J. C. X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at $E = 50\text{--}30,000$ eV, $Z = 1\text{--}92$. *At. Data Nucl. Data Tables* **54**, 181–342 (1993).
70. Balluffi, R. W., Allen, S. & Carter, W. C. *Kinetics of Materials*. (John Wiley & Sons, 2005).
71. Slater, K., Partridge, J. & Nadivada, H. Tuning the Elastic Moduli of Corning® Matrigel® and Collagen I 3D Matrices by Varying the Protein Concentration. *Corning - Appl. Note* (2017).
72. Serban, M. A. & Prestwich, G. D. Modular extracellular matrices: Solutions for the puzzle. *Methods* **45**, 93–98 (2008).
73. Lutolf, M. P. Integration column: Artificial ECM: expanding the cell biology toolbox in 3D. *Integr. Biol.* **1**, 235 (2009).
74. Hughes, C. S., Postovit, L. M. & Lajoie, G. A. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS* **10**, 1886–1890 (2010).
75. Mathur, A. M., Drescher, B., Scranton, A. B. & Klier, J. Polymeric emulsifiers based on reversible formation of hydrophobic units. *Nature* **392**, 367 (1998).
76. Muiznieks, L. D. & Keeley, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1832**, 866–875 (2013).
77. Wang, X., Chen, Y., Xue, L., Pothayee, N., Zhang, R., Riffle, J. S., Reineke, T. M. & Madsen, L. A. Diffusion of Drug Delivery Nanoparticles into Biogels Using Time-Resolved MicroMRI. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 3825–3830 (2014).
78. Zhang, Y., Fry, C. G., Pedersen, J. A. & Hamers, R. J. Dynamics and Morphology of Nanoparticle-Linked Polymers Elucidated by Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Chem.* **89**, 12399–12407 (2017).
79. Teramoto, A., Takagi, Y., Hachimori, A. & Abe, K. Interaction of albumin with polysaccharides containing ionic groups. *Polym. Adv. Technol.* **10**, 681–686 (1999).
80. Nichols, J. W. & Bae, Y. H. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. *Nano Today* **7**, 606–618 (2012).
81. Albanese, A., Lam, A. K., Sykes, E. A., Rocheleau, J. V. & Chan, W. C. W. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
82. Yohan, D., Cruje, C., Lu, X. & Chithrani, D. B. Size-Dependent Gold Nanoparticle Interaction at Nano–Micro Interface Using Both Monolayer and Multilayer (Tissue-Like) Cell Models. *Nano-Micro Lett.* **8**, 44–53 (2016).
83. Mulens-Arias, V., Balfourier, A., Nicolás-Boluda, A., Carn, F. & Gazeau, F. Disturbance of adhesomes by gold nanoparticles reveals a size- and cell type-bias. *Biomater. Sci.* (2018).
84. McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O’Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G. & Currell, F. J. Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci. Rep.* **1**, 18 (2011).
85. McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O’Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G. & Currell, F. J. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother. Oncol.* **100**, 412–416 (2011).

86. Kong, T., Zeng, J., Wang, X., Yang, X., Yang, J., McQuarrie, S., McEwan, A., Roa, W., Chen, J. & Xing, J. Z. Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles. *Small* **4**, 1537–1543 (2008).
87. Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P. & Jaffray, D. A. Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiat. Res.* **173**, 719–728 (2010).
88. Alkilany, A. M., Nagaria, P. K., Hexel, C. R., Shaw, T. J., Murphy, C. J. & Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **5**, 701–708 (2009).
89. Gu, Y.-J., Cheng, J., Lin, C.-C., Lam, Y. W., Cheng, S. H. & Wong, W.-T. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **237**, 196–204 (2009).
90. Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T., Zhang, X., Jin, S., Gan, Y., Wang, P. C., He, S., Zhang, X. & Liang, X.-J. Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. *ACS Nano* **6**, 4483–4493 (2012).
91. Huo, S., Jin, S., Ma, X., Xue, X., Yang, K., Kumar, A., Wang, P. C., Zhang, J., Hu, Z. & Liang, X.-J. Ultrasmall Gold Nanoparticles as Carriers for Nucleus-Based Gene Therapy Due to Size-Dependent Nuclear Entry. *ACS Nano* **8**, 5852–5862 (2014).
92. Escudero-Francos, M. A., Cepas, V., Gonzalez-Menendez, P., Badia-Laino, R., Diaz-Garcia, M. E., Sainz, R., Mayo, J. & Hevia, D. Cellular Uptake and Tissue Biodistribution of Functionalized Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *J. Biomed. Nanotechnol.* **13**, 167–179 (2017).
93. Yu, L. & Andriola, A. Quantitative gold nanoparticle analysis methods: A review. *Talanta* **82**, 869–875 (2010).
94. Gorayski, P., Burmeister, B. & Foote, M. Radiotherapy for cutaneous melanoma: current and future applications. *Future Oncol.* **11**, 525–534 (2015).
95. Chang, M.-Y., Shiau, A.-L., Chen, Y.-H., Chang, C.-J., Chen, H. H.-W. & Wu, C.-L. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci.* **99**, 1479–1484 (2008).
96. Alcaraz, M., Alcaraz-Saura, M., Achel, D. G., Olivares, A., López-Morata, J. A. & Castillo, J. Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells. *Anticancer Res.* **34**, 1913–1921 (2014).
97. Li, T., Zhang, M., Wang, J., Wang, T., Yao, Y., Zhang, X., Zhang, C. & Zhang, N. Thermosensitive Hydrogel Co-loaded with Gold Nanoparticles and Doxorubicin for Effective Chemoradiotherapy. *AAPS J.* **18**, 146–155 (2016).
98. Lund, T., Callaghan, M. F., Williams, P., Turmaine, M., Bachmann, C., Rademacher, T., Roitt, I. M. & Bayford, R. The influence of ligand organization on the rate of uptake of gold nanoparticles by colorectal cancer cells. *Biomaterials* **32**, 9776–9784 (2011).
99. Ohira, T. *et al.* In vitro and in vivo growth of B16F10 melanoma cells transfected with interleukin-4 cDNA and gene therapy with the transfectant. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120**, 631–635 (1994).
100. Calvet, C. Y., André, F. M. & Mir, L. M. The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. *PLOS ONE* **9**, e89644 (2014).
101. Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V. & Rafailovich, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* **4**, 120–137 (2010).

102. Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M. & Rafailovich, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Adipose Derived Stromal cells. *Nanotoxicology* **8**, 189–201 (2014).
103. Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A. & Xia, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett.* **9**, 1080–1084 (2009).
104. Verma, A. & Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **6**, 12–21 (2010).
105. Cruje, C. & Chithrani, B. D. Polyethylene Glycol Density and Length Affects Nanoparticle Uptake by Cancer Cells. *J. Nanomedicine Res.* **1**, (2014).
106. Vetten, M. & Gulumian, M. Differences in uptake of 14 nm PEG-liganded gold nanoparticles into BEAS-2B cells is dependent on their functional groups. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **363**, 131–141 (2019).
107. Hong, S., Leroueil, P. R., Janus, E. K., Peters, J. L., Kober, M.-M., Islam, M. T., Orr, B. G., Baker, J. R. & Banaszak Holl, M. M. Interaction of Polycationic Polymers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Nanoscale Hole Formation and Enhanced Membrane Permeability. *Bioconjug. Chem.* **17**, 728–734 (2006).
108. Leroueil, P. R., Berry, S. A., Duthie, K., Han, G., Rotello, V. M., McNerny, D. Q., Baker, J. R., Orr, B. G. & Banaszak Holl, M. M. Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers. *Nano Lett.* **8**, 420–424 (2008).
109. Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J. N., Bacri, J.-C. & Gazeau, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* **24**, 1001–1011 (2003).
110. Villanueva, A., Cañete, M., Roca, A. G., Calero, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., Morales, M. del P. & Miranda, R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* **20**, 115103 (2009).
111. M. Schaeublin, N., K. Braydich-Stolle, L., M. Schrand, A., M. Miller, J., Hutchison, J., J. Schlager, J. & M. Hussain, S. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* **3**, 410–420 (2011).
112. Zhu, Z.-J., Ghosh, P. S., Miranda, O. R., Vachet, R. W. & Rotello, V. M. Multiplexed Screening of Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14139–14143 (2008).
113. Stern, T., Kaner, I., Laser Zer, N., Shoval, H., Dror, D., Manevitch, Z., Chai, L., Brill-Karniely, Y. & Benny, O. Rigidity of polymer micelles affects interactions with tumor cells. *J. Controlled Release* **257**, 40–50 (2017).
114. Liu, H., Wang, J., Li, W., Hu, J., Wang, M. & Kang, Y. Cellular Uptake Behaviors of Rigidity-Tunable Dendrimers. *Pharmaceutics* **10**, 99 (2018).
115. Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H.-S., Watson, N., Chen, S., Irvine, D. J. & Stellacci, F. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat. Mater.* **7**, 588–595 (2008).
116. Li, Y., Li, X., Li, Z. & Gao, H. Surface-structure-regulated penetration of nanoparticles across a cell membrane. *Nanoscale* **4**, 3768–3775 (2012).
117. Liu, H., Doane, T. L., Cheng, Y., Lu, F., Srinivasan, S., Zhu, J.-J. & Burda, C. Control of Surface Ligand Density on PEGylated Gold Nanoparticles for Optimized Cancer Cell Uptake. *Part. Part. Syst. Charact.* **32**, 197–204 (2015).

118. Summers, H. D., Rees, P., Holton, M. D., Rowan Brown, M., Chappell, S. C., Smith, P. J. & Errington, R. J. Statistical analysis of nanoparticle dosing in a dynamic cellular system. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 170–174 (2011).
119. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. The Dynamic Cell. in *Molecular Cell Biology. 4th edition* (W. H. Freeman, 2000).
120. Kobayashi, K., Wei, J., Iida, R., Ijiri, K. & Niikura, K. Surface engineering of nanoparticles for therapeutic applications. *Polym. J.* **46**, 460–468 (2014).
121. Rinkenauer, A. C., Press, A. T., Raasch, M., Pietsch, C., Schweizer, S., Schwörer, S., Rudolph, K. L., Mosig, A., Bauer, M., Traeger, A. & Schubert, U. S. Comparison of the uptake of methacrylate-based nanoparticles in static and dynamic in vitro systems as well as in vivo. *J. Controlled Release* **216**, 158–168 (2015).
122. Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S. & Greiner, A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater. Today* **15**, 388–393 (2012).
123. van de Wetering, P., Cherng, J.-Y., Talsma, H., Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J. Controlled Release* **53**, 145–153 (1998).
124. Rungsardthong, U., Deshpande, M., Bailey, L., Vamvakaki, M., Armes, S. P., Garnett, M. C. & Stolnik, S. Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J. Controlled Release* **73**, 359–380 (2001).
125. Zhang, P. & Liu, W. ZnO QD@PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging. *Biomaterials* **31**, 3087–3094 (2010).
126. Long, X., Zhang, Z., Han, S., Tang, M., Zhou, J., Zhang, J., Xue, Z., Li, Y., Zhang, R., Deng, L. & Dong, A. Structural Mediation on Polycation Nanoparticles by Sulfadiazine to Enhance DNA Transfection Efficiency and Reduce Toxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 7542–7551 (2015).
127. Wang, M. & Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.* **62**, 90–99 (2010).
128. Bazak, R., Houry, M., Achy, S. E., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 769–784 (2015).
129. Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., Kelly, P. M., Åberg, C., Mahon, E. & Dawson, K. A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 137–143 (2013).
130. Aires, A., M. Ocampo, S., Cabrera, D., la Cueva, L. de, Salas, G., J. Teran, F. & L. Cortajarena, A. BSA-coated magnetic nanoparticles for improved therapeutic properties. *J. Mater. Chem. B* **3**, 6239–6247 (2015).
131. Chithrani, B. D., Stewart, J., Allen, C. & Jaffray, D. A. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **5**, 118–127 (2009).
132. Kumari, S., Ahsan, S. M., Kumar, J. M., Kondapi, A. K. & Rao, N. M. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433). *Sci. Rep.* **7**, 6602 (2017).
133. Sönnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O. & Mulvaney, P. Drastic Reduction of Plasmon Damping in Gold Nanorods. *Phys. Rev. Lett.* **88**, (2002).
134. Raschke, G., Kowarik, S., Franzl, T., Sönnichsen, C., Klar, T. A., Feldmann, J., Nichtl, A. & Kürzinger, K. Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. *Nano Lett.* **3**, 935–938 (2003).

135. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–2120 (2006).
136. Weinkauff, H. & Brehm-Stecher, B. F. Enhanced dark field microscopy for rapid artifact-free detection of nanoparticle binding to *Candida albicans* cells and hyphae. *Biotechnol. J.* **4**, 871–879 (2009).
137. Nam, J., Won, N., Jin, H., Chung, H. & Kim, S. pH-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13639–13645 (2009).
138. Sönnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., Plessen, G. von & Feldmann, J. Plasmon resonances in large noble-metal clusters. *New J. Phys.* **4**, 93–93 (2002).
139. Hu, M., Novo, C., Funston, A., Wang, H., Staleva, H., Zou, S., Mulvaney, P., Xia, Y. & Hartland, G. V. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J. Mater. Chem.* **18**, 1949–1960 (2008).
140. J. Marquis, B., A. Love, S., L. Braun, K. & L. Haynes, C. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* **134**, 425–439 (2009).
141. Kim, C., Agasti, S. S., Zhu, Z., Isaacs, L. & Rotello, V. M. Recognition-mediated activation of therapeutic gold nanoparticles inside living cells. *Nat. Chem.* **2**, 962–966 (2010).
142. Coulter, J. A. *et al.* Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2673–2685 (2012).
143. Sousa, A. A., Morgan, J. T., Brown, P. H., Adams, A., Jayasekara, M. P. S., Zhang, G., Ackerson, C. J., Kruhlak, M. J. & Leapman, R. D. Synthesis, Characterization, and Direct Intracellular Imaging of Ultrasmall and Uniform Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. *Small* **8**, 2277–2286 (2012).
144. Klein, N. D., Hurley, K. R., Feng, Z. V. & Haynes, C. L. Dark Field Transmission Electron Microscopy as a Tool for Identifying Inorganic Nanoparticles in Biological Matrices. *Anal. Chem.* **87**, 4356–4362 (2015).
145. Ko, W.-K., Heo, D. N., Moon, H.-J., Lee, S. J., Bae, M. S., Lee, J. B., Sun, I.-C., Jeon, H. B., Park, H. K. & Kwon, I. K. The effect of gold nanoparticle size on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *J. Colloid Interface Sci.* **438**, 68–76 (2015).
146. Seiter, J., Müller, E., Blank, H., Gehrke, H., Marko, D. & Gerthsen, D. Backscattered electron SEM imaging of cells and determination of the information depth. *J. Microsc.* **254**, 75–83 (2014).
147. Goldstein, A., Soroka, Y., Frušić-Zlotkin, M., Popov, I. & Kohen, R. High resolution SEM imaging of gold nanoparticles in cells and tissues. *J. Microsc.* **256**, 237–247 (2014).
148. Drescher, D., Giesen, C., Traub, H., Panne, U., Kneipp, J. & Jakubowski, N. Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS. *Anal. Chem.* **84**, 9684–9688 (2012).
149. Araujo, J. C., Téran, F. C., Oliveira, R. A., Nour, E. A. A., Montenegro, M. A. P., Campos, J. R. & Vazoller, R. F. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **52**, 429–433 (2003).
150. Piños, J., Mikmeková, Š. & Frank, L. About the information depth of backscattered electron imaging. *J. Microsc.* **266**, 335–342 (2017).
151. Oliver, C. Use of Immunogold with Silver Enhancement. in *Immunocytochemical Methods and Protocols* (eds. Oliver, C. & Jamur, M. C.) **588**, 311–316 (Humana Press, 2010).
152. Sadauskas, E., Danscher, G., Stoltenberg, M., Vogel, U., Larsen, A. & Wallin, H. Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **5**, 162–169 (2009).

153. Sykes, E. A., Dai, Q., Tsoi, K. M., Hwang, D. M. & Chan, W. C. W. Nanoparticle exposure in animals can be visualized in the skin and analysed via skin biopsy. *Nat. Commun.* **5**, 3796 (2014).
154. England, C. G., Huang, J. S., James, K. T., Zhang, G., Gobin, A. M. & Frieboes, H. B. Detection of Phosphatidylcholine-Coated Gold Nanoparticles in Orthotopic Pancreatic Adenocarcinoma using Hyperspectral Imaging. *PLOS ONE* **10**, e0129172 (2015).
155. Birbeck, M. S. C. Electron microscopy of melanocytes: The fine structure of hair-bulb premelanosomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **100**, 540–547 (1963).
156. Marks, M. S. & Seabra, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 738–748 (2001).
157. Klumperman, J. & Raposo, G. The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016857 (2014).
158. Cooper, G. M. Protein Sorting and Transport - The Endoplasmic Reticulum, Golgi Apparatus, and Lysosomes. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (2000).
159. Gao, H., Shi, W. & Freund, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9469–9474 (2005).
160. Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G. & Suresh, S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater.* **21**, 419–424 (2009).
161. Yuan, H., Li, J., Bao, G. & Zhang, S. Variable Nanoparticle-Cell Adhesion Strength Regulates Cellular Uptake. *Phys. Rev. Lett.* **105**, 138101 (2010).
162. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Controlled Release* **151**, 220–228 (2011).
163. Cupic, K. I., Rennick, J. J., Johnston, A. P. & Such, G. K. Controlling endosomal escape using nanoparticle composition: current progress and future perspectives. *Nanomed.* **14**, 215–223 (2019).
164. Selby, L. I., Cortez-Jugo, C. M., Such, G. K. & Johnston, A. P. R. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **9**, e1452 (2017).
165. Wong, A. S. M., K. Mann, S., Czuba, E., Sahut, A., Liu, H., C. Suekama, T., Bickerton, T., R. Johnston, A. P. & K. Such, G. Self-assembling dual component nanoparticles with endosomal escape capability. *Soft Matter* **11**, 2993–3002 (2015).
166. Trüttschler, A.-K., Bus, T., Reifarth, M., Brendel, J. C., Hoepfner, S., Traeger, A. & Schubert, U. S. Beyond Gene Transfection with Methacrylate-Based Polyplexes—The Influence of the Amino Substitution Pattern. *Bioconjug. Chem.* **29**, 2181–2194 (2018).
167. Jones, R. A., Cheung, C. Y., Fiona, E., STAYTON, P. S., HOFFMAN, A. S. & WILSON, M. R. Poly (2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem. J.* **372**, 65–75 (2003).
168. Cheung, C. Y., Murthy, N., Stayton, P. S. & Hoffman, A. S. A pH-Sensitive Polymer That Enhances Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer. *Bioconjug. Chem.* **12**, 906–910 (2001).
169. Liu, Q., Chen, J. & Du, J. Asymmetrical Polymer Vesicles with a “Stealthy” Outer Corona and an Endosomal-Escape-Accelerating Inner Corona for Efficient Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules* **15**, 3072–3082 (2014).
170. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug. Chem.* **30**, 263–272 (2019).
171. Hong, R., Han, G., Fernández, J. M., Kim, B., Forbes, N. S. & Rotello, V. M. Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1078–1079 (2006).

172. Smith, A. M., Marbella, L. E., Johnston, K. A., Hartmann, M. J., Crawford, S. E., Kozycz, L. M., Seferos, D. S. & Millstone, J. E. Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **87**, 2771–2778 (2015).
173. Chompoosor, A., Han, G. & Rotello, V. M. Charge Dependence of Ligand Release and Monolayer Stability of Gold Nanoparticles by Biogenic Thiols. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1342–1345 (2008).
174. Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. & Goldberg, M. W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* **113**, 1651–1659 (2000).
175. Wang, L., Liu, Y., Li, W., Jiang, X., Ji, Y., Wu, X., Xu, L., Qiu, Y., Zhao, K., Wei, T., Li, Y., Zhao, Y. & Chen, C. Selective Targeting of Gold Nanorods at the Mitochondria of Cancer Cells: Implications for Cancer Therapy. *Nano Lett.* **11**, 772–780 (2011).
176. Zhuang, Q., Jia, H., Du, L., Li, Y., Chen, Z., Huang, S. & Liu, Y. Targeted surface-functionalized gold nanoclusters for mitochondrial imaging. *Biosens. Bioelectron.* **55**, 76–82 (2014).
177. Gallud, A. *et al.* Cationic gold nanoparticles elicit mitochondrial dysfunction: a multi-omics study. *Sci. Rep.* **9**, 4366 (2019).
178. Salnikov, V., Lukyánenko, Y. O., Frederick, C. A., Lederer, W. J. & Lukyánenko, V. Probing the Outer Mitochondrial Membrane in Cardiac Mitochondria with Nanoparticles. *Biophys. J.* **92**, 1058–1071 (2007).
179. Chithrani, B. D. & Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **7**, 1542–1550 (2007).
180. Leduc, C., Jung, J.-M., Carney, R. R., Stellacci, F. & Lounis, B. Direct Investigation of Intracellular Presence of Gold Nanoparticles via Photothermal Heterodyne Imaging. *ACS Nano* **5**, 2587–2592 (2011).
181. Ivosev, V., Sanchez, G. J., Haidar, D. A., Bazzi, R., Roux, S. & Lacombe, S. Import and Export of Gold Nanoparticles: Exchange Rate in Cancer Cells and Fibroblasts. *bioRxiv* 092601 (2016).
182. Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N. & Irvine, D. J. Cytosolic Delivery of Membrane-Impermeable Molecules in Dendritic Cells Using pH-Responsive Core-Shell Nanoparticles. *Nano Lett.* **7**, 3056–3064 (2007).
183. Wang, T., Bai, J., Jiang, X. & Nienhaus, G. U. Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR Spectroelectrochemistry. *ACS Nano* **6**, 1251–1259 (2012).
184. Jiang, X., Röcker, C., Hafner, M., Brandholt, S., Dörlich, R. M. & Nienhaus, G. U. Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells. *ACS Nano* **4**, 6787–6797 (2010).
185. Kim, J. A., Åberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 62–68 (2012).
186. Cheng, N. N., Starkewolf, Z., Davidson, R. A., Sharmah, A., Lee, C., Lien, J. & Guo, T. Chemical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1950–1953 (2012).
187. Gilles, M., Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Quantification of hydroxyl radicals and solvated electrons produced by irradiated gold nanoparticles suggests a crucial role of interfacial water. *J. Colloid Interface Sci.* **525**, 31–38 (2018).
188. Khalil, T. T., Bazzi, R., Roux, S. & Fromm, M. The contribution of hydrogen peroxide to the radiosensitizing effect of gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **175**, 606–613 (2019).

189. Casta, R., Champeaux, J.-P., Sence, M., Moretto-Capelle, P. & Cafarelli, P. Comparison between gold nanoparticle and gold plane electron emissions: a way to identify secondary electron emission. *Phys. Med. Biol.* **60**, 9095–9105 (2015).
190. Missaoui, W. N., Arnold, R. D. & Cummings, B. S. Toxicological Status of Nanoparticles: What We Know and What We Don't Know. *Chem. Biol. Interact.* (2018).
191. Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J. Nanoparticle Res.* **12**, 2313–2333 (2010).
192. Yah, C. S. The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomed. Res.* **24**, (2013).
193. Jia, Y.-P., Ma, B.-Y., Wei, X.-W. & Qian, Z.-Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* **28**, 691–702 (2017).
194. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. & Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **15**, 897–900 (2004).
195. Surapaneni, S. K., Bashir, S. & Tikoo, K. Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Sci. Rep.* **8**, 12295 (2018).
196. Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, M. I., Pohl, C., Baldi, G., Unger, R. E. & Kirkpatrick, C. J. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part. Fibre Toxicol.* **6**, 18 (2009).
197. Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M. I., Unger, R. E., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P.-O. & Kirkpatrick, C. J. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 23 (2012).
198. Chompoosor, A., Saha, K., Ghosh, P. S., Macarthy, D. J., Miranda, O. R., Zhu, Z.-J., Arcaro, K. F. & Rotello, V. M. The Role of Surface Functionality on Acute Cytotoxicity, ROS Generation and DNA Damage by Cationic Gold Nanoparticles. *Small* **6**, 2246–2249 (2010).
199. Afssaps. *Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.* (2011).
200. Yilmaz, G., Demir, B., Timur, S. & Becer, C. R. Poly(methacrylic acid)-Coated Gold Nanoparticles: Functional Platforms for Theranostic Applications. *Biomacromolecules* **17**, 2901–2911 (2016).
201. Jones, R. A., Poniris, M. H. & Wilson, M. R. pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J. Controlled Release* **96**, 379–391 (2004).
202. Cao, B., Zheng, Y., Xi, T., Zhang, C., Song, W., Burugapalli, K., Yang, H. & Ma, Y. Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomed. Microdevices* **14**, 709–720 (2012).
203. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. Transport across Cell Membranes. in *Molecular Cell Biology. 4th edition* (W. H. Freeman, 2000).
204. Gao, F., Li, L., Liu, T., Hao, N., Liu, H., Tan, L., Li, H., Huang, X., Peng, B., Yan, C., Yang, L., Wu, X., Chen, D. & Tang, F. Doxorubicin loaded silica nanorattles actively seek tumors with improved anti-tumor effects. *Nanoscale* **4**, 3365–3372 (2012).
205. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1845**, 84–89 (2014).
206. Nativo, P., Prior, I. A. & Brust, M. Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2**, 1639–1644 (2008).
207. Glazer, E. S., Zhu, C., Hamir, A. N., Borne, A., Thompson, C. S. & Curley, S. A. Biodistribution and acute toxicity of naked gold nanoparticles in a rabbit hepatic tumor model. *Nanotoxicology* **5**, 459–468 (2011).

208. Vetten, M. A., Tlotleng, N., Tanner Rascher, D., Skepu, A., Keter, F. K., Boodhia, K., Koekemoer, L.-A., Andraos, C., Tshikhudo, R. & Gulumian, M. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 50 (2013).
209. Mortimer, M., Gogos, A., Bartolomé, N., Kahru, A., Bucheli, T. D. & Slaveykova, V. I. Potential of Hyperspectral Imaging Microscopy for Semi-quantitative Analysis of Nanoparticle Uptake by Protozoa. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 8760–8767 (2014).
210. Sabella, S., P. Carney, R., Brunetti, V., Ada Malvindi, M., Al-Juffali, N., Vecchio, G., M. Janes, S., M. Bakr, O., Cingolani, R., Stellacci, F. & Paolo Pompa, P. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **6**, 7052–7061 (2014).
211. Kolosnjaj-Tabi, J., Javed, Y., Lartigue, L., Volatron, J., Elgrabli, D., Marangon, I., Pugliese, G., Caron, B., Figuerola, A., Luciani, N., Pellegrino, T., Alloeyau, D. & Gazeau, F. The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
212. Wang, L., Li, Y.-F., Zhou, L., Liu, Y., Meng, L., Zhang, K., Wu, X., Zhang, L., Li, B. & Chen, C. Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1105–1114 (2010).
213. Anderson, M. E. & Meister, A. Glutathione monoesters. *Anal. Biochem.* **183**, 16–20 (1989).
214. Bean, T. A., Zhuang, W. C., Tong, P. Y., Eick, J. D. & Yourtee, D. M. Effect of esterase on methacrylates and methacrylate polymers in an enzyme simulator for biodurability and biocompatibility testing. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 59–63 (1994).
215. Yourtee, D. M., Smith, R. E., Russo, K. A., Burmaster, S., Cannon, J. M., Eick, J. D. & Kostoryz, E. L. The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: Kinetic and systematic evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.* **57**, 522–531 (2001).
216. Cretu, A., Gattin, R., Brachais, L. & Barbier-Baudry, D. Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly (ϵ -caprolactone) copolymers. *Polym. Degrad. Stab.* **83**, 399–404 (2004).
217. van de Wetering, P., Zuidam, N. J., van Steenberg, M. J., van der Houwen, O. A. G. J., Underberg, W. J. M. & Hennink, W. E. A Mechanistic Study of the Hydrolytic Stability of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate). *Macromolecules* **31**, 8063–8068 (1998).
218. Sée, V., Free, P., Cesbron, Y., Nativo, P., Shaheen, U., Rigden, D. J., Spiller, D. G., Fernig, D. G., White, M. R. H., Prior, I. A., Brust, M., Lounis, B. & Lévy, R. Cathepsin L Digestion of Nanobioconjugates upon Endocytosis. *ACS Nano* **3**, 2461–2468 (2009).
219. Zhu, Z.-J., Tang, R., Yeh, Y.-C., Miranda, O. R., Rotello, V. M. & Vachet, R. W. Determination of the Intracellular Stability of Gold Nanoparticle Monolayers Using Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 4321–4326 (2012).
220. Yedra, L., Eswara, S., Dowsett, D. & Wirtz, T. In-situ Isotopic Analysis at Nanoscale using Parallel Ion Electron Spectrometry: A Powerful New Paradigm for Correlative Microscopy. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
221. Hachtel, J. A., Huang, J., Popovs, I., Jansone-Popova, S., Keum, J. K., Jakowski, J., Lovejoy, T. C., Dellby, N., Krivanek, O. L. & Idrobo, J. C. Identification of site-specific isotopic labels by vibrational spectroscopy in the electron microscope. *Science* **363**, 525–528 (2019).
222. Rickard, M. A., Meyers, G. F., Habersberger, B. M., Reinhardt, C. W. & Stanley, J. J. Nanoscale chemical imaging of a deuterium-labeled polyolefin copolymer in a polyolefin blend by atomic force microscopy-infrared spectroscopy. *Polymer* **129**, 247–251 (2017).
223. Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J. & Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 223–232 (2003).

224. Shanler, M., Mason, A., Crocker, R., Vardaro, R., Crespi, C. L. & Stesser, D. *Automation of Pre-coated PAMPA Plates Improves Predictability, Reproducibility, and Efficiency*. (Corning).
225. Bicker, J., Alves, G., Fortuna, A. & Falcão, A. Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 409–432 (2014).
226. Prades, R., Guerrero, S., Araya, E., Molina, C., Salas, E., Zurita, E., Selva, J., Egea, G., López-Iglesias, C., Teixidó, M., Kogan, M. J. & Giralt, E. Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials* **33**, 7194–7205 (2012).
227. Song, Y., Du, D., Li, L., Xu, J., Dutta, P. & Lin, Y. In Vitro Study of Receptor-Mediated Silica Nanoparticles Delivery across Blood-Brain Barrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 20410–20416 (2017).

Chapitre 4. Comportement des nanoparticules sous irradiation

TABLE DES MATIÈRES

I. Effets de l'irradiation sur les NPs greffées polymères.....	189
A. Stabilité des NPs sous irradiation.....	190
B. Cytotoxicité des NPs irradiées	192
1. Au-polyméthacrylates.....	192
2. Doxorubicine greffée	193
II. Étude de la radiosensibilisation sous plusieurs types de rayonnements	195
A. Radiothérapie interne : iode 131	196
1. Étude <i>in vitro</i>	197
2. Étude <i>in vivo</i>	199
B. Radiothérapie externe : protons.....	201
C. Discussion	203
III. Méthode PIXE pour localiser les NPs	207
IV. Conclusions et perspectives.....	211
Bibliographie.....	214

Le chapitre précédent a permis de caractériser le comportement général des AuNPs greffées de polyméthacrylates en présence de systèmes biologiques, indépendamment de tout contexte d'irradiation. Puisque ces NPs ont d'abord été développées dans une perspective d'utilisation en radiothérapie, l'objectif était ensuite d'évaluer leur comportement sous rayonnement, en termes d'effets sur les cellules mais aussi dans une perspective de compréhension des mécanismes.

Nos NPs possèdent l'avantage d'être bien caractérisées, y compris en environnement biologique, et de présenter une excellente stabilité. Leur synthèse permet en outre d'obtenir des lots reproductibles. Ces qualités sont particulièrement recherchées pour établir des matériaux de référence. Le domaine de la radiosensibilisation des NPs manque en effet de tels matériaux, qui pourraient permettre de mettre au point des techniques standardisées d'évaluation des propriétés radiosensibilisantes. Cette lacune a déjà été identifiée dans la littérature,^{1,2} et un consortium européen avait proposé d'y répondre en 2017 dans le cadre du programme EMPIR (*European Metrology Programme for Innovation and Research*) de l'Union Européenne, avec un projet intitulé « *Metrological quantification of physical, chemical and biological radio-sensitising effects of high-Z nanomaterials* ».

Certaines de nos NPs ont ainsi été utilisées en tant que matériaux de référence dans le cadre de collaborations qui visaient à étudier le comportement sous irradiation de NPs à numéro atomique élevé. Plusieurs aspects ont été traités et vont être présentés dans ce chapitre. Nous avons tout d'abord observé les effets de l'irradiation sur nos NPs, puis des tests de radiosensibilisation ont été effectués pour plusieurs types de rayonnements. Enfin, nous avons étudié la possibilité de détecter les NPs *in situ* lors d'une irradiation grâce à une technique d'analyse qui repose sur l'émission de rayons X induite par les particules (*Particle-Induced X-ray Emission* en anglais, ou PIXE).

I. EFFETS DE L'IRRADIATION SUR LES NPS GREFFÉES POLYMÈRES

Comme cela a été évoqué dans le chapitre 1 (§ II.C), les mécanismes sous-jacents aux effets radiosensibilisants des NPs métalliques sont complexes, et pas encore complètement compris ni maîtrisés. De nombreuses études se sont intéressées à ces mécanismes mais peu ont analysé en amont l'effet des rayonnements sur la structure des NPs utilisées. Les rayonnements ionisants peuvent pourtant induire des modifications importantes, au niveau du cœur métallique comme des ligands organiques.

Concernant le cœur d'or, il a été montré que l'irradiation de nanoparticules et nanobâtonnets d'or par des ions légers (He^+) et lourds (Cu^{3+} , Xe^+) impactait fortement leur morphologie, notamment à travers des phénomènes de frittage, d'agglomération et de pulvérisation.^{3,4} Ces études n'ont pas été réalisées

avec des rayonnements et des conditions représentatives du contexte de la radiothérapie, mais elles montrent que des dégradations sont possibles. Zhang *et al.* sont les seuls, à notre connaissance, à avoir déjà étudié l'impact d'une irradiation sur des AuNPs dans une perspective d'application en radiothérapie.⁵ Ils ont montré un phénomène d'agrégation de leurs NPs après irradiation. Si aucune autre étude n'a depuis traité ce sujet, une revue récemment publiée par Briggs et Hattar, à propos de l'évolution des AuNPs sous irradiation, souligne la nécessité d'étudier ces aspects en détails dans le cadre de la radiosensibilisation.⁶

Outre le cœur d'or, les ligands organiques en surface des AuNPs peuvent également subir des dégradations lorsqu'ils sont exposés à des rayonnements ionisants, soit par l'action directe du rayonnement, soit par l'intermédiaire des espèces réactives produites par la radiolyse de l'eau. Dans le cas des polymères, plusieurs comportements peuvent être observés : scission, réticulation, production de petites molécules, et changements de composition ou de structure.⁷ Là encore, dans le domaine de la radiosensibilisation, aucune étude concernant la stabilité des ligands (polymères ou non) sous irradiation n'a été portée à notre connaissance.

A partir de ces observations, il apparaît que ces potentielles dégradations des NPs sous irradiation pourraient non seulement modifier leurs propriétés physico-chimiques, mais également générer des produits qui pourraient se révéler toxiques et donc contribuer à l'action biologique des NPs. Le fait que la radiothérapie soit très souvent appliquée par irradiations fractionnées souligne d'autant plus la nécessité d'étudier ces aspects. Les NPs pourraient en effet être dégradées lors de la première irradiation, et ainsi changer de comportement pour les suivantes. Avant tout test de radiosensibilisation, nous avons donc mené une étude de la stabilité de nos NPs sous irradiation, puis comparé la cytotoxicité des NPs irradiées et non irradiées.

A. STABILITÉ DES NPs SOUS IRRADIATION

Cette étude de stabilité a été réalisée au laboratoire dans le cadre de la thèse d'Aurélié Paquirissamy.⁸ Elle concerne uniquement les Au-P(HEMA-MAA) et Au-PMAA(10,6). Des solutions aqueuses de ces deux types de NPs ont été irradiées par des rayons gamma (voir détails en Annexe A) avant d'être analysées via plusieurs techniques telles que la RMN ¹H, la SEC, le SAXS et le SANS. Plusieurs doses ont été testées, entre 40 et 20000 Gy.

Les résultats n'ont montré aucune modification de la nature chimique des ligands polymères (données RMN non présentées), ni de la morphologie du cœur d'or (courbes SAXS visibles sur la Figure IV.1 a et b), et ce quelle que soit la dose appliquée. De plus, l'étude en SANS à 400 Gy a permis de mettre en évidence la conservation de la structure des couronnes polymères (Figure IV.1 c et d). Pour des doses

thérapeutiques (typiquement inférieures à 100 Gy), on s'attend donc à ce que les nano-objets ne subissent pas de dégradation majeure.

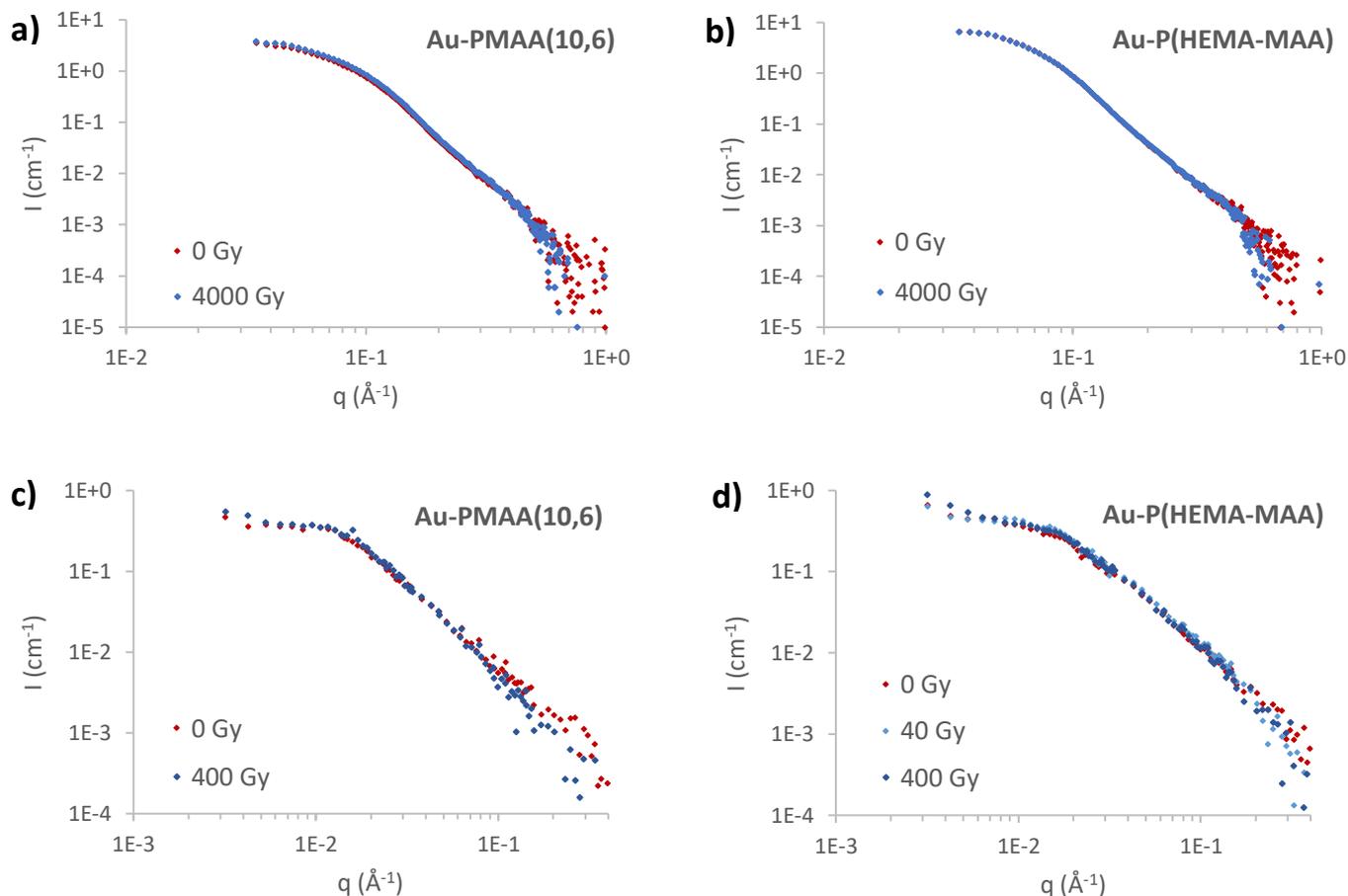


Figure IV.1 - Diagrammes de diffusion SAXS (a et b) et SANS (c et d) des NPs dans l'eau avant et après irradiation : (a et c) Au-PMAA(10,6) et (b et d) Au-P(HEMA-MAA)

Les analyses en SEC et SANS ont toutefois révélé des phénomènes de scission des ligands polymères pour des doses plus élevées (4000 et 20000 Gy, résultats non présentés), avec une localisation préférentielle aux extrémités des chaînes ou proche de la surface des AuNPs.^{8,9} Cela implique donc que des fragments de polymères sont libérés dans le milieu après irradiation. Ainsi, il n'est pas exclu que de tels phénomènes aient également lieu pour des doses inférieures, mais dans des proportions trop faibles pour les détecter via les techniques d'analyse utilisées. D'autre part, il est intéressant de noter que les localisations des scissions ne semblent pas réparties de la même manière pour les deux types de NPs étudiés : elles s'effectuent principalement proches du cœur pour les Au-P(HEMA-MAA), tandis que les coupures en bout de chaîne sont favorisées pour les Au-PMAA.⁹ L'impact de la nature de la couronne est à nouveau mis en évidence.

Cette étude, réalisée en amont de ce projet de thèse, a donc permis de démontrer l'absence de modifications notables de la structure de nos NPs sous irradiation. On pourrait poursuivre ces analyses en effectuant les irradiations dans un milieu plus représentatif du contexte biologique, tel que du milieu de culture. Cela permettrait de prendre en compte les interactions avec l'environnement des NPs. Des tests réalisés avec des rayons X produits sur synchrotron ont par exemple montré un fort effet stabilisant du milieu de culture. Une diminution progressive du signal des NPs a en effet été observée sous faisceau dans l'eau ultrapure, parfois dans le DPBS, mais jamais dans le DMEM, qu'il soit supplémenté ou non.

Bien que les Au-PMAA et Au-P(HEMA-MAA) aient montré de bonnes propriétés de stabilité sous irradiation, il est possible que des phénomènes fins n'aient pas été détectés (pulvérisation du cœur d'or en surface, libération de quelques fragments de polymères). Nous avons donc cherché à déterminer si les NPs irradiées génèrent une toxicité accrue au niveau des cellules.

B. CYTOTOXICITÉ DES NPS IRRADIÉES

La toxicité a été évaluée par un test MTT, en utilisant le même protocole que celui détaillé dans le chapitre 3 (§ IV.A). Les dilutions de NPs ont été préparées dans le DMEM supplémenté à partir de solutions mères de concentration en or équivalente pour toutes les NPs. La moitié des solutions mères ont été irradiées au préalable par des rayons gamma à une dose de 400 Gy. Afin d'évaluer l'impact de l'irradiation, des tests statistiques basés sur des modèles linéaires ont été réalisés.

Plusieurs NPs ont ainsi été comparées en termes de toxicité avant et après irradiation : les Au-PMAA(10,6) et Au-P(HEMA-MAA) dans un premier temps, puis les Au-PMAA-Dox.

1. Au-polyméthacrylates

Les résultats obtenus pour les Au-PMAA(10,6) et Au-P(HEMA-MAA) sont présentés respectivement sur la Figure IV.2 a et b.

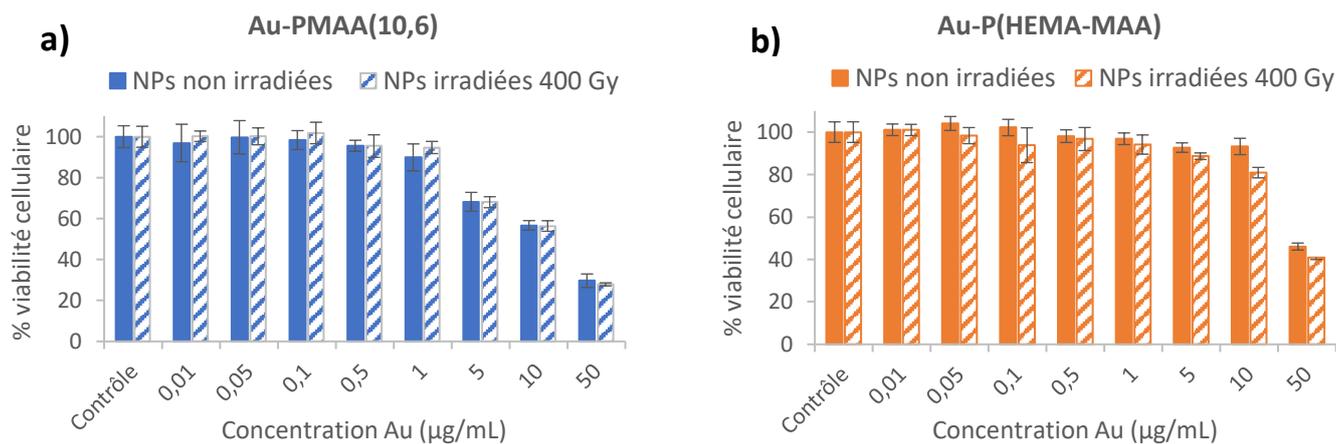


Figure IV.2 - Comparaison de la cytotoxicité des NPs non irradiées et irradiées à 400 Gy (a) Au-PMAA(10,6) et (b) Au-P(HEMA-MAA)

La toxicité des NPs irradiées semble très proche de celle des NPs équivalentes non irradiées, et ce pour les deux types étudiés. Cependant, d'après les tests statistiques effectués, une différence faible mais significative est observée (p -valeur $< 0,01$) dans le cas des Au-P(HEMA-MAA), pour lesquelles l'irradiation accroît légèrement la toxicité. Cette petite différence de comportement montre que les phénomènes générés par l'irradiation sont dépendants de la nature de la couronne polymère, confirmant ainsi les résultats obtenus lors de l'étude de stabilité des NPs sous irradiation.

La toxicité accrue des Au-P(HEMA-MAA) irradiées pourrait provenir des fragments de polymères libérés par les scissions. Contrairement au PMAA, pour lequel elles sont majoritaires en bout de chaînes, les scissions du P(HEMA-MAA) ont en effet lieu près du cœur, ce qui entraîne la libération d'une plus grande quantité de polymère. On peut aussi supposer que l'irradiation entraîne la formation d'autres produits persistants qui auraient un effet toxique, tels que des aldéhydes ou des peroxydes.¹⁰ Ces phénomènes de toxicité sont à distinguer des mécanismes chimiques de radiosensibilisation, qui reposent en partie sur la production de radicaux libres de faible durée de vie qui peuvent induire des dommages dans les cellules.

Cette étude de la toxicité des NPs irradiées montre que l'impact, même faible, de l'irradiation sur la structure des objets peut entraîner des différences de comportement vis-à-vis des cellules. Les effets observés sont ici minimes, mais puisqu'ils varient en fonction de la nature du polymère, il faudrait effectuer ce type d'étude de manière systématique avant d'utiliser des NPs en radiosensibilisation, notamment dans le cas d'objets plus complexes comportant des molécules fonctionnelles surgreffées. Nous avons ainsi étudié l'impact de l'irradiation sur la toxicité de nos Au-PMAA-Dox.

2. Doxorubicine greffée

Pour les NPs sur lesquelles une molécule fonctionnelle est greffée, l'irradiation peut entraîner au moins deux phénomènes : la libération de la molécule par rupture de certaines liaisons covalentes, ou alors

la dégradation de cette molécule. Pour un agent de chimiothérapie, le premier cas peut permettre une action toxique facilitée, mais également une circulation non désirée dans le corps. Dans le second cas, le risque est la perte de fonctionnalité de l'agent.

Plusieurs études ont déjà rapporté le greffage de la doxorubicine sur des AuNPs radiosensibilisantes.¹¹⁻¹⁴ Seuls Starkewolf *et al.* se sont intéressés à la stabilité sous irradiation de leurs systèmes constitués de AuNPs greffées d'ADN-thiols, eux-mêmes fonctionnalisés par de la doxorubicine. Leurs résultats tendent à montrer que les rayons X provoquent la scission de leurs brins d'ADN, ce qui permet de libérer la doxorubicine et d'ainsi augmenter la toxicité des objets sous irradiation.¹¹ En remplaçant l'ADN par des ligands PEG, le taux de relargage est nettement moins important, ce qui montre que le polymère est moins impacté par l'irradiation. Ils n'ont cependant pas étudié la toxicité de la doxorubicine après irradiation, que ce soit sous sa forme libre ou greffée, afin de déterminer l'effet de l'irradiation sur la molécule elle-même.

Varshney *et al.* s'étaient eux intéressés à la dégradation sous irradiation de plusieurs agents anticancéreux, dont la doxorubicine, afin de déterminer s'ils pouvaient être radiostérilisés.¹⁵ Ils ont montré une excellente stabilité de la molécule après irradiation aux rayons gamma, et n'ont détecté que de très faibles quantités des deux produits de dégradation identifiés. Il faut souligner que les doses utilisées dans cette étude sont de l'ordre de la dizaine de kGy, puisque les auteurs se placent dans le contexte de la radiostérilisation, et non de la radiothérapie.

Dans notre cas, nous avons cherché à déterminer si l'irradiation avait un impact sur nos objets Au-PMAA-Dox de façon indirecte uniquement, en comparant la toxicité des NPs irradiées et non irradiées. L'effet du greffage a également été évalué en effectuant le même test pour la doxorubicine libre en présence de Au-PMAA, qui nous sert ici de référence. Les résultats sont présentés sur la Figure IV.3.

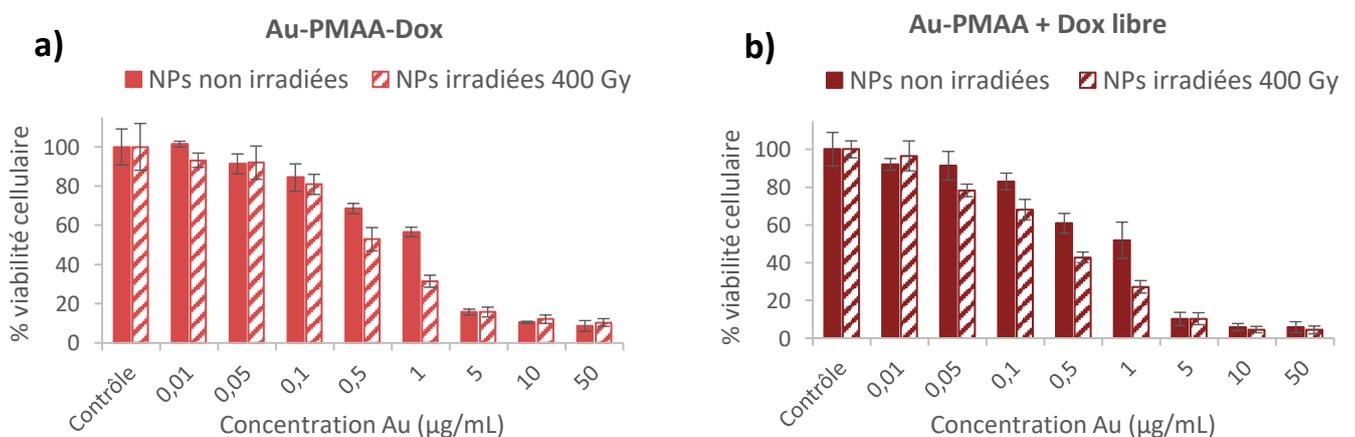


Figure IV.3 - Comparaison de la cytotoxicité des NPs non irradiées et irradiées à 400 Gy (a) Au-PMAA-Dox et (b) Au-PMAA + Dox libre

Pour les deux états de la doxorubicine (greffée et libre), on observe une petite augmentation de la toxicité après irradiation. Cet effet est confirmé par les tests statistiques effectués (p -valeur $< 0,001$). Il pourrait provenir des produits de dégradation de la doxorubicine. L'étude de Varshney *et al.* a démontré que ceux-ci sont présents en faible quantité, mais sans s'intéresser à leur éventuel effet toxique.¹⁵ Le fait que l'effet soit identique pour la molécule greffée et libre montre en outre que le greffage n'induit ni protection ni amplification vis-à-vis des effets de l'irradiation.

L'irradiation semble donc impacter la doxorubicine, avec pour conséquence d'accroître légèrement ses propriétés de cytotoxicité. Les tests effectués ici ne permettent pas de comprendre le mécanisme sous-jacent, mais des analyses chromatographiques pourraient par exemple être effectuées pour identifier d'éventuels produits de dégradation. Il serait également intéressant de mener la même expérience pour la doxorubicine seule, sans AuNPs, afin de déterminer si ces dernières ont un impact sur sa dégradation et/ou sa toxicité qui pourrait s'apparenter à un effet radiosensibilisant. Enfin, des doses inférieures pourraient être testées, afin de se rapprocher des valeurs utilisées en clinique.

De manière générale, l'ensemble de cette étude témoigne de l'importance des aspects de stabilité des NPs sous irradiation. Au-delà du contexte de la radiothérapie, la problématique se pose également dans le cadre de la stérilisation des NPs, l'irradiation étant un procédé communément utilisé. Ainsi, plusieurs études ont déjà montré que les doses appliquées pouvaient générer d'importantes modifications chez différents types de NPs, à la fois de nature organique et inorganique.^{16,17}

En ce qui concerne nos objets, l'étude a permis d'identifier, pour certains types de couronne, une toxicité légèrement accrue après irradiation. Ces effets seront à prendre en compte lors de l'analyse des tests de radiosensibilisation, que nous allons maintenant présenter.

II. ÉTUDE DE LA RADIOSENSIBILISATION SOUS PLUSIEURS TYPES DE RAYONNEMENTS

Comme cela a été mentionné dans le chapitre 1 (§ II.B), les AuNPs sont parmi les plus étudiées en radiosensibilisation. Dans le cadre d'études *in vitro* et *in vivo*, elles ont été combinées à plusieurs reprises avec différents types de rayonnements utilisés en radiothérapie externe : initialement des rayons X,¹⁸ puis des rayons gamma, des ions carbone, des protons, des électrons, et plus récemment des neutrons.^{19,20} A l'inverse, peu d'études se sont intéressées à leur application en radiothérapie interne.

Dans le cadre d'une collaboration avec Béatrice Cambien et Thierry Pourcher, du laboratoire TIRO (Transporteurs, Imagerie et Radiothérapie en Oncologie) de l'Université Nice Sophia Antipolis, notre objectif initial était de tester la possibilité d'utiliser les AuNPs en association avec la radiothérapie métabolique (injection systémique de sources radioactives), grâce à leur expertise dans le traitement des cancers de la thyroïde par utilisation d'iode radioactif. L'excellente stabilité de nos AuNPs greffées polymères a permis d'effectuer des tests *in vitro* mais aussi *in vivo*. Les tests de radiosensibilisation ont ensuite été étendus à un type de rayonnement externe, les protons, bénéficiant ainsi de l'infrastructure privilégiée dont dispose le Centre Antoine Lacassagne, centre de lutte contre le cancer situé à Nice, qui est un des trois centres de protonthérapie en France.

A. RADIOTHÉRAPIE INTERNE : IODE 131

L'iode 131 est un des radioisotopes les plus utilisés en radiothérapie métabolique. Lorsqu'il est injecté de manière systémique, il s'accumule naturellement dans la thyroïde, ce qui explique qu'il soit exploité pour traiter les cancers de la thyroïde.²¹ Il est le plus souvent utilisé en complément d'une ablation chirurgicale, afin d'éliminer les tissus thyroïdiens restants. Cependant, certaines tumeurs se révèlent réfractaires au traitement par l'iode (notamment les métastases), et cette résistance est à l'origine de la plupart des décès causés par ce type de cancer.²² L'utilisation de NPs radiosensibilisantes pourrait donc constituer une stratégie intéressante pour améliorer l'efficacité du traitement.

Comme cela vient d'être évoqué, l'application des AuNPs, et plus généralement de NPs métalliques radiosensibilisantes, en radiothérapie interne a été très peu étudiée dans la littérature. En brachythérapie (sources radioactives scellées), Ngwa *et al.* ont utilisé des sources d'iode 125 pour irradier des cellules et ont montré des dommages accrus au niveau de l'ADN lorsque les cellules sont incubées avec des AuNPs.²³ Plusieurs études de modélisation semblent elles aussi mettre en évidence un effet radiosensibilisant pour des cas similaires (AuNPs exposées à des sources d'iode 125).²⁴⁻²⁶ Une approche différente consiste à utiliser les NPs elles-mêmes comme sources radioactives. Chanda *et al.* ont par exemple utilisé avec succès des AuNPs constituées d'un isotope de l'or radioactif (¹⁹⁸Au) pour traiter des tumeurs de la prostate chez des souris.²⁷ Plus récemment, Laprise-Pelletier *et al.* ont développé des NPs cœur-coquille palladium-or radiomarquées avec du palladium 103.²⁸ Les simulations Monte-Carlo effectuées à partir des données de distribution intratumorale obtenues *in vivo* semblent indiquer un effet « auto-radiosensibilisant » dû à la présence d'or dans leurs NPs.²⁹

En radiothérapie métabolique, plusieurs publications récentes rapportent également l'utilisation de NPs métalliques conjuguées à des radioisotopes : des NPs de sulfure de cuivre contenant de l'iode 131,³⁰ des *nanoflakes* de disulfure de tungstène liées à du rhénium 188,³¹ ou encore des NPs contenant du hafnium et liées à du technétium 99m.³² Les deux dernières ont démontré *in vivo* un effet auto-

radiosensibilisant. Ils montrent en effet que les NPs métalliques produisent des particules secondaires chargées lorsqu'elles sont associées à l'élément radioactif, et supposent que cette émission secondaire est à l'origine de la toxicité accrue observée sur les tumeurs.³²

Si l'ensemble de ces études semble valider l'efficacité des NPs métalliques pour amplifier les effets des rayonnements émis par divers radioisotopes, aucune ne propose de stratégie pertinente pour le cancer de la thyroïde. Les NPs incorporant des radioisotopes vont en effet modifier la pharmacocinétique de ces derniers, en particulier la capacité à être captée par la thyroïde dans le cas de l'iode 131. Le ciblage sera donc moins efficace, et la probabilité d'impacter les tissus sains d'autant plus grande. De plus, la forte complexité des nano-objets décrits les rend difficilement transférables vers la clinique.

Dans cette étude, nous avons fait le choix d'une approche de radiosensibilisation de l'iode 131 par les NPs qui soit transposable en clinique, en combinaison avec le traitement de référence par injection systémique de l'iode. Les AuNPs et l'iode ont donc été administrés séparément. Ce type de stratégie est considéré comme cliniquement pertinent par les médecins nucléaires pour les cancers de la thyroïde. Découpler les NPs radiosensibilisantes et le radioisotope permet notamment de limiter les risques associés à la toxicité intrinsèque des NPs, et de générer au contraire une toxicité localisée, grâce au rayonnement émis par le radioisotope au niveau de la tumeur. Les NPs utilisées sont les Au-PMAA(10,6), qui sont peu toxiques, stables en milieux biologiques et sous irradiation, et qui ont une bonne capacité à diffuser dans la MEC. L'ensemble des expériences a été mené par Béatrice Cambien.

1. Étude *in vitro*

Pour évaluer l'effet radiosensibilisant des NPs en combinaison avec l'iode 131, des tests *in vitro* de clonogénicité ont d'abord été effectués. Le test clonogénique est la méthode la plus utilisée pour évaluer l'efficacité d'un traitement en radiobiologie.¹ Il a pour but de tester la capacité des cellules à se diviser et croître en colonies après une irradiation. Une cellule est en effet considérée comme morte radiobiologiquement si elle perd sa capacité à se reproduire. Le test clonogénique consiste à ensemercer un très faible nombre de cellules, de manière à ce qu'elles ne soient pas en contact les unes avec les autres. Après avoir réalisé les traitements voulus et l'irradiation, les cellules sont laissées en incubation pendant une dizaine de jours environ, pour qu'elles puissent se diviser et former des colonies. Celles-ci sont colorées au cristal violet puis dénombrées pour remonter à la quantité de cellules encore capables de proliférer, c'est-à-dire celles qui sont encore vivantes au sens radiobiologique du terme. Un exemple de résultat de test clonogénique est présenté sur la Figure IV.4.

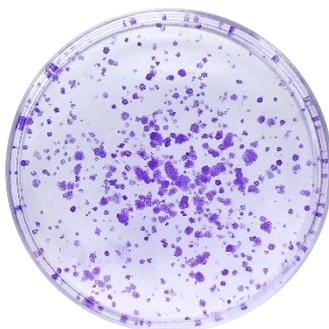


Figure IV.4 - Illustration du résultat typiquement obtenu pour un test clonogénique réalisé sur des B16F10

Les modèles cellulaires de tumeurs thyroïdiennes ayant une capacité réduite à capter l'iode, nous avons utilisé un modèle artificiel tumoral formé à partir de la lignée cellulaire B16F10 (mélanome murin), car les mélanomes sont connus pour leur radiorésistance, comme précisé dans le chapitre 3. Ne pouvant pas naturellement accumuler de l'iode, les cellules ont été transfectées par un gène qui leur permet d'exprimer le symporteur de l'iode nommé NIS (symporteur Na/I).³³ Des tests de captation à l'iode 131 ont permis de valider l'accumulation du radioisotope dans la lignée transfectée B16F10-NIS.³⁴

Pour les tests de clonogénicité, les cellules sont exposées pendant 2 heures à des solutions de NPs préparées à une concentration de 2,5 ou 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le milieu de culture. Les contrôles sont incubés avec du milieu de culture seul. Au terme de l'exposition, les solutions sont aspirées et trois lavages sont effectués avec du DPBS. Les cellules sont ensuite exposées pendant 4 heures à 0,2 MBq d'iode 131, en présence ou non de perchlorate de sodium, qui est un inhibiteur spécifique du NIS. En sa présence, les cellules n'internalisent donc pas le radioisotope. La croissance des colonies se fait ensuite pendant 9 à 14 jours. Chaque condition a été réalisée en triplicata. Le protocole détaillé est disponible en Annexe A. Les résultats sont présentés sur la Figure IV.5. Les tests statistiques ont été effectués avec le modèle ANOVA (*Analysis of variance*).

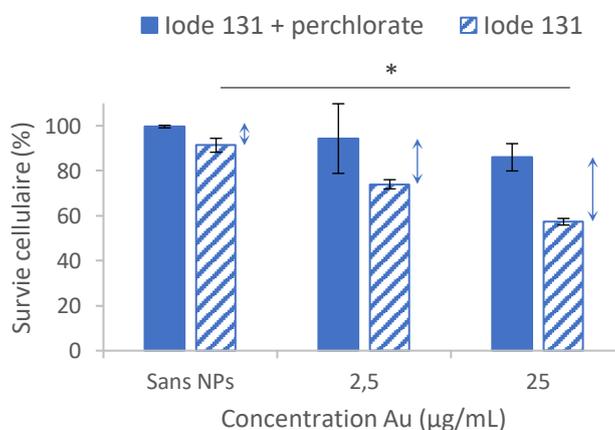


Figure IV.5 - Test de clonogénicité réalisé avec les Au-PMAA(10,6) sur les cellules B16F10-NIS pour une exposition à 0,2 MBq d'iode 131 (* $p < 0,05$)

En présence de perchlorate de sodium, on n'observe pas de toxicité significative des NPs par rapport au contrôle, ce qui montre l'absence d'effet radiosensibilisant lorsque l'iode n'est pas internalisé. Sans perchlorate, on observe au contraire une diminution de la survie cellulaire en présence des NPs, avec un effet croissant à mesure qu'on augmente la concentration en NPs. L'effet radiosensibilisant semble déjà présent à 2,5 µg/mL d'or, mais il est non significatif d'après les tests statistiques. Il le devient à 25 µg/mL.

Pour évaluer quantitativement cet effet radiosensibilisant, nous avons calculé un indicateur qui se définit de la manière suivante :

$$RER = \frac{SF_0^{NPs}}{SF_{irr}^{NPs}} / \frac{SF_0^{contrôle}}{SF_{irr}^{contrôle}} \quad (IV.1)$$

avec *SF* (*Surviving Fraction*) le pourcentage de survie cellulaire référencé sur la Figure IV.5. SF_0 correspond aux conditions non irradiées.

Cet indicateur correspond à une version normalisée du RER (*Radiation Enhancement Ratio*) défini par Subiel *et al.*,¹ afin de prendre en compte la toxicité initiale des NPs. L'effet radiosensibilisant est présent lorsque le RER est supérieur à 1. Ici, en considérant la condition avec perchlorate comme condition de référence, on obtient des valeurs de 1,2 et 1,4 respectivement pour les concentrations d'or de 2,5 et 25 µg/mL, ce qui confirme la radiosensibilisation observée qualitativement.

Cette étude *in vitro* montre donc que les Au-PMAA ont la capacité de potentialiser les effets toxiques de l'irradiation émise par l'iode 131. Il est intéressant de souligner que cet effet radiosensibilisant a été observé pour une faible dose de radioactivité, pour laquelle l'utilisation d'iode seul n'est pas efficace (Figure IV.5, condition sans NPs). Considérant les bons résultats obtenus, l'étude a été prolongée par des tests *in vivo*.

2. Étude *in vivo*

L'étude de radiosensibilisation *in vivo* a été réalisée chez la souris, sur des greffes de mélanome murin exprimant le symporteur NIS (B16F10-NIS). Là encore, des tests préliminaires ont été effectués pour vérifier leur capacité à capter l'iode 131.³⁴ Les tumeurs ont été générées chez la souris par injection sous-cutanée de B16F10-NIS. Pour les tests de radiosensibilisation, les souris ont été séparées en 4 groupes de 5 souris chacun : contrôle, Au-PMAA, iode 131, iode 131 + Au-PMAA. Les NPs ont été administrées 6 jours après l'implantation des tumeurs, par 3 injections intratumorales réparties à différents endroits de la tumeur. Environ 10 µL d'une solution contenant 1 mg/mL d'or ont ainsi été

injectés dans chaque tumeur. L'iode 131 a lui été administré le lendemain à une dose de 22 MBq, par voie intrapéritonéale*. Le protocole est schématisé sur la Figure IV.6.

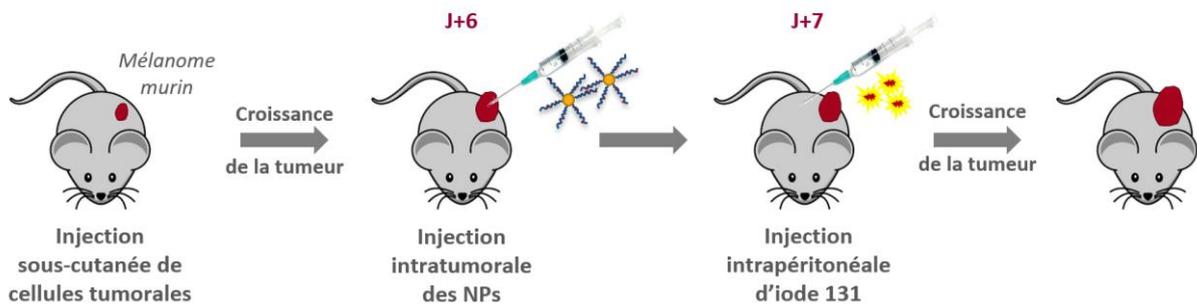


Figure IV.6 - Schématisation du protocole utilisé pour les tests de radiosensibilisation *in vivo* avec l'iode 131 et les Au-PMAA

La progression des tumeurs a été évaluée par la mesure de leur volume à différents temps post-implantation. Les évolutions obtenues pour les 4 groupes sont présentées sur la Figure IV.7. Les tests statistiques ont été effectués avec le modèle ANOVA.

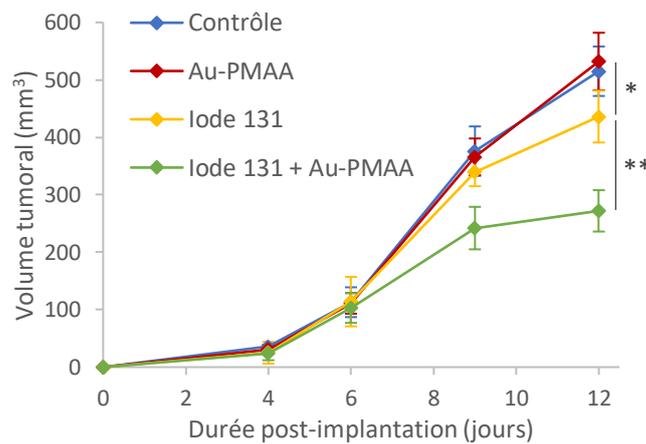


Figure IV.7 - Courbes de croissance des tumeurs post-implantation

On peut tout d'abord remarquer que le traitement avec les Au-PMAA seules n'a aucun impact sur la croissance de la tumeur, ce qui tend à montrer que les NPs ne sont pas toxiques lorsqu'elles sont administrées seules. Le traitement systémique à l'iode 131 entraîne quant à lui, après seulement 5 jours, une réduction significative ($p < 0,05$) de 15% du volume tumoral par rapport au contrôle. Lorsque les deux traitements sont combinés, on observe une forte atténuation de la croissance de la tumeur : 27% après seulement 2 jours, par rapport au traitement à l'iode 131 seul, et 34% après 5 jours ($p < 0,01$).

L'observation de coupes histologiques réalisées à partir des différentes tumeurs a également permis de mettre en évidence de plus larges zones de cellules nécrotiques pour les souris auxquelles les deux

* Voie intrapéritonéale : injection dans la cavité péritonéale, qui est l'espace situé entre les deux membranes qui tapissent l'intérieur de l'abdomen et qui recouvrent les organes tels que l'estomac, le foie, le pancréas, etc.

traitements ont été administrés.³⁴ Ces observations au niveau histologique confirment bien les résultats obtenus à partir des courbes de croissance tumorale.

Ainsi, cette étude *in vivo* montre un fort effet radiosensibilisant des Au-PMAA vis-à-vis de l'iode 131 dans le cas où les deux traitements sont administrés par deux voies différentes, et de manière non concomitante. Même si le modèle tumoral utilisé n'est pas thyroïdien, cette stratégie paraît prometteuse pour le traitement des cancers de la thyroïde, naturellement capables de capter l'iode. Toutefois, dans la mesure où le traitement à l'iode intervient après une ablation chirurgicale de la tumeur, l'administration intratumorale des AuNPs semble peu appropriée, et devra évoluer vers une injection systémique. Nous avons par exemple envisagé de greffer la thyroïdostimuline (*thyroid-stimulating hormone* en anglais, ou TSH) sur nos NPs, afin d'assurer un ciblage des tissus thyroïdiens résiduels (métastatiques ou non).^{35,36}

Cette étude constitue donc une première preuve de concept que ce type de traitement combiné pourrait permettre de prendre en charge les tumeurs thyroïdiennes réfractaires à l'iode, mais aussi, plus généralement, de réduire les doses utilisées, et donc la toxicité associée aux organes à risque (glandes salivaires, estomac, intestins, voies urinaires).³⁷

Ces dernières années, l'utilisation d'iode 131 est également explorée pour des tumeurs extra-thyroïdiennes, après induction de l'expression du symporteur NIS, en particulier pour les cancers du sein et les cancers urologiques.³⁸ Toutefois, l'efficacité du traitement est limitée par la capacité réduite de ces tumeurs à capter l'iode et à l'accumuler de manière durable, même après expression du NIS.³⁹ Les cellules thyroïdiennes sont en effet capables d'organifier l'iode, c'est-à-dire de l'incorporer dans la production des hormones thyroïdiennes, ce qui permet de maintenir l'iode dans la thyroïde pendant une durée prolongée. Les tumeurs extra-thyroïdiennes n'ayant pas cette capacité, les doses qu'elles reçoivent sont donc assez faibles. Sensibiliser les tumeurs aux radiations via l'utilisation de radiosensibilisants pourrait ainsi être une opportunité pour améliorer cette stratégie.

B. RADIOTHÉRAPIE EXTERNE : PROTONS

Afin de comparer différents types de rayonnements, l'étude de radiosensibilisation a ensuite été étendue à une modalité de radiothérapie externe, ici les protons. Comme cela a été évoqué dans le chapitre 1 (§ II.A.1), la protonthérapie a l'avantage de permettre un dépôt de dose important et localisé (pic de Bragg), sans irradier les tissus en aval (voir Figure I.4 du chapitre 1). Les irradiations ont pu être effectuées sur un irradiateur médical, le cyclotron MEDICYC situé au CAL à Nice, qui délivre une énergie de 65 MeV. L'ensemble des expériences ont été réalisées en collaboration avec Béatrice Cambien.

Seule une étude *in vitro* a été menée, via des tests de clonogénicité réalisés sur les cellules B16F10. Elles ont été exposées pendant 4 heures à des solutions de NPs de Au-PMAA(10,6) préparées à 0,06, 0,6 ou 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'or, ou bien de Au-PMAA-Dox à 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'or. Deux lavages ont ensuite été effectués avec du DPBS, avant d'incuber les cellules dans du milieu de culture seul. Elles ont ensuite été transportées jusqu'au CAL où elles ont été irradiées sur le cyclotron MEDICYC à des doses de 0,25 et 0,75 Gy. La configuration a été choisie de manière à ce que les cellules se trouvent au centre du pic de Bragg. Les résultats sont visibles sur la Figure IV.8. Ils correspondent à la moyenne de deux campagnes de tests, effectuées dans les mêmes conditions. Dans chaque campagne, les contrôles (sans NPs) ont été réalisés en cinq exemplaires, et les conditions exposées aux NPs en trois exemplaires.

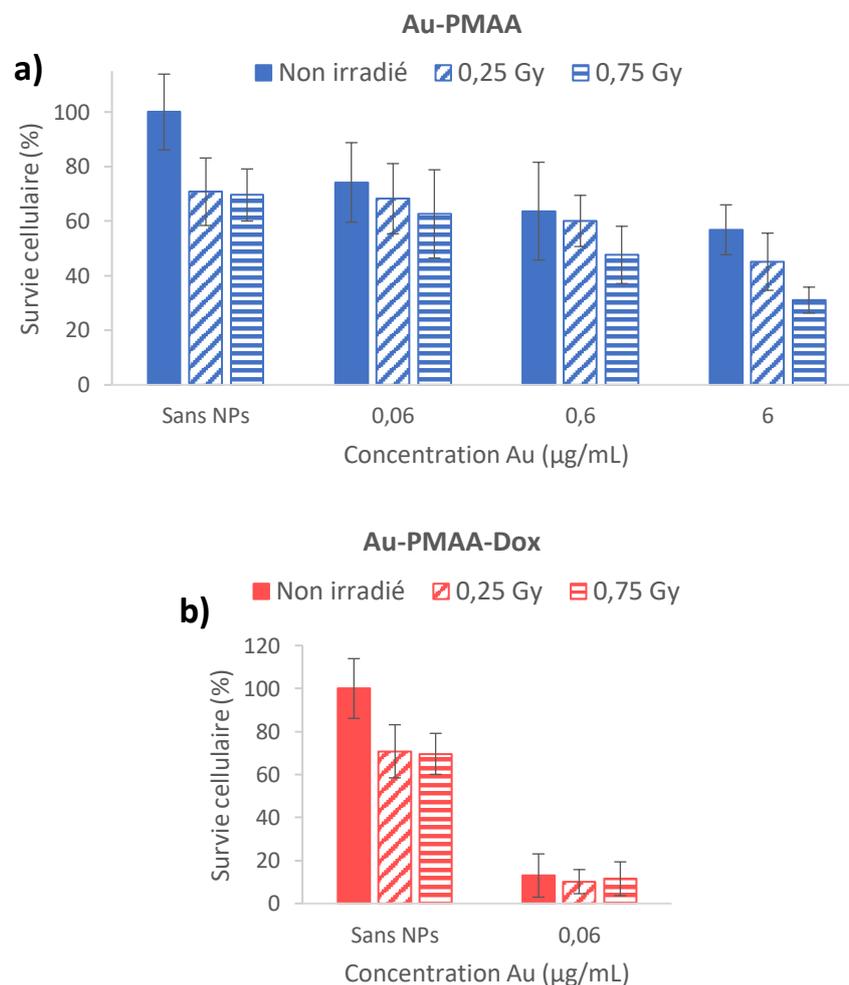


Figure IV.8 - Tests de clonogénicité réalisés sur les cellules B16F10 pour une exposition à des protons 65 MeV - 3 doses testées : 0, 0,25 et 0,75 Gy
(a) Au-PMAA et (b) Au-PMAA-Dox

On observe tout d'abord une forte toxicité intrinsèque des Au-PMAA, et ce pour les 3 concentrations testées. Ce résultat est assez inattendu puisqu'il ne correspond pas à ceux présentés dans le chapitre 3 sur la lignée L929 (§ IV.B), ni surtout à ceux visibles sur la Figure IV.5. Cette toxicité initiale limite la possibilité d'observer d'un effet radiosensibilisant additif puisqu'on perd en sensibilité. Si on calcule

les RER correspondant aux différentes conditions (Tableau IV.1), on n'obtient d'ailleurs pas de valeur supérieure à 1, excepté dans le cas où la concentration et la dose sont les plus fortes (6 µg/mL Au / 0,75 Gy). Seule cette condition semble donc montrer un léger effet radiosensibilisant, peu significatif au vu des écarts-types observés.

Dans le cas des Au-PMAA-Dox, la toxicité intrinsèque des objets est bien trop forte pour pouvoir observer un effet radiosensibilisant (Figure IV.8b). Il faudrait tester des concentrations plus faibles. Cela permet toutefois de valider l'effet toxique de la doxorubicine greffée sur des cellules cancéreuses. Par la suite, l'objectif sera de déterminer si l'association entre des NPs radiosensibilisantes et un agent de chimiothérapie peut générer une toxicité accrue par un effet de synergie entre les deux mécanismes d'action. Comme dit précédemment, de tels objets ont déjà été rapportés à plusieurs reprises dans la littérature dans le cas de AuNPs associées à la doxorubicine. Si les auteurs concluent sur une synergie, il apparaît en réalité que leurs résultats ne montrent au mieux qu'une simple addition d'effets toxiques.^{13,14} Cela souligne la difficulté à évaluer l'effet radiosensibilisant, et l'importance d'utiliser des indicateurs fiables, comme souligné par Subiel *et al.* dans leur revue.¹

Tableau IV.1 - Résumé des RER (Radiation Enhancement Ratio) calculés à partir des tests de clonogénicité en protons (Figure IV.8)

Concentration Au (µg/mL)	RER			
	Au-PMAA		Au-PMAA-Dox	
	0,25 Gy	0,75 Gy	0,25 Gy	0,75 Gy
0,06	0,8	0,8	0,9	0,8
0,6	0,8	0,9	/	/
6	0,9	1,3	/	/

C. DISCUSSION

Si les Au-PMAA ont montré de très bons résultats lorsqu'elles étaient associées à l'iode 131, les tests réalisés sous irradiation de protons semblent moins prometteurs. Ces différences de comportement vont maintenant être discutées.

Les résultats mitigés obtenus en protonthérapie s'expliquent d'abord par des considérations pratiques liées aux conditions de l'expérience. Il est ainsi probable que la toxicité inhabituelle des Au-PMAA provienne d'une combinaison de facteurs pouvant sensibiliser les cellules :

- A cause des contraintes imposées par la géométrie de MEDICYC (faisceau horizontal) et par la quantité limitée de NPs dont nous disposions, nous avons cultivé les cellules dans des flacons à la verticale. La paroi utilisée n'était donc pas celle prévue par le fabricant (Figure IV.9), ce qui pourrait avoir impacté la croissance des cellules.

- Les cellules ont dû être transportées jusqu'au centre du CAL pour être irradiées, ce qui a impliqué une durée hors incubateur de 2h30-3h, sans compter les mouvements qu'elles ont subis durant le trajet. L'ensemble de ces événements a pu les fragiliser.
- Pour l'irradiation, les flacons ont été placés à l'horizontale (Figure IV.9). Les cellules se sont donc retrouvées sans milieu environnant pendant quelques minutes, et notamment pendant l'irradiation. Là encore, il est possible qu'une fragilité des cellules en ait résulté.

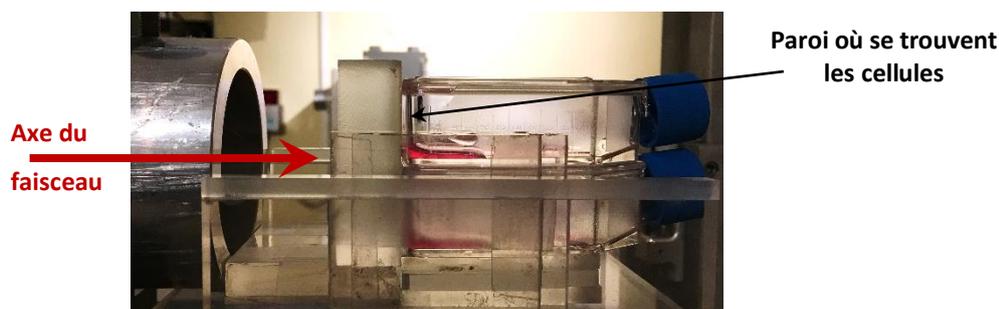


Figure IV.9 - Configuration des irradiations réalisées au CAL sur MEDICYC

Même si les contrôles ont subi les mêmes conditions, l'addition de tous ces phénomènes a pu rendre les cellules plus sensibles à la présence intracellulaire de NPs. L'ensemencement d'une faible densité cellulaire dans les échantillons, imposée par les conditions des tests clonogéniques, implique en outre un ratio NPs/cellules très élevé lors de la phase d'exposition aux NPs, ce qui peut également constituer un stress pour les cellules, en amont du transport et de l'irradiation. La toxicité observée pour les Au-PMAA pourrait donc provenir en partie de l'ensemble des conditions de l'expérience. L'expérience pourra donc être répétée par la suite dans des conditions plus optimisées, afin de s'affranchir de cette toxicité.

De manière plus générale, au-delà de cette toxicité des NPs, on peut se demander si d'autres facteurs peuvent expliquer un effet radiosensibilisant limité. Notamment, il est possible que les quantités d'or internalisées soient un peu faibles. En se basant sur les résultats de captation cellulaire des Au-PMAA(10,6), présentés dans le chapitre 3 (§ III.B), la masse d'or mesurée est de l'ordre de 10^{-2} pg par cellule, et ce pour toutes les concentrations testées. Même si les conditions d'incubation ne sont pas identiques (temps d'exposition inférieur et rapport NPs/cellules plus élevé dans le cas de la clonogénicité), on peut supposer que la quantité d'or ne sera pas très différente, notamment parce qu'une saturation progressive semblait être observée lorsqu'on augmentait la concentration (chapitre 3 § III.B.1). Si l'on compare cette valeur aux publications qui ont montré *in vitro* un effet radiosensibilisant de AuNPs en protonthérapie^{40,41} ou en radiothérapie,^{42,43} elles rapportent une quantité 10 à 1000 fois plus élevée que dans notre cas. Les études de modélisation qui mettent en jeu une irradiation sous protons utilisent également des proportions d'or supérieures.⁴⁴⁻⁴⁶ Ainsi, il est

possible que la faible quantité d'or internalisée ici limite la possibilité d'observer de la radiosensibilisation. Le léger effet observé à 0,75 Gy et 6 µg/mL d'or semble donc assez encourageant.

D'autre part, la présence des ligands polymères pourrait défavoriser l'observation d'un effet radiosensibilisant. Plusieurs études, à la fois expérimentales et de simulation, ont en effet montré que la fonctionnalisation des AuNPs par des petites molécules ou des polymères diminuait la production d'électrons secondaires de basse énergie.⁴⁷⁻⁴⁹ Gilles *et al.* ont également observé une réduction du nombre de radicaux libres générés lorsque les AuNPs étaient recouvertes de PEG simplement adsorbés ou greffés.⁵⁰ Les auteurs font l'hypothèse que les ligands peuvent intervenir au niveau de trois étapes distinctes du mécanisme : piéger les électrons secondaires avant que ceux-ci puissent réagir avec l'eau pour former des radicaux libres, diminuer la réactivité particulière de l'interface eau/NP, qui explique le *chemical enhancement* des NPs sous irradiation (voir chapitre 1, § II.C.2), et enfin piéger les radicaux libres générés. Haume *et al.* observent eux aussi, par simulation, une réduction du nombre de radicaux produits en présence de ligands.⁴⁸ Ils notent cependant que l'effet sera atténué dans le cas de couronnes hydrophiles peu denses, car la présence d'eau à la surface joue un rôle majeur. La faible densité de greffage des ligands PMAA calculée à partir de l'étude de neutrons (chapitre 2 § III.C), ainsi que le caractère hydrophile du polymère, pourraient donc limiter dans notre cas l'effet délétère de la couronne sur la radiosensibilisation des AuNPs.

Ces différentes considérations soulignent d'autant plus les très bons résultats obtenus avec l'iode 131. En raisonnant du point de vue des mécanismes de radiosensibilisation, l'iode semble en effet présenter différentes propriétés avantageuses pour une combinaison avec des AuNPs.

Tout d'abord, le type d'irradiation joue probablement un rôle. L'iode 131 est un radioisotope qui subit des désintégrations β^- ; il émet principalement des particules β^- d'énergie maximale 606 keV et des rayons γ de 364 keV.⁵¹ Or, Lin *et al.* ont montré par modélisation Monte-Carlo que l'irradiation de AuNPs par des photons de 250 kVp[†] générerait des dépôts de dose plus importants que lors d'une irradiation par des photons de 6 MV ou des protons, avec un accroissement de la tendance à mesure qu'on s'éloigne de la NP (Figure IV.10).⁵² Les auteurs expliquent cette différence par une portée plus importante des électrons secondaires produits. Ainsi, à 1 µm de la surface de la NP, la dose produite lors d'une irradiation par des photons 250 kVp est respectivement 2 fois et 8 fois supérieure à celle produite lors d'une irradiation par des photons 6 MV et des protons. On s'attend donc à une portée de l'effet radiosensibilisant des NPs bien plus grande dans le cas de l'iode 131 (photons 364 keV). Dans

[†] kVp : *kilovolt peak*, cette valeur correspond à la tension appliquée au générateur de rayons X. Elle définit l'énergie maximale des rayons X produits. L'énergie du faisceau incident est distribuée entre 0 et cette valeur maximale.

des conditions où la quantité de NPs internalisées est relativement faible, comme ici, cette différence de portée peut permettre de propager les dommages à des zones de la cellule, voire à d'autres cellules, qui ne contiennent pas de NPs, ou bien qui n'ont pas été impactées directement par le rayonnement.

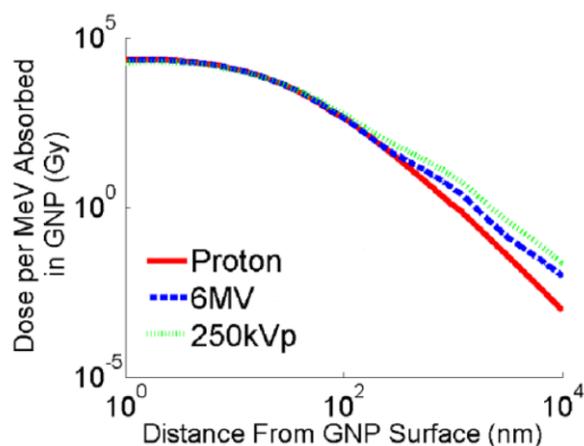


Figure IV.10 - Profils de dépôt de dose généré par une AuNP par MeV d'énergie absorbé : comparaison de faisceaux de protons, photons 6 MV et photons 250 kVp ⁵²

Les particules β^- émises par l'iode 131 peuvent également jouer un rôle. En effet, ces électrons ont une portée d'environ 1 mm dans les tissus mous,³⁷ ce qui permet à l'iode d'impacter les cellules et tissus environnants, même sans avoir capté d'iode. C'est ce qu'on appelle le *cross-fire effect*.⁵³ Cet effet permet d'obtenir un dépôt de dose plus homogène, et devrait permettre d'atteindre des AuNPs internalisées par des cellules n'ayant pas capté d'iode, renforçant ainsi l'efficacité globale de la radiosensibilisation.

Outre ces deux avantages de l'irradiation par l'iode 131, on peut également formuler l'hypothèse d'une interaction entre l'iode et les AuNPs qui favoriserait l'effet radiosensibilisant. Plusieurs études ont en effet montré que l'iode (sous forme de diiode ou d'iodure) a une forte affinité pour l'or et qu'il est capable de se chimisorber sur des surfaces d'or.⁵⁴⁻⁵⁸ En particulier, divers auteurs ont utilisé des AuNPs marquées avec de l'iode 125 chimisorbé à leur surface.⁵⁹⁻⁶¹ Walsh a récemment montré que ce processus de chimisorption s'effectue même en présence de ligands thiols, et qu'il est stable dans le DMEM. Une désorption est toutefois observée en présence d'iodure de potassium ou de thiols, suggérant une dynamique d'échanges de ligands en surface des AuNPs.⁶¹ Ainsi, on peut supposer que l'iode 131 est capable de se chimisorber sur les AuNPs, ce qui favoriserait la probabilité d'interaction des NPs avec les rayonnements émis par le radioisotope, et amplifierait l'effet radiosensibilisant. Le fait qu'on n'observe pas *in vitro* d'effet radiosensibilisant lorsque l'iode 131 n'est pas internalisé par les cellules (présence de perchlorate de sodium), malgré la longue portée de ses effets, semble aussi aller dans ce sens.

Jusqu'à présent, peu d'articles expérimentaux se sont intéressés à la problématique de l'impact de la nature du rayonnement sur l'effet radiosensibilisant.⁶²⁻⁶⁴ Ce sujet semble pourtant clé pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Ici, les deux études de radiosensibilisation menées avec les Au-PMAA(10,6) ont permis de souligner les différences pouvant exister entre deux types d'irradiation, mais également entre deux modalités de radiothérapies. En particulier, considérant les bons résultats obtenus en radiothérapie interne malgré une captation d'or limitée, l'hypothèse d'une synergie particulière entre l'iode 131 et les AuNPs semble crédible. L'étude *in vivo* valide en tout cas la possibilité d'adopter une telle stratégie pour améliorer le traitement du cancer de la thyroïde.

III. MÉTHODE PIXE POUR LOCALISER LES NPS

Dans le cadre de la radiosensibilisation, il serait intéressant de pouvoir détecter les NPs dans la tumeur, mais aussi de les quantifier et les localiser, afin de suivre leur accumulation et leur répartition. Nous avons étudié la possibilité d'effectuer ces analyses de manière non invasive et *in situ*, directement lors d'un traitement par protonthérapie, en exploitant la fluorescence X émise par les NPs irradiées (technique du PIXE - *Particle-Induced X-ray Emission*). Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet NanoPIXE, initié en 2016 et mené en collaboration avec Béatrice Cambien et Thierry Pourcher, du laboratoire TIRO, et Hermine Lemaire, Adrien Stolidi, Hugues Paradis et Dominique Chambellan, du laboratoire LIST au CEA Saclay. Des radiothérapeutes et radiophysiciens du CAL ont également été associés au projet, ainsi que des chercheurs de Subatech/Arronax à Nantes.

Le PIXE est une technique d'analyse multi-élémentaire, utilisable pour tous les éléments dont le numéro atomique est supérieur à 10 (en-dessous, énergies faibles difficiles à détecter). En biologie, elle est souvent appliquée en microfaisceau (méthode microPIXE) pour réaliser des cartographies chimiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire.⁶⁵ Dans le domaine des NPs, la technique a ainsi permis de quantifier, cellule par cellule, la masse d'or internalisée, avec une limite de détection de 0,5 pg environ.⁶⁶ Un des avantages est de pouvoir déterminer l'hétérogénéité de captation entre les différentes cellules.^{67,68} Le microPIXE a également été utilisé *in vivo*, pour étudier la distribution de NPs de gadolinium après une injection intratumorale.⁶⁹

L'ensemble de ces études montre qu'il est possible d'utiliser la technique du PIXE pour quantifier des NPs, voire les localiser, dans des échantillons biologiques. Cependant, les mesures sont toutes réalisées sur des échantillons de très faible épaisseur (monocouches de cellules,^{67,68} ou sections de 50 µm d'épaisseur dans le cas des tumeurs⁶⁹). De plus, les énergies des faisceaux utilisés sont bien plus faibles que celles mises en jeu en protonthérapie (quelques MeV au lieu de plusieurs dizaines voire centaines de MeV). Ces conditions ne sont donc pas représentatives d'une mesure *in situ* dans le cadre d'un

traitement en protonthérapie. Notre objectif était ici de tester la possibilité d'utiliser le PIXE sur des échantillons plus épais, représentatifs d'un environnement tumoral, et sous des irradiations de type clinique.

Les échantillons préparés, appelés fantômes, sont constitués d'un gel d'agarose vierge au centre duquel se situe une zone constituée du même gel et contenant des AuNPs (Figure IV.11). Le gel d'agarose est un modèle réaliste de tissu biologique.⁷⁰ La concentration d'agarose a ici été choisie assez élevée (5% en masse) pour empêcher la diffusion des AuNPs au-delà de la zone définie et ainsi conserver une forte concentration localisée. Plusieurs concentrations de NPs ont été testées au cours du projet. Le diamètre de la zone centrale a lui été adapté de manière à être inférieur à celui du faisceau utilisé.

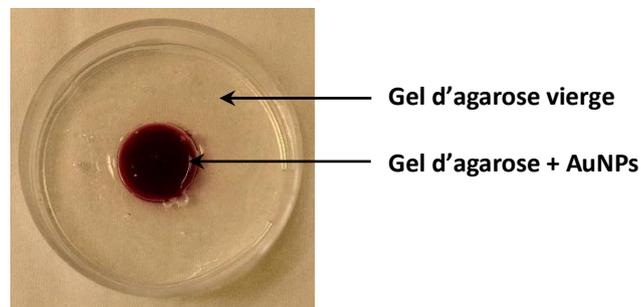


Figure IV.11 - Fantôme contenant des AuNPs typiquement utilisé pour les essais de PIXE

Plusieurs campagnes de mesures ont été réalisées sur trois cyclotrons, à différentes énergies :

- Arronax - 67,5 MeV
- Centre Antoine Lacassagne - 10 et 62 MeV
- Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie - 62 et 230 MeV

Au cours de ces campagnes, plusieurs configurations et détecteurs ont été testés. La détection des pics de fluorescence de l'or s'est révélée très ardue. Seules les mesures à 230 MeV (description des paramètres en Annexe A) ont en effet permis d'obtenir un signal détectable sur les fantômes contenant les AuNPs (Figure IV.12). Le blanc correspond à une mesure sans échantillon.

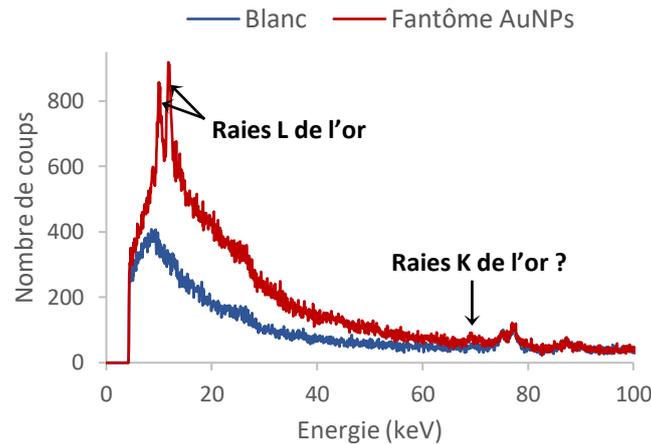


Figure IV.12 - Spectres PIXE émis pour une irradiation par des protons 230 MeV - Acquisition de 600 sec par un détecteur tellurure de cadmium - Comparaison du blanc et du fantôme contenant les AuNPs (7 mg Au)

Sur le spectre du fantôme, on peut tout d'abord noter un fort bruit de fond aux basses énergies, qui provient vraisemblablement du gel d'agarose et qui gêne la détection des raies L de l'or (9,7 et 11,4 keV). Malgré ce signal indésirable, les deux raies L sont bien visibles sur ce spectre, démontrant la présence d'or. La présence des raies K (68,8 et 78,0 keV) est quant à elle plus incertaine. De manière générale, les raies L de l'or ont toujours été mieux détectées que les K, même sur des feuilles d'or pur. Ce résultat est confirmé par la littérature.⁷¹ Il s'explique en partie par la section efficace d'ionisation, qui est 10 à 100 fois plus élevée pour les couches L que pour les couches K à l'énergie considérée. Cette différence doit cependant être légèrement compensée par une plus forte atténuation des photons de la raie L.

Les résultats obtenus semblent montrer les limites de la technique PIXE pour réaliser des mesures *in situ* sur tumeur. Pour réussir à détecter l'or, il a en effet fallu augmenter considérablement sa concentration dans la zone centrale, jusqu'à environ 10 mg/mL d'or pour l'échantillon correspondant à la Figure IV.12. Cette valeur n'est absolument pas représentative des concentrations mises en jeu en nanomédecine. D'autre part, l'épaisseur du fantôme utilisé n'est que de quelques millimètres, tandis qu'une analyse *in situ* impliquera nécessairement une plus grande épaisseur de tissu. Les raies L de l'or étant fortement atténuées (7% transmis pour 5 mm d'eau⁷²), il est peu probable qu'on puisse encore les détecter. Ainsi, seules d'importantes améliorations au niveau des performances (meilleur détecteur, configuration optimisée) pourraient permettre d'envisager appliquer le PIXE à la détection *in situ* sur patients.

Il est toutefois intéressant de noter que la fluorescence X émise sous irradiation par des photons semble plus prometteuse. Les analyses menées en parallèle au LIST ont en effet permis de détecter les AuNPs dans les fantômes plus facilement qu'avec les protons. Cela pourrait s'expliquer par un rendement de fluorescence bien plus élevé. Pour tenter de confirmer cette observation, une étude par

simulation numérique a été effectuée avec un code Monte-Carlo de transport des particules (*Monte-Carlo N-particle*, MCNP), qui est un outil de simulation souvent utilisé dans le cadre des études en protonthérapie.⁷³⁻⁷⁵ Le système choisi est constitué d'une sphère de 1 cm de rayon contenant 2% d'or, située sous une couche d'eau de 10 cm d'épaisseur. Deux types d'irradiation cliniquement pertinentes ont été simulées : des photons 6 MeV (spectre typique d'un accélérateur linéaire utilisé en médical) et des protons 100 MeV. Les mesures sont prises à 90° du faisceau incident, en sortie de la sphère pour limiter l'atténuation par l'eau. Les résultats ont été convolués par la résolution d'un détecteur CdTe, afin de mieux rendre compte des conditions de mesure. Ils sont présentés sur la Figure IV.13. Aux énergies correspondant aux raies K et L de l'or, on peut observer une probabilité d'émission de fluorescence (pour un même nombre de particules incidentes) respectivement 1000 et 100 fois supérieure dans le cas des photons par rapport aux protons, ce qui semble confirmer que la fluorescence X émise sous irradiation de photons a plus de chances d'être détectée que l'effet PIXE.

La fluorescence X sous photons a d'ailleurs déjà été exploitée sur synchrotron pour effectuer l'analyse tomographique élémentaire de sphéroïdes[‡] de plusieurs centaines de microns, permettant ainsi de cartographier du platine avec une limite de détection de 10 µg/mL.^{76,77} L'analyse sur synchrotron de fantômes de AuNPs a produit des résultats similaires.⁷⁸ Plus récemment, Larsson *et al.* ont montré que l'utilisation de la tomographie par fluorescence X en laboratoire pouvait permettre d'obtenir la biodistribution de NPs de molybdène chez la souris, avec une résolution spatiale de 200 µm.⁷⁹ Ces résultats semblent indiquer que la fluorescence X émise sous irradiation par des photons serait une technique envisageable pour effectuer des analyses *in situ* en radiothérapie.

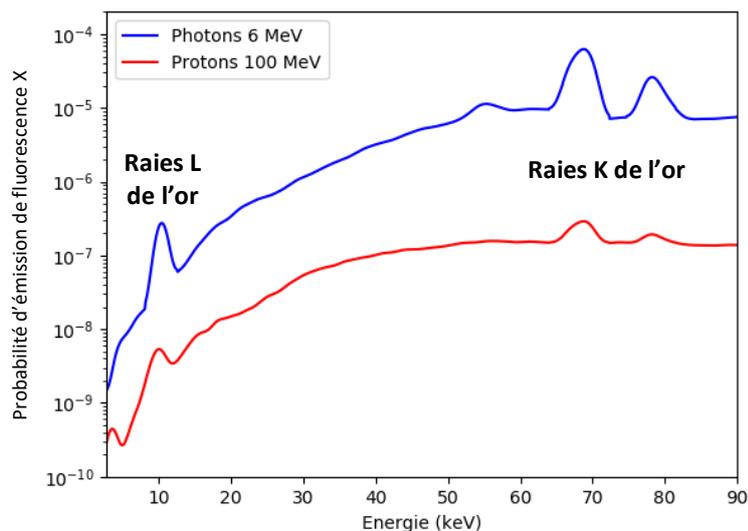


Figure IV.13 - Spectres de probabilité obtenus par simulation avec un code Monte-Carlo de transport de particules. Le modèle est une sphère contenant 2% d'or et située à une profondeur de 10 cm d'eau. Comparaison d'une irradiation par des photons 6 MeV ou des protons 100 MeV

[‡] Sphéroïde : Assemblage tridimensionnel de cellules

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des études présentées dans ce chapitre ont permis d'obtenir un premier aperçu du comportement de nos NPs sous irradiation. Une bonne stabilité des objets a tout d'abord pu être démontrée, mais certains phénomènes fins n'ont vraisemblablement pas pu être détectés, puisqu'une toxicité accrue des NPs irradiées a parfois été observée. Les tests de radiosensibilisation effectués avec les Au-PMAA ont montré des différences notables de performances, selon le type d'irradiation utilisé. L'association avec un traitement à l'iode 131 semble ainsi très prometteuse, et pourrait laisser supposer l'existence d'un effet de synergie entre l'or et le radioisotope. Les conditions défavorables de l'étude en protonthérapie n'ont toutefois pas permis de démontrer clairement un effet radiosensibilisant des AuNPs pour ce type de rayonnement. Nous avons enfin évalué la possibilité d'utiliser la méthode PIXE pour détecter les NPs *in situ* lors de l'irradiation en protons. Les résultats obtenus montrent les limites de la technique pour une utilisation en conditions cliniques.

Pour la suite du projet, il serait intéressant d'étudier plus en détails ce possible effet de synergie entre les AuNPs et l'iode 131. Des analyses pourraient tout d'abord être effectuées sur des AuNPs exposées à de l'iode non radioactif. La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) permettrait par exemple de détecter des variations d'énergie de liaison de l'or et ainsi de valider la présence d'iode à la surface des AuNPs, comme l'ont montré Kim *et al.*⁶⁰ Des cartographies élémentaires par EDX pourraient également être utilisées pour visualiser directement leur localisation, à condition que la quantité d'iode soit suffisante.

Sur le plan des tests biologiques, des comparaisons d'efficacité de radiosensibilisation pourraient être effectuées avec d'autres radioisotopes, pour des caractéristiques d'émission proches et des activités équivalentes, afin de déterminer si la chimisorption de l'iode sur les AuNPs joue ici un rôle. D'un point de vue mécanistique, on pourrait comparer les caractéristiques de l'émission de particules β^- de l'iode 131 avec et sans AuNPs, pour observer si le phénomène de chimisorption peut impacter les propriétés d'émission de l'iode. Cela pourrait être effectué par spectroscopie de scintillation, comme réalisé par Chao *et al.* sur leurs NPs combinant du hafnium et du technétium 99m.³²

Concernant la protonthérapie, comme cela a déjà été évoqué, les résultats mitigés obtenus proviennent probablement en partie d'une quantité d'or internalisée insuffisante. Ces expériences ayant été menées relativement tôt durant la thèse, nous avons opté pour les Au-PMAA, qui avaient démontré d'excellents résultats avec l'iode 131. Depuis, les résultats des expériences de captation

cellulaire (chapitre 3 § III.B) ont mis en évidence que certains ligands, comme le P(DMAEMA-MAA), entraînent une internalisation plus efficace. La captation accrue des Au-PMAA-Lf par les cellules de glioblastome, notamment à faible concentration, semble elle aussi prometteuse. Ces NPs pourraient donc faire l'objet de nouveaux tests de radiosensibilisation.

Si l'on reste dans la perspective de maximiser la quantité d'or internalisée, on pourrait également envisager d'augmenter la taille du cœur de nos NPs. Nous avons en effet montré dans le chapitre 3 qu'un plus gros cœur permettait d'internaliser une masse d'or plus importante. Les considérations concernant la taille du cœur sont cependant plus complexes, car celle-ci va aussi avoir un impact sur l'effet radiosensibilisant lui-même. Sur le plan des mécanismes physiques, McMahon *et al.* ont ainsi montré, dans le cas d'une irradiation par des photons, que l'effet radiosensibilisant dépend du ratio surface/volume : les électrons secondaires produits à l'intérieur de la NP étant fortement absorbés par l'or, seuls ceux produits par les atomes proches de la surface vont pouvoir s'échapper de la NP et générer des dommages autour d'elle.⁸⁰ Pour une masse d'or équivalente, les petites NPs génèrent donc un effet radiosensibilisant plus important. Lin *et al.* ont tiré les mêmes conclusions de leur simulation avec des protons.⁸¹ Au-delà des mécanismes physiques, on peut aussi supposer que les phénomènes de catalyse de surface, évoqués par plusieurs équipes comme participant à l'effet radiosensibilisant (chapitre 1 § II.C.2),⁸²⁻⁸⁴ sont eux aussi favorisés pour les ratios surface/volume élevés. Ce meilleur effet radiosensibilisant des petites NPs a été vérifié expérimentalement.⁸⁴ Ainsi, un compromis doit être trouvé entre augmenter la masse d'or internalisée et conserver des NPs de petite taille pour optimiser les mécanismes de radiosensibilisation. Dans notre cas, cela souligne d'autant plus l'intérêt à jouer sur l'utilisation de ligands polymères et de greffages de molécules permettant une captation accrue, plutôt que sur la taille du cœur d'or.

De manière plus générale, l'utilisation de NPs radiosensibilisantes en protonthérapie nécessitera d'étudier plus en détails les mécanismes sous-jacents, car certains aspects restent mal compris, notamment l'impact de la position du pic de Bragg.

En effet, les caractéristiques du rayonnement varient à mesure que le rayonnement pénètre dans les tissus : les particules perdent de l'énergie, et le transfert linéique d'énergie (LET) augmente progressivement jusqu'à atteindre son maximum au pic de Bragg. Ces deux paramètres peuvent ainsi influencer sur l'effet radiosensibilisant des NPs. Haume *et al.* ont par exemple montré qu'une énergie plus élevée favorise la production d'électrons secondaires et de radicaux libres, tandis que Li *et al.* observent *in vitro* une radiosensibilisation pour des protons possédant un LET de 25 keV/ μm mais pas pour un LET de 10 keV/ μm .⁴¹

Actuellement, puisque la dose déposée est plus importante au niveau du pic de Bragg, de nombreuses études adaptent leur faisceau de manière à localiser le pic de Bragg sur leur échantillon.^{40,85,86} Cependant, une des deux seules études *in vivo* associant protons et NPs à numéro atomique élevé a montré un effet radiosensibilisant plus marqué lorsque la tumeur était irradiée par des protons traversants, plutôt que par le pic de Bragg (Figure IV.14).⁸⁷ De même, à l'échelle des mécanismes, une publication récente rapporte une production plus importante d'électrons basse énergie et de radicaux libres dans le cas d'un rayonnement traversant d'ions carbone plutôt que dans le cas du pic de Bragg.⁴⁸ A l'inverse, Schlathölter ont obtenu des dommages plus importants sur l'ADN pour des protons en fin de parcours.⁸⁸

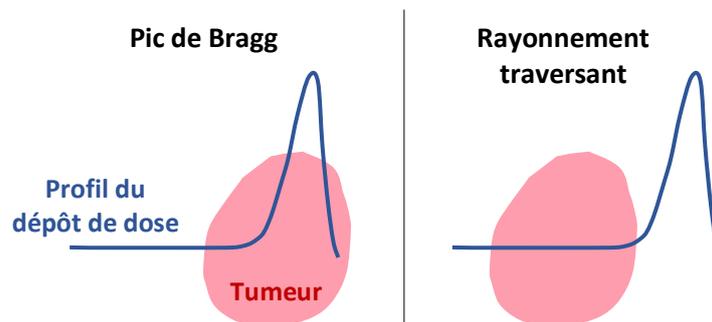


Figure IV.14 - Schématisation des deux conditions d'irradiation par protons utilisées dans la référence⁸⁷

Les résultats divergents soulignent que des études supplémentaires seront donc nécessaires pour mieux comprendre d'un point de vue physique les interactions entre les particules incidentes et les NPs, et ainsi optimiser les configurations adoptées lors des études de radiosensibilisation en protonthérapie, et plus généralement en hadronthérapie. Cela permettra également à la communauté d'établir des protocoles standardisés pour l'évaluation des propriétés radiosensibilisantes des NPs. Du point de vue expérimental, on se heurte cependant à la difficulté d'accéder aux faisceaux médicaux, ce qui limite la possibilité d'effectuer des tests de manière systématique et à grande échelle, en conditions réelles. Si la simulation peut en partie pallier ce manque, cela souligne malgré tout l'intérêt de développer des protocoles expérimentaux simplifiés, qui permettront de multiplier les tests plus aisément. Cette rationalisation des études menées semble indispensable pour pouvoir déterminer les facteurs clés du phénomène de radiosensibilisation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Subiel, A., Ashmore, R. & Schettino, G. Standards and Methodologies for Characterizing Radiobiological Impact of High-Z Nanoparticles. *Theranostics* **6**, 1651–1671 (2016).
2. Ricketts, K. *et al.* Recommendations for clinical translation of nanoparticle-enhanced radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **91**, 20180325 (2018).
3. Greaves, G., Hinks, J. A., Busby, P., Mellors, N. J., Ilinov, A., Kuronen, A., Nordlund, K. & Donnelly, S. E. Enhanced Sputtering Yields from Single-Ion Impacts on Gold Nanorods. *Phys. Rev. Lett.* **111**, 065504 (2013).
4. Bufford, D., H. Pratt, S., J. Boyle, T. & Hattar, K. In situ TEM ion irradiation and implantation effects on Au nanoparticle morphologies. *Chem. Commun.* **50**, 7593–7596 (2014).
5. Zhang, X.-D., Guo, M.-L., Wu, H.-Y., Sun, Y.-M., Ding, Y.-Q., Feng, X. & Zhang, L.-A. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. *Int. J. Nanomedicine* **4**, 165–173 (2009).
6. Briggs, S. A. & Hattar, K. Evolution of Gold Nanoparticles in Radiation Environments. in *Gold Nanoparticles-Reaching New Heights* (IntechOpen, 2018).
7. O'Donnell, J. H. Chemistry of Radiation Degradation of Polymers. in *Radiation Effects on Polymers* **475**, 402–413 (American Chemical Society, 1991).
8. Paquirissamy, A. Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation. (Université Paris-Saclay, 2016).
9. Le Goas, M., Paquirissamy, A., Gargouri, D., Fadda, G., Testard, F., Aymes-Chodur, C., Jubeli, E., Pourcher, T., Cambien, B., Palacin, S., Renault, J.-P. & Carrot, G. Irradiation Effects on Polymer-Grafted Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 144–154 (2019).
10. Brígido Diego, R., Salmerón Sánchez, M., Gómez Ribelles, J. L. & Monleón Pradas, M. Effect of γ -irradiation on the structure of poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 693–698 (2007).
11. Starkewolf, Z., Miyachi, L., Wong, J. & Guo, T. X-ray triggered release of doxorubicin from nanoparticle drug carriers for cancer therapy. *Chem. Commun.* **49**, 2545–2547 (2013).
12. Zhou, H., Zhang, Y., Su, G., Zhai, S. & Yan, B. Enhanced cancer cell killing by a targeting gold nanoconstruct with doxorubicin payload under X-ray irradiation. *RSC Adv.* **3**, 21596–21603 (2013).
13. Yilmaz, G., Demir, B., Timur, S. & Becer, C. R. Poly(methacrylic acid)-Coated Gold Nanoparticles: Functional Platforms for Theranostic Applications. *Biomacromolecules* **17**, 2901–2911 (2016).
14. Fathy, M. M., Mohamed, F. S., Elbially, N. & Elshemey, W. M. Multifunctional Chitosan-Capped Gold Nanoparticles for enhanced cancer chemo-radiotherapy: An invitro study. *Phys. Med.* **48**, 76–83 (2018).
15. Varshney, L. & Dodke, P. B. Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. *Radiat. Phys. Chem.* **71**, 1103–1111 (2004).
16. Zheng, J., Clogston, J. D., Patri, A. K., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Sterilization of Silver Nanoparticles Using Standard Gamma Irradiation Procedure Affects Particle Integrity and Biocompatibility. *J. Nanomedicine Nanotechnol.* **2011**, 001 (2011).
17. Vetten, M. A., Yah, C. S., Singh, T. & Gulumian, M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **10**, 1391–1399 (2014).

18. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* **49**, N309 (2004).
19. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 2 (2017).
20. Kim, E. H., Kim, M.-S., Song, H. S., Yoo, S. H., Sai, S., Chung, K., Sung, J., Jeong, Y. K., Jo, Y. & Yoon, M. Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer in neutron therapy. *Oncotarget* **8**, 112390–112400 (2017).
21. Maxon, H. R., Englaro, E. E., Thomas, S. R., Hertzberg, V. S., Hinnefeld, J. D., Chen, L. S., Smith, H., Cummings, D. & Aden, M. D. Radioiodine-131 therapy for well-differentiated thyroid cancer—a quantitative radiation dosimetric approach: outcome and validation in 85 patients. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **33**, 1132–1136 (1992).
22. Bulotta, S., Celano, M., Costante, G. & Russo, D. Emerging strategies for managing differentiated thyroid cancers refractory to radioiodine. *Endocrine* **52**, 214–221 (2016).
23. Ngwa, W., Korideck, H., Kassis, A. I., Kumar, R., Sridhar, S., Makrigiorgos, G. M. & Cormack, R. A. In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 25–27 (2013).
24. Cho, S. H., Jones, B. L. & Krishnan, S. The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources. *Phys. Med. Biol.* **54**, 4889 (2009).
25. Jones, B. L., Krishnan, S. & Cho, S. H. Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations. *Med. Phys.* **37**, 3809–3816 (2010).
26. Lechtman, E., Chattopadhyay, N., Cai, Z., Mashouf, S., Reilly, R. & Pignol, J. P. Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys. Med. Biol.* **56**, 4631 (2011).
27. Chanda, N. *et al.* Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 201–209 (2010).
28. Laprise-Pelletier, M., Lagueux, J., Côté, M.-F., LaGrange, T. & Fortin, M.-A. Low-Dose Prostate Cancer Brachytherapy with Radioactive Palladium–Gold Nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1601120 (2017).
29. Laprise-Pelletier, M., Ma, Y., Lagueux, J., Côté, M.-F., Beaulieu, L. & Fortin, M.-A. Intratumoral Injection of Low-Energy Photon-Emitting Gold Nanoparticles: A Microdosimetric Monte Carlo-Based Model. *ACS Nano* **12**, 2482–2497 (2018).
30. Yi, X., Yang, K., Liang, C., Zhong, X., Ning, P., Song, G., Wang, D., Ge, C., Chen, C., Chai, Z. & Liu, Z. Imaging-Guided Combined Photothermal and Radiotherapy to Treat Subcutaneous and Metastatic Tumors Using Iodine-131-Doped Copper Sulfide Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 4689–4699 (2015).
31. Chao, Y., Wang, G., Liang, C., Yi, X., Zhong, X., Liu, J., Gao, M., Yang, K., Cheng, L. & Liu, Z. Rhenium-188 Labeled Tungsten Disulfide Nanoflakes for Self-Sensitized, Near-Infrared Enhanced Radioisotope Therapy. *Small* **12**, 3967–3975 (2016).
32. Chao, Y., Liang, C., Yang, Y., Wang, G., Maiti, D., Tian, L., Wang, F., Pan, W., Wu, S., Yang, K. & Liu, Z. Highly Effective Radioisotope Cancer Therapy with a Non-Therapeutic Isotope Delivered and Sensitized by Nanoscale Coordination Polymers. *ACS Nano* **12**, 7519–7528 (2018).
33. Richard-Fiardo, P., Franken, P. R., Lamit, A., Marsault, R., Guglielmi, J., Cambien, B., Graslin, F., Lindenthal, S., Darcourt, J., Pourcher, T. & Vassaux, G. Normalisation to Blood Activity Is Required

- for the Accurate Quantification of Na/I Symporter Ectopic Expression by SPECT/CT in Individual Subjects. *PLOS ONE* **7**, e34086 (2012).
34. Le Goas, M., Paquet, M., Paquirissamy, A., Guglielmi, J., Compin, C., Thariat, J., Vassaux, G., Geertsen, V., Renault, J.-P., Carrot, G., Pourcher, T. & Cambien, B. Improving ¹³¹I radioiodine therapy by hybrid polymer-grafted gold nanoparticles. (submitted).
 35. Gao, X., Li, A., Zhang, X., Liu, P., Wang, J.-R. & Cai, X. Thyroid-stimulating hormone (TSH)-armed polymer–lipid nanoparticles for the targeted delivery of cisplatin in thyroid cancers: therapeutic efficacy evaluation. *RSC Adv.* **5**, 106413–106420 (2015).
 36. Rowe, C. W., Paul, J. W., Gedye, C., Tolosa, J. M., Bendinelli, C., McGrath, S. & Smith, R. Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **24**, R191–R202 (2017).
 37. Wyszomirska, A. Iodine-131 for therapy of thyroid diseases. Physical and biological basis. *Nucl. Med. Rev.* **15**, 120–123 (2012).
 38. Micali, S., Bulotta, S., Puppini, C., Territo, A., Navarra, M., Bianchi, G., Damante, G., Filetti, S. & Russo, D. Sodium iodide symporter (NIS) in extrathyroidal malignancies: focus on breast and urological cancer. *BMC Cancer* **14**, 303 (2014).
 39. Peerlinck, I., Merron, A., Baril, P., Conchon, S., Martin-Duque, P., Hindorf, C., Burnet, J., Quintanilla, M., Hingorani, M., Iggo, R., Lemoine, N. R., Harrington, K. & Vassaux, G. Targeted Radionuclide Therapy Using a Wnt-Targeted Replicating Adenovirus Encoding the Na/I Symporter. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6595–6601 (2009).
 40. Kim, J.-K., Seo, S.-J., Kim, K.-H., Kim, T.-J., Chung, M.-H., Kim, K.-R. & Yang, T.-K. Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced x-ray emission effect. *Nanotechnology* **21**, 425102 (2010).
 41. Li, S. *et al.* LET-dependent radiosensitization effects of gold nanoparticles for proton irradiation. *Nanotechnology* **27**, 455101 (2016).
 42. Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P. & Jaffray, D. A. Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiat. Res.* **173**, 719–728 (2010).
 43. Butterworth, K. T., Nicol, J. R., Ghita, M., Rosa, S., Chaudhary, P., McGarry, C. K., McCarthy, H. O., Jimenez-Sanchez, G., Bazzi, R., Roux, S., Tillement, O., Coulter, J. A. & Prise, K. M. Preclinical evaluation of gold-DTDTPA nanoparticles as theranostic agents in prostate cancer radiotherapy. *Nanomed.* **11**, 2035–2047 (2016).
 44. Cho, J., Gonzalez-Lepera, C., Manohar, N., Kerr, M., Krishnan, S. & Cho, S. H. Quantitative investigation of physical factors contributing to gold nanoparticle-mediated proton dose enhancement. *Phys. Med. Biol.* **61**, 2562–2581 (2016).
 45. Heuskin, A.-C., Gallez, B., Feron, O., Martinive, P., Michiels, C. & Lucas, S. Metallic nanoparticles irradiated by low energy protons for radiation therapy: are there significant physical effects to enhance the dose delivery? *Med. Phys.* **44**, 4299–4312 (2017).
 46. Sotiropoulos, M., Henthorn, N. T., Warmenhoven, J. W., Mackay, R. I., Kirkby, K. J. & Merchant, M. J. Modelling direct DNA damage for gold nanoparticle enhanced proton therapy. *Nanoscale* **9**, 18413–18422 (2017).
 47. Xiao, F., Zheng, Y., Cloutier, P., He, Y., Hunting, D. & Sanche, L. On the role of low-energy electrons in the radiosensitization of DNA by gold nanoparticles. *Nanotechnology* **22**, 465101 (2011).
 48. Haume, K., de Vera, P., Verkhovtsev, A., Surdutovich, E., Mason, N. J. & Solov'yov, A. V. Transport of secondary electrons through coatings of ion-irradiated metallic nanoparticles. *Eur. Phys. J. D* **72**, (2018).

49. Hespeels, F., Heuskin, A.-C., Tabarrant, T., Scifoni, E., Kraemer, M., Chêne, G., Strivay, D. & Lucas, S. Backscattered electron emission after proton impact on gold nanoparticles with and without polymer shell coating. *Phys. Med. Biol.* (2019).
50. Gilles, M., Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **123**, 770–777 (2014).
51. Browne, E., Firestone, R. B. & Shirley, V. S. *Table of Radioactive Isotopes*. (Wiley-Interscience, 1986).
52. Lin, Y., McMahon, S. J., Scarpelli, M., Paganetti, H. & Schuemann, J. Comparing gold nanoparticle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation. *Phys. Med. Biol.* **59**, 7675 (2014).
53. Unak, P. & Cetinkaya, B. Absorbed dose estimates at the cellular level for ¹³¹I. *Appl. Radiat. Isot.* **62**, 861–869 (2005).
54. Gao, X. & Weaver, M. J. Electrode potential-induced reconstruction of gold (100): effect of chemisorption on nanoscale dynamics as probed by in-situ scanning tunneling microscopy. *J. Phys. Chem.* **97**, 8685–8689 (1993).
55. Cheng, W., Dong, S. & Wang, E. Iodine-Induced Gold-Nanoparticle Fusion/Fragmentation/Aggregation and Iodine-Linked Nanostructured Assemblies on a Glass Substrate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 449–452 (2003).
56. Rai, A., Singh, A., Ahmad, A. & Sastry, M. Role of Halide Ions and Temperature on the Morphology of Biologically Synthesized Gold Nanotriangles. *Langmuir* **22**, 736–741 (2006).
57. Singh, S., Pasricha, R., M. Bhatta, U., V. Satyam, P., Sastry, M. & V. Prasad, B. L. Effect of halogen addition to monolayer protected gold nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **17**, 1614–1619 (2007).
58. Millstone, J. E., Wei, W., Jones, M. R., Yoo, H. & Mirkin, C. A. Iodide Ions Control Seed-Mediated Growth of Anisotropic Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **8**, 2526–2529 (2008).
59. Shao, X., Agarwal, A., Rajian, J. R., Kotov, N. A. & Wang, X. Synthesis and bioevaluation of ¹²⁵I-labeled gold nanorods. *Nanotechnology* **22**, 135102 (2011).
60. Kim, S.-H., Kim, E.-M., Lee, C.-M., Kim, D. W., Lim, S. T., Sohn, M.-H. & Jeong, H.-J. Synthesis of PEG-Iodine-Capped Gold Nanoparticles and Their Contrast Enhancement in In Vitro and In Vivo for X-Ray/CT. *J. Nanomater.* **2012**, (2012).
61. Walsh, A. A. Chemisorption of iodine-125 to gold nanoparticles allows for real-time quantitation and potential use in nanomedicine. *J. Nanoparticle Res.* **19**, (2017).
62. Liu, C.-J., Wang, C.-H., Chen, S.-T., Chen, H.-H., Leng, W.-H., Chien, C.-C., Wang, C.-L., Kempson, I. M., Hwu, Y., Lai, T.-C., Hsiao, M., Yang, C.-S., Chen, Y.-J. & Margaritondo, G. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* **55**, 931–945 (2010).
63. Kaur, H., Pujari, G., Semwal, M. K., Sarma, A. & Avasthi, D. K. In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cells. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **301**, 7–11 (2013).
64. Liu, Y., Liu, X., Jin, X., He, P., Zheng, X., Dai, Z., Ye, F., Zhao, T., Chen, W. & Li, Q. The dependence of radiation enhancement effect on the concentration of gold nanoparticles exposed to low- and high-LET radiations. *Phys. Med.* **31**, 210–218 (2015).
65. Moretto, P. & Beck, L. Emission X induite par particules chargées (PIXE): applications. *Tech. Ing. Mes. - Anal.* (2004).
66. Ogrinc, N., Pelicon, P., Vavpetič, P., Kelemen, M., Grlj, N., Jeromel, L., Tomić, S., Čolić, M. & Beran, A. Quantitative assay of element mass inventories in single cell biological systems with micro-PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **306**, 121–124 (2013).

67. Tomić, S., Đokić, J., Vasiljić, S., Ogrinc, N., Rudolf, R., Pelicon, P., Vučević, D., Milosavljević, P., Janković, S., Anžel, I., Rajković, J., Rupnik, M. S., Friedrich, B. & Čolić, M. Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. *PLOS ONE* **9**, e96584 (2014).
68. G. Jeynes, J. C., Jeynes, C., J. Merchant, M. & J. Kirkby, K. Measuring and modelling cell-to-cell variation in uptake of gold nanoparticles. *Analyst* **138**, 7070–7074 (2013).
69. Carmona, A., Roudeau, S., L’Homel, B., Pouzoulet, F., Bonnet-Boissinot, S., Prezado, Y. & Ortega, R. Heterogeneous intratumoral distribution of gadolinium nanoparticles within U87 human glioblastoma xenografts unveiled by micro-PIXE imaging. *Anal. Biochem.* **523**, 50–57 (2017).
70. Chen, Z.-J., Broaddus, W. C., Viswanathan, R. R., Raghavan, R. & Gillies, G. T. Intraparenchymal drug delivery via positive-pressure infusion: experimental and modeling studies of poroelasticity in brain phantom gels. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **49**, 85–96 (2002).
71. Lapicki, G. Scaling of analytical cross sections for K-shell ionization by nonrelativistic protons to cross sections by protons at relativistic velocities. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* **41**, 115201 (2008).
72. Henke, B. L., Gullikson, E. M. & Davis, J. C. X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at $E = 50\text{--}30,000$ eV, $Z = 1\text{--}92$. *At. Data Nucl. Data Tables* **54**, 181–342 (1993).
73. Los Alamos National Laboratory: MCNP Home Page. <https://mcnp.lanl.gov/>.
74. Šolc, J. Comparison of proton interaction physics models and cross section libraries for proton therapy Monte Carlo simulations by MCNP6.2 code. *Radiat. Meas.* **125**, 57–68 (2019).
75. Chang, K.-P., Hsieh, H.-H., Chao, T.-C. & Wu, C.-H. Effects of modulation materials for lung dose distribution in proton therapy. *Radiat. Phys. Chem.* (2019).
76. Alderden, R. A., Mellor, H. R., Modok, S., Hall, M. D., Sutton, S. R., Newville, M. G., Callaghan, R. & Hambley, T. W. Elemental Tomography of Cancer-Cell Spheroids Reveals Incomplete Uptake of Both Platinum(II) and Platinum(IV) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13400–13401 (2007).
77. Zhang, J. Z., Bryce, N. S., Lanzirrotti, A., Chen, C. K. J., Paterson, D., Jonge, M. D. de, Howard, D. L. & Hambley, T. W. Getting to the core of platinum drug bio-distributions: the penetration of anti-cancer platinum complexes into spheroid tumour models. *Metallomics* **4**, 1209–1217 (2012).
78. Ricketts, K., Guazzoni, C., Castoldi, A., Gibson, A. & Royle, G. J. An x-ray fluorescence imaging system for gold nanoparticle detection. *Phys. Med. Biol.* **58**, 7841–7855 (2013).
79. Larsson, J. C., Vogt, C., agberg, W. V., Toprak, M. S., Dzieran, J., Arsenian-Henriksson, M. & Hertz, H. M. High-spatial-resolution x-ray fluorescence tomography with spectrally matched nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* **63**, 164001 (2018).
80. McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O’Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G. & Currell, F. J. Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci. Rep.* **1**, 18 (2011).
81. Lin, Y., McMahon, S. J., Paganetti, H. & Schuemann, J. Biological modeling of gold nanoparticle enhanced radiotherapy for proton therapy. *Phys. Med. Biol.* **60**, 4149 (2015).
82. Gilles, M., Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Quantification of hydroxyl radicals and solvated electrons produced by irradiated gold nanoparticles suggests a crucial role of interfacial water. *J. Colloid Interface Sci.* **525**, 31–38 (2018).
83. Lien, J., Su, M. & Guo, T. Identification of Individual Reaction Steps in Complex Radical Reactions Involving Gold Nanoparticles. *ChemPhysChem* **19**, 3328–3333 (2018).
84. Khalil, T. T., Bazzi, R., Roux, S. & Fromm, M. The contribution of hydrogen peroxide to the radiosensitizing effect of gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **175**, 606–613 (2019).

85. Kim, K.-H., Kim, H.-T., Kim, J.-H., Seo, S.-J., Chung, D.-S. & Kim, J.-K. Investigation of tumor cell toxicity from Particle-Induced X-ray Emission from a 45-MeV proton beam-irradiated ferrite nanoparticle. *Int. J. PIXE* **19**, 143–155 (2009).
86. Polf, J. C., Bronk, L. F., Driessen, W. H. P., Arap, W., Pasqualini, R. & Gillin, M. Enhanced relative biological effectiveness of proton radiotherapy in tumor cells with internalized gold nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 193702 (2011).
87. Kim, J.-K., Seo, S.-J., Kim, H.-T., Kim, K.-H., Chung, M.-H., Kim, K.-R. & Ye, S.-J. Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* **57**, 8309 (2012).
88. Schlathölter, T., Eustache, P., Porcel, E., Salado, D., Stefancikova, L., Tillement, O., Lux, F., Mowat, P., Biegun, A. K., van Goethem, M.-J., Remita, H. & Lacombe, S. Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1549–1556 (2016).

Conclusion générale

Dans le contexte du développement de NPs à visée médicale, cette étude avait pour objectif de déterminer de manière fiable l'impact des propriétés physico-chimiques de NPs sur leur comportement en milieu biologique. Nous avons ainsi cherché à synthétiser une gamme de nano-objets de référence, constitués d'un cœur d'or et d'une couronne polyméthacrylate dont les propriétés peuvent être variées. Ces objets bien définis, obtenus via une synthèse maîtrisée et caractérisés de manière approfondie, ont été utilisés en combinaison avec des protocoles *in vitro* standardisés, nous permettant d'identifier certains facteurs clés qui régissent les interactions des NPs avec différents systèmes biologiques. La présence de charge positives et de parties hydrophobes s'est notamment révélée très favorable pour la captation cellulaire, mais bloque toute diffusion dans la matrice extracellulaire.

Du point de vue plus spécifique de la radiosensibilisation, cette étude a permis de mettre en évidence un comportement prometteur de nos NPs, à la fois en termes de stabilité sous irradiation et de propriétés radiosensibilisantes. L'association avec l'iode 131 en radiothérapie interne, jamais explorée jusqu'à présent, a notamment montré d'excellents résultats, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Une des forces de cette étude repose sur la conservation d'une structure similaire d'un type de NP à l'autre. S'affranchir ainsi de la taille et de la forme des objets permet une comparaison fiable de l'impact de leurs propriétés physico-chimiques, un aspect négligé dans nombre d'études publiées à ce sujet. La grande stabilité de nos objets constitue le deuxième point fort de l'étude. Nous avons en effet montré que nos NPs étaient extrêmement stables dans le temps, dans des milieux biologiques et sous irradiation. Cette stabilité soulève cependant la question de leur élimination sur le long terme, comme nous l'évoquerons plus loin.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet de deux publications^{1,2} : *Irradiation Effects on Polymer-Grafted Gold Nanoparticles for Cancer Therapy*, publiée en 2019 dans ACS Applied Biomaterials et *Improving ¹³¹I radioiodine therapy by hybrid polymer-grafted gold nanoparticles*, actuellement en processus de soumission.

Bien que cette étude s'inscrive dans le contexte de la radiosensibilisation, son spectre d'application est bien plus large et concerne en réalité toutes les NPs développées dans le cadre du traitement du cancer. L'approche systématique de variation des propriétés physico-chimiques pour en étudier l'impact, ainsi que les protocoles expérimentaux mis en place, pourront tout à fait être utilisés pour

étudier le comportement de nano-objets pour l'imagerie, la délivrance de médicaments, la photothérapie, etc.

EXTENSION DE LA STRATÉGIE À D'AUTRES ASPECTS DU COMPORTEMENT DES NPs *IN VITRO*

Concernant nos objets, cette approche systématique de l'impact de la couronne pourra être appliquée à d'autres problématiques déjà évoquées dans le chapitre 3, comme le passage de la barrière hémato-encéphalique, la localisation intracellulaire ou la dégradation. Les études de radiosensibilisation pourront également être complétées, notamment sur les objets qui n'ont pas pu être testés ici. Les premières expériences de stabilité des NPs sous irradiation et de toxicité post-irradiation ont toutefois déjà montré que la nature du polymère influait sur les résultats.

En radiosensibilisation, les effets pourront être étudiés au niveau cellulaire, par exemple avec les tests clonogéniques, mais aussi au niveau moléculaire, pour déterminer les mécanismes sous-jacents. Si l'ADN a longtemps été considéré comme la cible principale de l'effet radiosensibilisant des NPs, d'autres constituants cellulaires commencent à être évoqués ces dernières années, comme la membrane plasmique, les lysosomes, les mitochondries ou le réticulum endoplasmique.³⁻⁵ L'impact sur les membranes, plasmiques ou intracellulaires, nous semble donc être un aspect particulièrement intéressant, car tous les organites évoqués sont délimités par des membranes. Différents modèles de bicouches lipidiques pourraient être utilisés, comme cela a déjà été réalisé pour étudier les interactions entre NPs et membranes, hors du contexte de la radiosensibilisation.^{6,7} A notre connaissance, cela n'a encore jamais été appliqué pour des NPs radiosensibilisantes, sous irradiation.

L'impact de la couronne polymère sur l'opsonisation constitue également un point intéressant à étudier, car le temps de circulation des NPs après injection intraveineuse dépend fortement de l'amplitude de ce phénomène. Si le PEG permet de réduire l'adsorption des protéines, il faudra déterminer si les polyméthacrylates peuvent en faire de même. L'opsonisation constituant un mécanisme de reconnaissance par le système immunitaire, cela soulève également la question de la capacité des NPs à stimuler la réponse immunitaire. Cet aspect est étudié depuis peu dans le cadre du traitement du cancer, afin de générer des morts cellulaires immunogènes qui conduisent à l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique.⁸ La société Nanobiotix a par exemple récemment annoncé que leurs NPs NBTXR3 avaient montré de bons résultats à ce sujet en radiothérapie.⁹ Les propriétés de surface des NPs vont là encore jouer un rôle majeur, et notre approche pourrait donc être utilisée.

QUELLES ALTERNATIVES AUX ÉTUDES *IN VIVO* ?

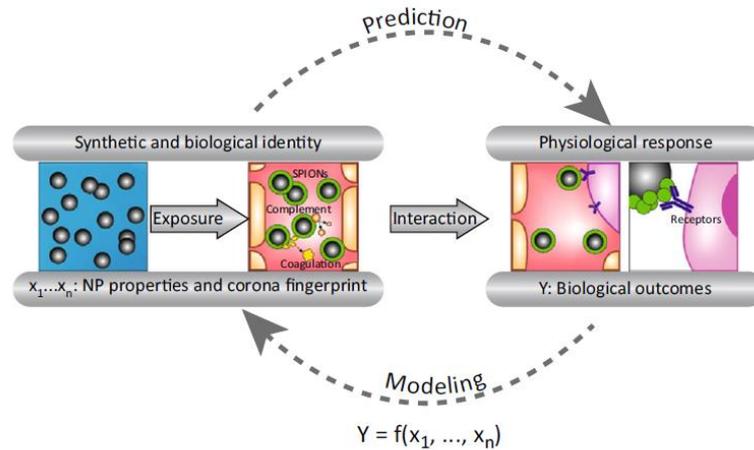
L'approche systématique que nous avons choisie requiert de nombreuses expériences, afin de caractériser le comportement d'une grande librairie de NPs et de pouvoir en tirer des conclusions sur l'impact des différentes propriétés de surface. Elle semble donc peu adaptée aux études *in vivo*, qui sont bien plus complexes à mettre en place. Cela nécessiterait en outre l'utilisation de nombreux animaux, alors que les enjeux éthiques des tests précliniques sont questionnés. D'autre part, la pertinence des modèles animaux est de plus en plus remise en cause, comme cela a notamment été évoqué dans le cadre de l'effet EPR dans le chapitre 1 (§ I.B). Il semble donc indispensable de trouver des alternatives aux études précliniques classiques.

Grâce aux progrès en microfabrication et en ingénierie tissulaire, le domaine des organes sur puce a connu ces dernières années un essor important, permettant de recréer les fonctions de différents organes, les propriétés de barrière de certains tissus, ou encore des interactions inter-organes.¹⁰ Dans le domaine du cancer, des tumeurs sur puce commencent aussi à être développées.^{11,12} Wang *et al.* ont ainsi fabriqué un modèle microfluidique qui reproduit les caractéristiques des vaisseaux et de la matrice extracellulaire tumoraux, afin d'étudier les phénomènes d'extravasation des NPs et leur accumulation dans la tumeur.¹³ Les résultats qu'ils obtiennent correspondent bien à ceux provenant des études *in vivo*. Cette utilisation des tumeurs sur puce semble donc prometteuse pour étudier certains aspects du comportement des NPs qui étaient jusque-là seulement accessibles *in vivo*.

Une autre alternative, possiblement complémentaire de la première, repose sur l'utilisation de modèles de prédiction *in silico*. Ces programmes informatiques, baptisés QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), sont basés sur le postulat que des propriétés physico-chimiques comparables vont générer des comportements identiques vis-à-vis des systèmes biologiques.¹⁴ A partir de jeux de données existants, les modèles sont par exemple capables de prédire la toxicité, la captation cellulaire ou la biodistribution de NPs n'ayant pas encore été étudiées, en se basant sur des similarités de structures (Figure V.1).¹⁵ Les progrès récents dans le domaine du *machine learning* devraient permettre d'analyser des volumes de données importants, et ainsi gagner en fiabilité de prédiction. Ce type de stratégie pourrait ainsi limiter le nombre d'expériences à réaliser et accélérer les processus de caractérisation des NPs *in vitro*, mais aussi *in vivo*.

L'utilisation de tels modèles nécessite cependant d'avoir des données comparables. La grande diversité de protocoles expérimentaux utilisés actuellement dans la littérature de la nanomédecine empêche donc d'exploiter toutes les données déjà publiées. L'approche systématique utilisée dans ce projet semble ainsi parfaitement en cohérence avec l'utilisation de modèles *in silico*. La communauté aura intérêt, dans un futur proche, à établir des protocoles standardisés qui permettront de comparer

correctement les différents types de nano-objets étudiés. Cela semble être la condition *sine qua non* pour améliorer la compréhension des phénomènes, accroître la vitesse de développement de NPs efficaces, et ainsi accélérer leur transfert vers la clinique.



NP properties and corona fingerprint		Biological outcomes	
X ₁	Size	Y ₁	Cellular uptake
X ₂	Surface charge	Y ₂	Cell viability
X ₃	Aggregation state	Y ₃	Cytoplasmic delivery
X ₄	Surface functionality	Y ₄	Organelle targeting
X ₅	Shape	Y ₅	Biodistribution
X ₆	Proteins of corona composition	Y ₆	Cancer site accumulation
...
X _n	...	Y _n	...

Figure V.1 - Schématisation du principe des méthodes QSAR ¹⁴

VERS UNE NANOMÉDECINE PERSONNALISÉE ?

Avoir à disposition une grande librairie de nano-objets permet aussi d'envisager le développement de traitements personnalisés, adaptés aux caractéristiques de la tumeur que l'on cherche à soigner. En effet, les lignées cellulaires immortalisées utilisées ne reflètent pas toute la diversité du vivant, et on peut s'attendre à une efficacité thérapeutique des NPs variable d'une tumeur à l'autre, à cause de différences inhérentes aux tumeurs. La possibilité de tester toute une gamme de NPs permettrait ainsi de déterminer, pour chaque patient, celles qui assureraient la meilleure efficacité. Cela implique cependant de pouvoir tester rapidement un grand nombre de composés sur des cellules primaires dérivées du patient. Les tumeurs sur puce déjà mentionnées pourraient permettre un tel criblage, comme démontré par Shirure *et al.*, qui ont utilisé des tissus prélevés par biopsie sur des tumeurs réelles et ont maintenu leur viabilité pendant plusieurs semaines.¹² On notera toutefois que ces perspectives de médecine personnalisée sont ici évoquées hors de toute considération réglementaire.

Une autre stratégie serait au contraire d'utiliser une combinaison de NPs aux propriétés différentes pour allier plusieurs effets. Comme cela a été évoqué en fin du chapitre 3, cela pourrait par exemple permettre d'exploiter plusieurs voies d'internalisation et/ou de cibler plusieurs localisations intracellulaires. On peut imaginer que cette stratégie multi-composés serait avantageuse pour contrer les résistances que la tumeur pourrait développer vis-à-vis d'un composé en particulier.

LA RECHERCHE DE COMPLEXITÉ, MAIS POUR QUELLE FINALITÉ ?

Dans le domaine de la nanomédecine, la littérature récente tend à valoriser le design de nano-objets aux structures complexes, développés dans une volonté d'associer de multiples effets thérapeutiques. Cette recherche de complexité doit cependant être sujette à caution. Tout d'abord, il faut avoir la capacité de caractériser correctement les architectures, ce qui n'est pas chose aisée, comme nous l'avons déjà évoqué dans cette thèse. L'étape de caractérisation est en effet primordiale pour pouvoir ensuite comprendre les comportements des NPs formées. D'autre part, la conservation des propriétés *in vivo* est souvent problématique, à cause d'une instabilité des objets. Enfin, ce type de structure est peu adapté à un transfert vers la clinique, car il nécessite généralement des synthèses multi-étapes, difficiles à industrialiser. Il faut donc faire attention à trouver un équilibre entre la complexification de l'objet et le bénéfice clinique réel.

De manière générale, il est primordial de ne pas perdre de vue l'objectif clinique. Les études de NPs à visée médicale se font souvent sans consultation des médecins, et mènent parfois à des objets qu'eux considèrent comme peu applicables. Comme évoqué dans le chapitre 4, dans le cas des traitements par radiothérapie interne, le médecin nucléaire avec lequel nous avons discuté considérerait par exemple que greffer des radioisotopes sur des NPs n'était pas une solution appropriée. Ainsi, se rapprocher des cliniciens devrait permettre de converger plus rapidement vers des objets transférables vers la clinique.

Les structures complexes pourraient cependant être utilisées dans une perspective de compréhension des mécanismes. On peut par exemple envisager de greffer sur nos NPs des sondes à radicaux libres, pour étudier les réactions chimiques à l'origine de la radiosensibilisation, ou bien des agents de réticulation qui permettent de capturer les protéines en interactions avec les NPs, afin d'identifier certaines cibles moléculaires.¹⁶ Nos AuNPs greffées polymères pourraient ainsi être utilisées comme des plateformes pouvant être adaptées à l'étude que l'on cherche à mener. La difficulté est cependant de veiller à ce que ces greffages ne modifient pas le comportement général des NPs.

FAUT-IL TENDRE VERS TOUJOURS PLUS DE STABILITÉ ?

Comme cela a été rappelé en début de conclusion, nous avons démontré dans cette étude une excellente stabilité de nos NPs, ce qui nous a permis d'utiliser des objets bien définis lors de nos tests *in vitro* et *in vivo*. Cette stabilité pose cependant la question du devenir des NPs dans le corps à long terme. Si la problématique d'élimination et de dégradation des NPs a toujours été importante, bien qu'assez peu étudiée, les travaux récents de l'équipe de Tai Leong la placent au centre des préoccupations actuelles. Leur article, publié début 2019, montre que l'injection intraveineuse de NPs d'or, de silice ou de dioxyde de titane pourrait favoriser le développement de métastases d'un cancer du sein.¹⁷ Ils expliquent cela par un phénomène qu'ils ont nommé *Nanomaterials-induced Endothelial Leakiness* (NanoEL), qui correspond à la formation d'espaces de taille micrométrique au niveau des jonctions cellulaires des parois des vaisseaux sanguins, observée en présence de NPs uniquement. L'étude montre que les cellules cancéreuses peuvent exploiter cette perméabilité pour passer dans la circulation sanguine (intravasation), puis pour s'en extraire à un autre endroit (extravasation), créant ainsi des métastases. L'ensemble du phénomène est représenté sur la Figure V.2.

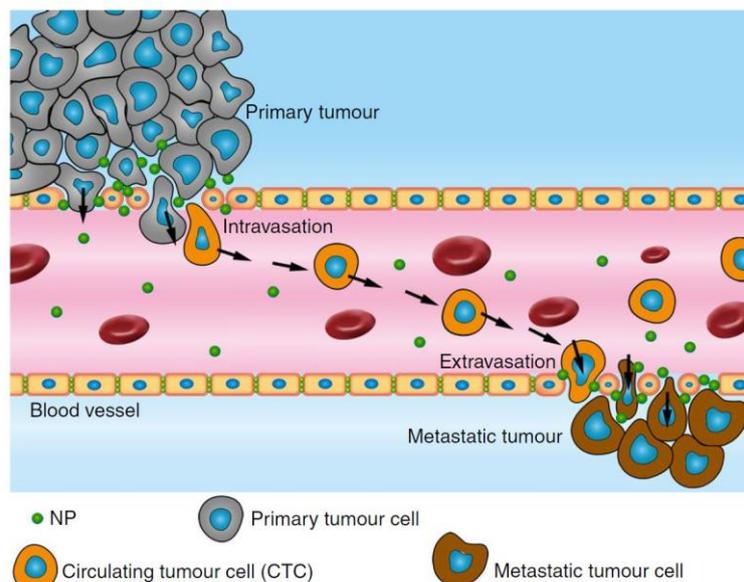


Figure V.2 - Schématisation des phénomènes d'intravasation et d'extravasation des cellules cancéreuses induites par l'effet de fuite endothéliale¹⁷

Cette publication souligne donc l'importance d'effectuer des études de dégradation et d'élimination des NPs. Pour suivre la biodistribution de nos objets, on pourrait tester la possibilité de les activer sous irradiation (protons ou neutrons), puisque nous avons montré que la couronne était stable pour des faibles doses. L'or étant facilement activé, on pourrait ensuite étudier sa biodistribution par tomographie par émission monophotonique (SPECT en anglais). La grande sensibilité de l'imagerie SPECT constitue un avantage par rapport à la tomodensitométrie aux rayons X, également applicable à l'or. Le suivi de la couronne polymère, constituée d'éléments légers, reste plus complexe par la

méthode d'activation. Cela permettrait pourtant d'obtenir des informations sur l'éventuelle dissociation cœur/couronne. Récemment, des radiomarquages ont été utilisés pour analyser la biodistribution de ligands organiques ou polymères.^{18,19} Plutôt que d'incorporer directement un radioisotope dans la couronne, on pourrait envisager d'y intégrer un élément activable sous irradiation, afin d'utiliser la même technique d'activation pour le cœur et la couronne.

Considérant cet effet de NanoEL, la grande stabilité de nos objets pourrait se révéler problématique. L'étude de leur dégradation permettra dans un premier temps de déterminer les mécanismes en jeu, puis de modifier la structure des NPs en conséquence, afin de les rendre plus labiles sur le long terme et d'éviter ce type de phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

1. Le Goas, M., Paquirissamy, A., Gargouri, D., Fadda, G., Testard, F., Aymes-Chodur, C., Jubeli, E., Pourcher, T., Cambien, B., Palacin, S., Renault, J.-P. & Carrot, G. Irradiation Effects on Polymer-Grafted Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 144–154 (2019).
2. Le Goas, M., Paquet, M., Paquirissamy, A., Guglielmi, J., Compin, C., Thariat, J., Vassaux, G., Geertsens, V., Renault, J.-P., Carrot, G., Pourcher, T. & Cambien, B. Improving ¹³¹I radioiodine therapy by hybrid polymer-grafted gold nanoparticles. (submitted).
3. Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Actual questions raised by nanoparticle radiosensitization. *Radiat. Phys. Chem.* **128**, 134–142 (2016).
4. Delorme, R., Taupin, F., Flaender, M., Ravanat, J.-L., Champion, C., Agelou, M. & Elleaume, H. Comparison of gadolinium nanoparticles and molecular contrast agents for radiation therapy-enhancement. *Med. Phys.* **44**, 5949–5960 (2017).
5. Pagáčová, E. *et al.* Challenges and Contradictions of Metal Nano-Particle Applications for Radio-Sensitivity Enhancement in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 588 (2019).
6. Rascol, E. Etude des propriétés de surface de nanoparticules à l'interface avec les fluides biologiques et les membranes cellulaires. (Université Montpellier, 2016).
7. Contini, C., Schneemilch, M., Gaisford, S. & Quirke, N. Nanoparticle–membrane interactions. *J. Exp. Nanosci.* **13**, 62–81 (2018).
8. Duan, X., Chan, C. & Lin, W. Nanoparticle-Mediated Immunogenic Cell Death Enables and Potentiates Cancer Immunotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **58**, 670–680 (2019).
9. Nanobiotix. Nanobiotix : mise à jour des données de l'étude de Phase I/II dans les cancers de la tête et du cou et autres données présentées à ImmunoRad 2018. (2018).
10. Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 257 (2018).
11. Tsai, H.-F., Trubelja, A., Shen, A. Q. & Bao, G. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. *J. R. Soc. Interface* **14**, (2017).
12. Shirure, V. S., Bi, Y., Curtis, M. B., Lezia, A., Goedegebuure, M. M., Goedegebuure, S. P., Aft, R., Fields, R. C. & George, S. C. Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids. *Lab. Chip* **18**, 3687–3702 (2018).
13. Wang, H.-F., Ran, R., Liu, Y., Hui, Y., Zeng, B., Chen, D., Weitz, D. A. & Zhao, C.-X. Tumor-Vasculature-on-a-Chip for Investigating Nanoparticle Extravasation and Tumor Accumulation. *ACS Nano* **12**, 11600–11609 (2018).
14. Caracciolo, G., Farokhzad, O. C. & Mahmoudi, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* **35**, 257–264 (2017).
15. Sizochenko, N. & Leszczynski, J. Review of Current and Emerging Approaches for Quantitative Nanostructure-Activity Relationship Modeling: The Case of Inorganic Nanoparticles. *J. Nanotoxicology Nanomedicine JNN* **1**, 1–16 (2016).
16. Tang, X. & Bruce, J. E. Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **492**, 283–293 (2009).
17. Peng, F., Setyawati, M. I., Tee, J. K., Ding, X., Wang, J., Nga, M. E., Ho, H. K. & Leong, D. T. Nanoparticles promote in vivo breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness. *Nat. Nanotechnol.* **1** (2019).

18. Wang, H., Kumar, R., Nagesha, D., Duclos, R. I., Sridhar, S. & Gatley, S. J. Integrity of ¹¹¹In-radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the mouse. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 65–70 (2015).
19. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).

Annexe A : Partie expérimentale

SYNTHÈSES

SYNTHÈSE DE L'AMORCEUR

Sous atmosphère d'argon, 3,40 g de 2,2-dithioéthanol ainsi que 4,2 g de pyridine anhydre sont dissous dans un tricol de 250 mL contenant 30 mL de THF, placé dans un bain d'eau glacée. 12,2 g de bromure de 2-bromo-isobutyryle sont ajoutés goutte à goutte, suivis de 30 mL supplémentaires de THF. La solution est agitée à 0°C durant deux heures puis la réaction est poursuivie à température ambiante pendant 24h. Le sel de pyridinium formé (précipité blanc) est éliminé par filtration. La solution obtenue est dissoute dans du chloroforme et lavée une première fois avec une solution d'acide chlorhydrique à 2M, puis deux fois avec de l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite et une huile incolore est obtenue. Une chromatographie sur colonne de silice est parfois nécessaire pour compléter la purification.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 4,44 (t, OCH₂, 4H), 2,98 (t, SCH₂, 4H), 1,94 (s, CH₃, 12H)

SYNTHÈSE DES LIGANDS POLYMÈRES PAR ATRP

Synthèse générale des ligands à base de méthacrylate de *tert*-butyle (MAtBu)

Les solutions de monomères, de diméthylformamide (DMF), de pentaméthyl-diéthylène triamine (PMDETA) et de l'amorceur précédemment synthétisé (DS-Br) sont dégazées à l'argon pendant 30 min. Un tricol surmonté d'un réfrigérant est mis sous vide puis conditionné sous argon. Le bromure de cuivre (Cu^IBr) et le DMF sont introduits et mis sous agitation jusqu'à dissolution complète du cuivre. Le ligand PMDETA est alors ajouté, suivi des monomères. L'amorceur est introduit en dernier et le milieu réactionnel est chauffé à 60°C, sous agitation et sous atmosphère inerte. La réaction est arrêtée au bout de 4-5 heures. Le rapport Cu^IBr/PMDETA/DS-Br est fixé à 2/2/1 pour l'ensemble des synthèses. Le degré de polymérisation théorique et le pourcentage volumique de DMF varient selon les synthèses (voir Tableau 1 du Chapitre 2). Des échantillons sont prélevés tout au long de la réaction via des seringues purgées, afin de déterminer le taux de conversion par gravimétrie. Le polymère formé est purifié par des cycles successifs de précipitation dans un mélange méthanol/eau (90/10) et de filtration, puis par passage sur une colonne d'alumine après solubilisation dans le THF.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm)

DS-PMAAtBu : 2,00-1,65 (m, CCH_2 , 2H), 1,40-1,30 (s, CH_3 , 9H), 1,15-0,90 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(HEMA-MAtBu) : 4,15 (s, CH_2OH , 1H), 3,85 (s, OCH_2 , 1H), 2,16-1,69 (m, CCH_2 , 2H), 1,52-1,34 (s, CH_3 , 4,5H), 1,25-0,80 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(DMAEMA-MAtBu) : 4,18 (s, OCH_2 , 0,2H), 2,74 (s, CH_2N , 0,2H), 2,40 (s, NCH_3 , 0,6H), 2,22-1,69 (m, CCH_2 , 2H), 1,55-1,32 (s, CH_3 , 8,1H), 1,22-0,80 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(MAnBu-MAtBu) : 3,97 (s, OCH_3 , 0,4H), 2,17-1,74 (m, CCH_2 , 2H), 1,66 (s, CCH_2 , 0,4H), 1,53-1,30 (s, CH_3 , 7,2H / s, CCH_2 , 0,4H), 1,19-0,85 (m, CCH_3 , 3,6H)

DS-P(PEGMA-MAtBu) : 4,12 (s, OCH_2 , 0,1H), 3,66 (s, OCH_2CH_2 , 2,6H), 2,16-1,69 (m, CCH_2 , 2H), 1,52-1,34 (s, CH_3 , 8,1H), 1,21-0,87 (m, CCH_3 , 3H)

Hydrolyse des ligands à base de méthacrylate de *tert*-butyle (MAtBu)

1 g de ligand polymère est solubilisé dans 10 mL de chloroforme. 2,7 mL d'acide trifluoroacétique sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant plusieurs jours, jusqu'à observer une précipitation complète du polymère. Le polymère hydrolysé est lavé avec du chloroforme puis filtré.

RMN ^1H (MeOD) δ (ppm)

DS-PMAA : 2,20-1,85 (m, CCH_2 , 2H), 1,25-1,05 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(HEMA-MAA) : 4,08 (s, CH_2OH , 1H), 3,78 (s, OCH_2 , 1H), 2,20-1,80 (m, CCH_2 , 2H), 1,25-0,80 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(DMAEMA-MAA) : 4,36 (s, OCH_2 , 0,2H), 3,56 (s, CH_2N , 0,2H), 3,03 (s, NCH_3 , 0,6H), 2,22-1,78 (m, CCH_2 , 2H), 1,42-0,90 (m, CCH_3 , 3H)

DS-P(MAnBu-MAA) : 4,02 (s, OCH_3 , 0,4H), 2,20-1,83 (m, CCH_2 , 2H), 1,69 (s, CCH_2 , 0,4H), 1,49 (s, CCH_2 , 0,4H), 1,29-0,965 (m, CCH_3 , 3,6H)

DS-P(PEGMA-MAA) : 4,14 (s, OCH_2 , 0,1H), 3,71 (s, OCH_2CH_2 , 2,6H), 2,20-1,75 (m, CCH_2 , 2H), 1,29-0,92 (m, CCH_3 , 3H)

Synthèse spécifique du DS-PDMAEMA

Dans le cas du PDMAEMA, la synthèse et la purification sont réalisées selon le protocole de Pantoustier *et al.*¹ qui consiste en une synthèse en *bulk* à 25°C avec un ratio $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Br}/\text{PMDETA}/\text{DS-Br}$ fixé à 1/2/1. Le polymère pris en masse est d'abord dissous dans une solution acide (pH 2) avant d'être précipité en augmentant le pH de la solution jusqu'à 12 et en chauffant le milieu à 65°C. Cette procédure est répétée plusieurs fois jusqu'à élimination complète des résidus de cuivre.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 4,05 (s, OCH_2 , 2H), 2,56 (s, CH_2N , 2H), 2,30 (s, NCH_3 , 6H), 2,00-1,80 (m, CCH_2 , 2H), 1,20-0,80 (m, CCH_3 , 3H)

SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR GREFFÉES POLYMÈRES

Le ligand polymère et la solution de HAuCl_4 , tous deux préalablement dissous dans du méthanol, sont agités pendant 30 minutes à température ambiante. Une solution de NaBH_4 préparée dans le méthanol est ensuite ajoutée rapidement, sous agitation vigoureuse. Un changement de couleur instantané du jaune au rouge traduit alors la formation des AuNPs. La solution est ensuite laissée sous agitation pendant 24 heures. Le rapport ligand polymère/ HAuCl_4 / NaBH_4 est fixé à 0,1/1/10 pour l'ensemble des synthèses. Les NPs sont précipitées par centrifugation. Elles sont ensuite solubilisées dans de l'eau et centrifugées à plusieurs reprises dans des tubes concentrateurs possédant un seuil de coupure de 100 kDa, afin d'éliminer une partie du polymère libre.

GREFFAGES POST-SYNTHESE

Greffage de la doxorubicine

Les Au-PMAA(10,6-B) sont solubilisées à 5 mg/mL dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,8. Les réactifs N-hydroxysuccinimide (NHS) et 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) sont ensuite ajoutés, et le milieu réactionnel est agité pendant deux heures à température ambiante. Le ratio MAA/NHS/EDC est fixé à 5/1/1. Après cette phase d'activation, une solution aqueuse de doxorubicine préparée à 10 mg/mL est ajoutée, de manière à obtenir un rapport MAA/doxorubicine de 40. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures. La purification s'effectue par deux dialyses dans l'eau (seuil de coupure 3,5 kDa).

Greffage des protéines

Le protocole est quasiment identique à celui décrit pour la doxorubicine. Un rapport d'une protéine pour 12 chaînes polymères est choisi. La purification s'effectue par dialyses à 3,5 kDa dans un premier temps, puis par plusieurs centrifugations réalisées dans des tubes concentrateurs avec un seuil de coupure à 100 kDa.

CARACTÉRISATIONS

RMN

Les spectres RMN sont obtenus sur un spectromètre Bruker AC-400. Les échantillons sont préparés dans des solvants deutérés (méthanol ou chloroforme).

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE (SEC)

Avec la technique de chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière multi-angles (SEC-MALS), la mesure des masses molaires est absolue et ne nécessite pas de calibration avec des polymères standards. La relation entre l'intensité mesurée et la masse molaire est définie sur l'équation (1) :

$$I(\theta) \propto c M \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (\text{A.1})$$

avec $I(\theta)$ l'intensité mesurée, M la masse molaire du polymère, c sa concentration massique et $\left(\frac{dn}{dc}\right)$ son incrément d'indice de réfraction dans le solvant utilisé.

La technique requiert par contre de connaître l'incrément d'indice de réfraction dn/dc du polymère analysé, valeur qui dépend du solvant dans lequel il est solubilisé. Les valeurs utilisées ici sont tirées de la littérature. Pour les copolymères, elles sont obtenues en appliquant la formule suivante² :

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)_{\text{copo}} = \sum w_i \left(\frac{dn}{dc}\right)_i \quad (\text{A.2})$$

avec w_i les fractions massiques des différents monomères calculées d'après les données RMN et $(dn/dc)_i$ les valeurs des homopolymères correspondants.

Certains dn/dc n'ayant pas été trouvés pour les solvants recherchés, des estimations sont réalisées à partir de cette deuxième formule² :

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)^{\text{solv A}} = \left(\frac{dn}{dc}\right)^{\text{solv B}} - (n_{\text{solv A}} - n_{\text{solv B}}) \quad (\text{A.3})$$

avec n_{solv} l'indice de réfraction du solvant considéré.

Tous les dn/dc calculés, ainsi que les références de littérature dont ils sont tirés, sont résumés dans le Tableau A.1.

Tableau A.1 - Valeurs de dn/dc utilisées pour les analyses en SEC-MALS

Polymère	dn/dc (mL/g)	
	Analyse SEC avant hydrolyse (THF)	Analyse SEC après hydrolyse (phosphate)
DS-PMAA	0,064 ³	0,175 ⁴
DS-PDMAEMA	0,080 ^{5,6}	/
DS-P(DMAEMA-MAA) (10/90)	0,066 ^{5,6}	0,172 ^{5,6}
DS-P(MAnBu-MAA) (20/80)	0,065 ^{3,7}	/
DS-P(MAnBu-MAA) (40/60)	0,065 ^{3,7}	/
DS-P(PEGMA-MAA) (10/90)	0,066 ⁸	0,159 ⁸
DS-P(HEMA-MAA) (50/50)	/	/

Les analyses SEC sont effectuées à partir d'un appareil HPLC Shimadzu muni de 2 colonnes OHpack-LB 800 (300 x 8,0 mm) (Shodex), couplé à un réfractomètre RID-20A (Shimadzu) et un MALS mini-Dawn TREOS (Wyatt). Les mesures sont réalisées dans le THF à 40°C pour les composés contenant du MAtBu et dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 9 à 40°C pour les composés hydrolysés. Dans le cas du DS-PDMAEMA, la mesure est réalisée en ajoutant 3% (v/v) de triéthylamine à la phase de THF. Les DS-P(MAnBu-MAA) et DS-P(HEMA-MAA) n'ont pas pu être analysés car ils ne sont pas suffisamment solubles dans le tampon phosphate.

SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Les spectres d'absorbance sont obtenus sur un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu UV-2450 à double faisceau.

ANALYSE THERMOGRAVIMÉTRIQUE (ATG)

Les mesures d'ATG sont réalisées sur un appareil Mettler-Toledo TGA/DSC. Les NPs sont introduites dans une coupelle en oxyde d'aluminium. La température est augmentée de 25 à 100°C à un taux de 20°C/min, puis un plateau de 10 minutes est observé à 100°C pour éliminer toute trace d'eau résiduelle. La température est ensuite augmentée jusqu'à 800°C afin d'éliminer toute la matière organique. Les mesures sont réalisées sous oxygène.

POTENTIEL ZÊTA

Les mesures sont réalisées sur un appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.), dans des cuves DTS1061 dédiées à la mesure du potentiel zêta. Les solutions de NPs sont préparées à des concentrations allant de 0,5 à 1 mg/mL, dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,5 préalablement filtré à 0,22 µm. Les mesures sont effectuées à 20°C, et la tension appliquée est autour de 150 V. Les valeurs rapportées correspondent à la moyenne d'au moins trois mesures, et l'écart-type rend compte de la distribution moyenne.

SPECTROMÉTRIE DE MASSE AVEC PLASMA A COUPLAGE INDUIT (ICP-MS)

Une solution mère est tout d'abord préparée à 10 mg/mL de NPs dans de l'eau ultrapure, à partir d'une poudre de NPs sèches. Elle est diluée une première fois d'un facteur 100 dans de l'eau ultrapure. 100 µL de cette solution sont ensuite mélangés à 100 µL d'eau régale (HCl/HNO₃ 2:1) afin de dissoudre le cœur d'or. Puis 9,8 mL d'une solution de HCl à 2% sont ajoutés pour constituer la solution d'analyse.

L'appareil utilisé est un iCAP Q ThermoElectron. La calibration externe est effectuée à partir de dilutions d'une solution d'or certifiée (SPEX, CertiPrep). Toutes les dilutions (échantillons et standards)

sont préparées par pesée, afin de connaître avec précision la dilution finale. Six mesures sont effectuées pour chaque échantillon. Les %_wAu sont obtenus à partir de la concentration en or mesurée, du facteur de dilution, et de la concentration initiale en NPs.

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE EN TRANSMISSION (TEM)

La préparation des échantillons de NPs s'effectue par dépôt de 3 µL d'une solution de AuNPs (préparée à 1 mg/mL environ dans l'eau) sur une grille de cuivre (mesh 200) recouverte d'un film de carbone et préalablement traitée par plasma. Après 30 secondes, l'excédent de solution est enlevé par contact avec un papier absorbant. Le séchage est effectué à l'air libre.

Les observations en TEM sont réalisées sur la plateforme Imagerie-Gif du CNRS. L'appareil est un microscope JEOL 1400, utilisé à une tension de 120 kV.

Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ (fonction *Analyze Particles* après application d'un *Threshold*). Pour chaque type d'objets, plusieurs centaines de NPs ont été analysées afin d'avoir un échantillon statistiquement représentatif.

DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES (SAXS)

Les solutions de NPs analysées en SAXS sont préparées à une concentration en or de 0,2 mg/mL dans les différents milieux aqueux choisis (eau ultrapure, DPBS, DMEM, DMEM + 10% FBS, DMEM +10 % FBS exposé à des cellules) et injectées dans des capillaires de verre borosilicate de diamètre 1,0 mm ou 1,5 mm.

Les mesures sont réalisées sur deux appareils :

- L'appareil XEUSS 2.0 de la plateforme SWAXS-Lab (LLB / NIMBE). L'énergie du faisceau est de 8 keV, et une distance échantillon-détecteur de 119 cm a été utilisée. La gamme de q analysée est comprise entre $5 \cdot 10^{-3}$ et $0,6 \text{ \AA}^{-1}$. Les durées d'acquisition sont de 30 minutes ou 1 heure selon les échantillons.
- La ligne SWING du synchrotron Soleil. L'énergie du faisceau est de 16 keV, et deux distances échantillon-détecteur ont été utilisées : 6,20 m (configuration WAXS) et 0,52 m (configuration SAXS). La gamme de q totale analysée est comprise entre $3 \cdot 10^{-3}$ et $2,5 \text{ \AA}^{-1}$. Les durées d'acquisition sont de 5x2 secondes en SAXS et 5x10 secondes en WAXS.

Sur le XEUSS, la calibration de la distance échantillon-détecteur est réalisée avec le tétradécanol, tandis que le Lupolen et l'eau sont utilisés pour normaliser les coups mesurés par le détecteur en section efficace différentielle par volume.⁹

Sur la ligne SWING, une procédure différente est appliquée pour traiter les données, car des problèmes de normalisation sont observés, notamment entre les configurations SAXS et WAXS :

- Détermination du facteur de normalisation à partir du Lupolen. Il a été vérifié que ce facteur, une fois appliqué à l'eau (WAXS) après soustraction du capillaire vide, permettait de retrouver les valeurs attendues pour l'eau.

Puis, pour chaque échantillon :

- Soustraction du capillaire vide
- Application d'un facteur pour ajuster le signal en WAXS sur la bosse de l'eau, qui est ici prise comme référence
- Application d'un facteur pour ajuster le signal en SAXS sur le signal en WAXS
- Concaténation des signaux en SAXS et WAXS
- Soustraction du solvant correspondant

Le traitement des données est réalisé sur le programme PYSAXS¹⁰ et les modélisations sur le programme SASview.¹¹

DIFFUSION DES NEUTRONS AUX PETITS ANGLES (SANS)

Les solutions de NPs analysées en SANS sont préparées dans du D₂O à une concentration en NPs de 3 à 15 mg/mL. Celles contenant des protéines sont préparées dans un tampon phosphate deutéré 10 mM pH 6,7. Pour effectuer les mesures, les solutions sont placées dans des cuves en quartz de 2 mm d'épaisseur.

Les mesures sont réalisées sur le spectromètre PACE du LLB (CEA Saclay). Trois configurations sont utilisées : D = 1 m, λ = 6 Å ; D = 4,7 m, λ = 6 Å, D = 4,7 m, λ = 13 Å. Les durées d'acquisition sont respectivement de 15 minutes, 1 heure et 2 heures. La gamme de q couverte est comprise entre 3.10⁻³ et 3,5.10⁻¹ Å⁻¹. Les valeurs absolues des intensités diffusées sont obtenues après soustraction du signal de la cuve vide (CV) et du bruit de fond (bdf), et après normalisation par rapport à l'épaisseur e de l'échantillon et à sa transmission T, selon l'expression suivante :

$$I_{abs} = \frac{\frac{I_{éch} - I_{bdf}}{T_{éch} e_{éch}} - \frac{I_{CV} - I_{bdf}}{T_{CV} e_{CV}}}{\frac{I_{H_2O} - I_{bdf}}{T_{H_2O} e_{H_2O}} - \frac{I_{CV} - I_{bdf}}{T_{CV} e_{CV}}} \quad (A.4)$$

Le traitement des données est réalisé sur le programme PASiNET (LLB) et les modélisations sur le programme SASview.

DICHOÏSME CIRCULAIRE

Les solutions sont préparées à diverses concentrations dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7,8. Il a été vérifié au préalable que ce tampon ne générerait aucun signal en dichroïsme circulaire.

Les mesures sont effectuées sur le dichrographe Chirascan™ (Applied Photophysics), situé au LLB. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz de 1 mm de trajet optique. Les spectres sont mesurés de 185 à 300 nm avec un pas de 1 nm et un temps de mesure de 1 seconde par point. La température est fixée à 25°C.

Les analyses de structure secondaire sont réalisées directement sur le site internet BeStSel.¹²

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE

La solution de NPs est préparée à environ 1 mg/mL dans l'eau. L'échantillon a été préparé par dépôt de 1,5 µL de cette solution sur un wafer de silicium préalablement traité à l'UV-ozone pendant 30 minutes.

Les observations ont été effectuées sur un microscope Ultra 55 Carl Zeiss, situé au LEDNA (NIMBE, CEA). La tension utilisée est comprise entre 3 et 10 kV. Les images sont obtenues à partir des électrons rétrodiffusés.

TESTS *IN VITRO*

DIFFUSION DANS LA MEC

Le support et le peigne utilisés pour les tests de diffusion ont été fabriqués sur mesure par impression 3D d'acide polylactique (Figure A.1).

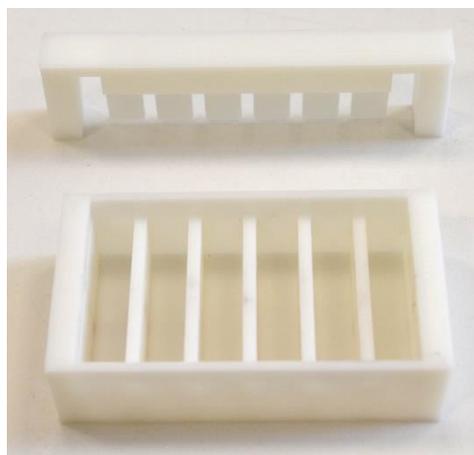


Figure A.1 - Support et peigne utilisés pour les tests de diffusion

L'ensemble du matériel (cônes, tubes, supports) est placé au congélateur avant toute manipulation du Matrigel®. Les aliquotes de Matrigel® préparées à 8 mg/mL de protéines dans du DPBS 1X sont mises au frigo sur la nuit pour décongeler. En présence du peigne, 750 µL de cette solution de Matrigel® sont injectés par piste, dans le support. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures dans une atmosphère saturée en humidité, pour que le Matrigel® gélifie. Le peigne est ensuite retiré, et on ajoute 30 µL par puits ainsi formé d'une solution de NPs préparée à 10 mg/mL dans du DPBS 1X. L'ensemble est de nouveau placé en incubation dans les mêmes conditions.

Après une durée définie, pendant laquelle les NPs ont pu diffuser dans le Matrigel®, le support est pris en photo, avec un système de positionnement et d'éclairage maîtrisés, situé au LAPA (NIMBE, CEA). Les profils de diffusion sont ensuite obtenus par analyse des photographies avec le logiciel ImageJ. La modélisation des profils est effectuée avec le logiciel Origin.

CULTURE CELLULAIRE

Trois lignées cellulaires sont utilisées dans ce projet, toutes fournies par l'ATCC : B16F10 (mélanome murin), L929 (fibroblaste murin) et U87MG (glioblastome humain). Elles sont cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est saturée en humidité et contient 5% de CO₂. Les passages (procédé de sous-culture) sont effectués avec de la trypsine 0,05% (m/v), lorsque les cellules se trouvent à 80% de confluence environ. Pour l'ensemencement des différents tests, le comptage des cellules est effectué avec une cellule de Malassez.

CAPTATION CELLULAIRE

Les échantillons sont préparés selon le protocole suivant : les cellules B16F10 sontensemencées dans des plaques de 6 puits, à une densité de 350 000 cellules par puits. Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est remplacé par 2 mL d'une solution de NPs à 0, 0,5, 2,2, 5 ou 22 µg/mL d'or, préparée la veille dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine. Après une incubation de durée variable avec les NPs, deux lavages sont effectués avec du DMEM supplémenté, puis un troisième avec du DPBS 1X (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*). Les cellules sont ensuite trypsinées et collectées par centrifugations. 100 µL d'eau régale pure (HCl/HNO₃ 2:1) sont ajoutés pour digérer les culots cellulaires et dissoudre les AuNPs. Les échantillons sont tout d'abord passés aux ultrasons pendant 30 minutes, puis agités à 75°C sur une nuit. Après une deuxième sonication de 30 minutes, 100 µL de la solution sont mélangés avec 9,9 mL de HCl 2%. La dilution est ensuite filtrée à travers une membrane en PTFE de taille de pores 0,45 µm. La mesure de la

concentration en or est réalisée en ICP-MS, de la même manière que pour l'analyse des %_wAu des NPs (voir description page 235). Chaque condition est effectuée en triplicata.

Le nombre de cellules final est estimé à 1 million par échantillon (1 échantillon = 1 puits), d'après un comptage effectué sur plusieurs échantillons, en utilisant une cellule de Malassez.

OBSERVATION DE CELLULES EN MEB

Pour préparer les échantillons, les cellules B16F10 sont cultivées sur des morceaux de wafer de silicium recouverts d'une couche d'oxyde de 150 nm d'épaisseur environ. Ces wafers sont préalablement nettoyés dans divers solvants et par traitement à l'UV-ozone. Avant l'ensemencement, ils sont stérilisés par irradiation UV sous une hotte stérile pendant 15 minutes et placés dans des plaques de 12 puits. Ils sont ensuite incubés avec un faible volume de sérum de veau foetal pendant 50 minutes. Le rinçage du sérum est effectué avec du DPBS. 90 000 cellules sont alorsensemencées par puits. Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est remplacé par 1 mL d'une solution de NPs à 0 ou 22 µg/mL d'or, préparée la veille dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine. Après une incubation de 18h avec les NPs, trois lavages sont effectués avec du DMEM sans sérum préalablement chauffé à 37°C.

Après aspiration du milieu, les cellules sont ensuite fixées pendant 30 minutes avec une solution de glutaraldéhyde préparée à 2,5% dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4. Trois lavages sont effectués avec ce même tampon, puis un rinçage est réalisé avec de l'eau ultrapure. La déshydratation s'effectue ensuite par des bains successifs de 10 minutes dans des mélanges éthanol/eau de concentrations croissantes en éthanol : 50/70/90/100/100%. Pour sécher les échantillons, deux derniers bains sont réalisés dans de l'hexaméthylsilazane. Le séchage est effectué à l'air libre, sous hotte.

OBSERVATION DE CELLULES EN TEM

Les cellules B16F10 sont cultivées pour l'observation en TEM dans des chambres de culture sur lame de verre contenant un puits par chambre (*chamber slides*, Thermo Fisher). 200 000 cellules sontensemencées dans chaque puits. Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est remplacé par 2 mL d'une solution de NPs à 0 ou 22 µg/mL d'or, préparée la veille dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine. Après une incubation de 18h avec les NPs, trois lavages sont effectués avec du DMEM ou du DPBS (voir protocoles ci-dessous).

Les cellules doivent ensuite être fixées, déshydratées, puis incluses dans une résine époxy. Le premier protocole testé est décrit dans le Tableau A.2. Des coupes de 80-90 nm d'épaisseur sont ensuite

réalisées avec un ultramicrotome. Ces coupes sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film formvar/carbone, puis elles sont contrastées avec de l'acétate d'uranyle.

Tableau A.2 - Premier protocole testé pour la fixation, déshydratation et inclusion des cellules pour l'observation en TEM

Cellules contrôles et exposées aux NPs
Rinçages DPBS x3
Glutaraldéhyde 2,5% dans tampon sodium cacodylate 0,2M à pH 7,4, 30 min
Rinçages cacodylate x3
30% éthanol 10 min
50% éthanol 10 min
70% éthanol 10 min
90% éthanol 10 min
100% éthanol 10 min
100% éthanol 10 min
Résine époxy 30% 1h
Résine époxy 50% 1h
Résine époxy 90% 1h
Résine époxy pure nuit
Polymérisation 24 h à 60°C

D'autres protocoles sont testés dans un deuxième temps (Tableau A.3). L'objectif est notamment d'améliorer le contraste des structures lipidiques avec l'utilisation d'osmium, mais aussi d'augmenter la taille des AuNPs par une amplification à l'argent (silver) dans certains cas (Silver enhancer kit, Sigma-Aldrich). Le thiosulfate (contenu dans le kit) sert ici à stopper cette réaction d'amplification. L'amplification à l'argent a parfois été précédée d'un traitement avec de la saponine, qui permet de perméabiliser les membranes pour favoriser la pénétration de la solution. La suite des protocoles (post-inclusion) est identique à celui décrit précédemment, exceptée l'utilisation de citrate de plomb au lieu de l'acétate d'uranyle comme agent de contraste.

Tableau A.3 - Deuxième série de protocoles testés pour la fixation, déshydratation et inclusion des cellules pour l'observation en TEM

Cellules contrôles		Cellules exposées aux NPs				
Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5	Condition 6	Condition 7
Rinçage DMEM sans sérum chauffé à 37°C						
Glutaraldéhyde 2,5% dans tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, 30 min						
Rinçages phosphate x3						
Saponine 0,1% dans phosphate 1h					Saponine 0,1% dans phosphate 1h	
Rinçages phosphate x2						
Rinçage eau	Rinçage phosphate	Rinçage phosphate	Rinçage eau	Rinçage phosphate	Rinçage eau	Rinçage eau
Silver 10 min			Silver 10 min		Silver 5 min	Silver 10 min
Rinçages eau x2						
Thiolsulfate 3min			Thiolsulfate 3min		Thiolsulfate 3min	Thiolsulfate 3min
Rinçages eau x2						
Osmium 0,25% dans eau 30 min						
Rinçages eau x3						
50% éthanol 1h						
70% éthanol 10 min						
90% éthanol 10 min						
100% éthanol 10 min						
100% éthanol 10 min						
Résine époxy 50% 2 h						
Résine époxy pure nuit						
Résine époxy pure 4h						
Polymérisation 24 h à 60°C						

CYTOTOXICITE

Pour les tests MTT, les cellules L929 sontensemencées dans des plaques de 96 puits, à une densité de 2500 cellules/puits (50 µL/puits). Après une nuit d'incubation, on ajoute 50 µL de différentes solutions de NPs préparées la veille dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine, de manière à obtenir des concentrations finales en or comprises entre 0 et 50 µg/mL. Les cellules sont exposées aux NPs pendant 48h. Les solutions de NPs sont alors remplacées par 100 µL de DMEM supplémenté, auxquels sont ajoutés 25 µL d'une solution de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT) préparée à 5 mg/mL dans le DMEM supplémenté. Après une incubation de 2h, le milieu est éliminé, et 200 µL de DMSO sont ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan formés. Les mesures d'absorbance à 570 nm sont réalisées, après homogénéisation par agitation, sur un Spectramax Plus 384 (Molecular Devices). Chaque condition est

répétée sur 6 puits. La viabilité cellulaire est calculée comme le ratio d'absorbance moyenne entre les cellules contrôles (traitées avec du DMEM supplémenté + amphotéricine B et gentamicine) et les cellules exposées aux NPs.

Pour les tests de cytotoxicité effectués sur wafer, les conditions de culture cellulaire sont telles que celles décrites dans le paragraphe « Observation de cellules en MEB », mais adaptées à des plaques de 24 puits (45 000 cellules par puits). Chaque condition (contrôle et NPs) est répétée sur 4 puits.

IRRADIATION DES SOLUTIONS DE NPS

Des solutions de NPs préparées à 2,6 mg/mL dans l'eau sont irradiées avec une GammaCell 3000 Elan équipée d'une source de césium 137 qui émet des rayons γ d'énergie 660 keV.

Les doses moyennes reçues par les échantillons sont déterminées par une dosimétrie de Fricke. Cette méthode consiste à irradier une solution acide contenant des ions Fe^{2+} , qui vont être convertis en Fe^{3+} par réaction avec différents produits issus de la radiolyse de l'eau. La formation des ions Fe^{3+} est suivie par spectrophotométrie UV-visible (303 nm). Le rendement radiolytique de cette réaction étant connu, on peut remonter à la dose absorbée par la solution de Fricke pour un temps d'irradiation donné (Equation 5), et ainsi constituer une courbe de calibration qui permet de déterminer le débit de dose de l'irradiateur.¹³ Le débit de dose est ici déterminé à 4,1 Gy/minute.

$$Dose = \frac{\Delta A_{303 \text{ nm}}}{\varepsilon_{303 \text{ nm}} G(Fe^{3+}) \rho l} \quad (A.5)$$

avec $\Delta A_{303 \text{ nm}}$ l'augmentation d'absorbance de la solution à 303 nm, $\varepsilon_{303 \text{ nm}}$ la différence de coefficient d'extinction molaire entre Fe^{3+} et Fe^{2+} à 303 nm (valeur utilisée de $2205 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $G(Fe^{3+})$ le rendement radiolytique de cette réaction (15,6 molécules/100 eV à 25°C), ρ la densité de la solution de Fricke ($1,024 \text{ g/cm}^3$) et l le trajet optique de la cuve.

La solution de Fricke est préparée en diluant 22 mL d'acide sulfurique à 99% dans 250 mL d'eau déionisée, puis en ajoutant 0,06 g de NaCl et 0,392 g de sulfate de fer (II). Le volume est ensuite complété jusqu'à 1L avec de l'eau déionisée, et la solution résultante est conservée à l'abri de la lumière pendant 24h avant toute utilisation.

CLONOGÉNÉCITÉ

Irradiation avec l'iode 131

Les cellules B16F10-NIS sontensemencées dans des plaques 12 puits, à une densité de 400 cellules par puits. Après une nuit d'incubation, on ajoute 1 mL de différentes solutions de NPs préparées la veille

dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine, de manière à obtenir des concentrations finales en or comprises entre 0 et 25 µg/mL. Les cellules sont exposées aux NPs pendant 2h. Trois lavages au DPBS sont effectués, et les cellules sont alors exposées à une solution d'iode 131 d'activité 0,2 MBq pendant 4h, en présence ou non de perchlorate de sodium.

Une dizaine de jours après l'irradiation, le milieu est aspiré et 500 µL d'une solution de cristal violet sont ajoutés par puits, afin de colorer les clones formés. La solution de cristal violet est préparée en mélangeant 0,1 g de cristal violet, 5,4 mL de formaldéhyde à 37%, 20 mL de PBS 10X, 2 mL de méthanol et 173 mL d'eau ultrapure. L'incubation avec cette solution se fait pendant 20 minutes, puis elle est éliminée. Le comptage des clones formés est effectué manuellement, seuls les clones dont la taille est supérieure à un seuil défini sont comptabilisés.

Chaque condition est répétée en trois exemplaires. Le pourcentage de survie cellulaire est obtenu à partir du ratio du nombre de clones moyen entre les cellules contrôles (sans NPs et en présence de perchlorate de sodium) et les cellules traitées (exposées aux NPs et/ou sans perchlorate).

Irradiation en protons

Les cellules B16F10 sontensemencées dans des flacons T25, à une densité de 650 cellules par flacon. Les flacons sont utilisés à la verticale. Après une nuit d'incubation, on ajoute 1,7 mL de différentes solutions de NPs préparées la veille dans du milieu de culture contenant 0,25 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL de gentamicine, de manière à obtenir des concentrations finales en or comprises entre 0 et 6 µg/mL. Les cellules sont exposées aux NPs pendant 4h. Deux lavages au DPBS sont alors effectués, et 1 mL de milieu de culture avec antibiotiques est ajouté par flacon.

Les flacons sont transportés jusqu'au Centre Antoine Lacassagne (CAL), où ils sont irradiés par un faisceau de protons de 65 MeV. Les échantillons non irradiés subissent également le transport. L'irradiation s'effectue sur deux flacons à la fois, couchés à l'horizontale et placés derrière des cales de plexiglas (équivalentes à l'eau), de manière à centrer le pic de Bragg sur la couche de cellules. Deux doses sont appliquées : 0,25 et 0,75 Gy. Les flacons sont ensuite remis en incubation après y avoir ajouté 3 mL de milieu. Le temps passé hors incubateur est estimé à 2h30-3h. 7 jours après l'irradiation, la coloration des clones est effectuée de la même manière que pour l'irradiation avec l'iode 131.

Les contrôles (sans NPs) sont réalisés en cinq exemplaires, et les conditions exposées aux NPs en trois exemplaires. Le pourcentage de survie cellulaire est obtenu à partir du ratio du nombre de clones moyen entre les cellules contrôles (sans NPs et non irradiées) et les cellules traitées (exposées aux NPs et/ou irradiées).

RADIOSENSIBILISATION *IN VIVO*

Des souris femelles athymiques Balb/c âgées de 8 semaines (Janvier, France) sont utilisées pour l'étude *in vivo*. 1 million de cellules B16F10-NIS sont injectées en sous-cutané au niveau du flanc de chaque souris. A J+6, lorsque la taille de la tumeur est d'environ 100 mm³, les souris sont aléatoirement réparties entre 4 groupes de 5 souris chacun : contrôle (solution saline), Au-PMAA, iode 131, iode 131 + Au-PMAA. Les NPs sont administrées à J+6 par 3 injections intratumorales réparties à différents endroits de la tumeur. Environ 10 µL d'une solution contenant 1 mg/mL d'or sont ainsi injectés dans chaque tumeur. L'iode 131 est administré à J+7 par voie intrapéritonéale (injection dans la cavité péritonéale, qui est l'espace situé entre les deux membranes qui tapissent l'intérieur de l'abdomen et qui recouvrent les organes tels que l'estomac, le foie, le pancréas, etc.). La dose injectée à chaque souris est de 22 MBq.

Après les traitements, les souris sont surveillées et les dimensions des tumeurs sont mesurées régulièrement. Le volume tumoral est estimé en prenant pour hypothèse que les tumeurs ont une forme d'ellipsoïde.

TESTS STATISTIQUES

Les études statistiques sont réalisées sur les logiciels Prism (GraphPad software) et Rstudio.¹⁴ Différents modèles statistiques sont utilisés pour comparer les données : test de Student, analyse de la variance (ANOVA), ou modèle linéaire.

La significativité d'un test est évaluée par la mesure statistique nommée p-valeur. Elle représente la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle si elle est vraie (dans notre cas, l'hypothèse qu'il n'y a pas de différence observée entre deux conditions). Plus sa valeur est faible, plus le test est statistiquement significatif. En pratique, on la compare à différents seuils : 0,1 / 0,05 / 0,01 / 0,001.

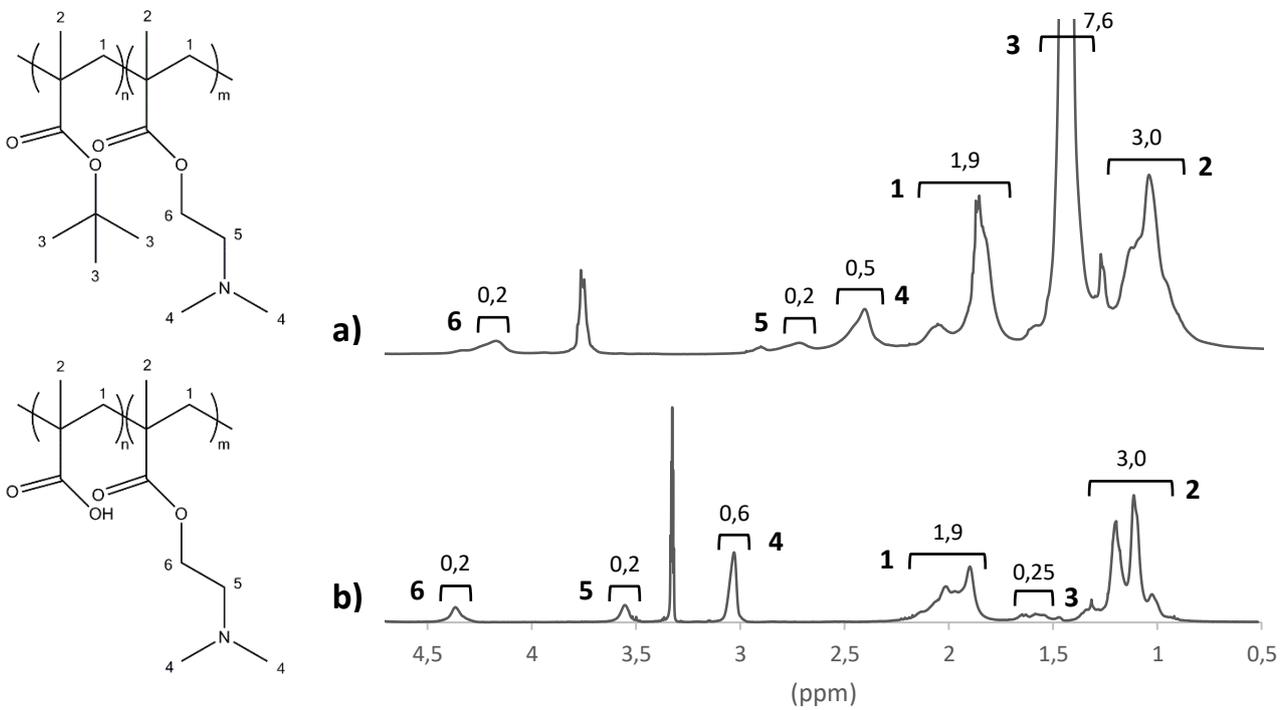
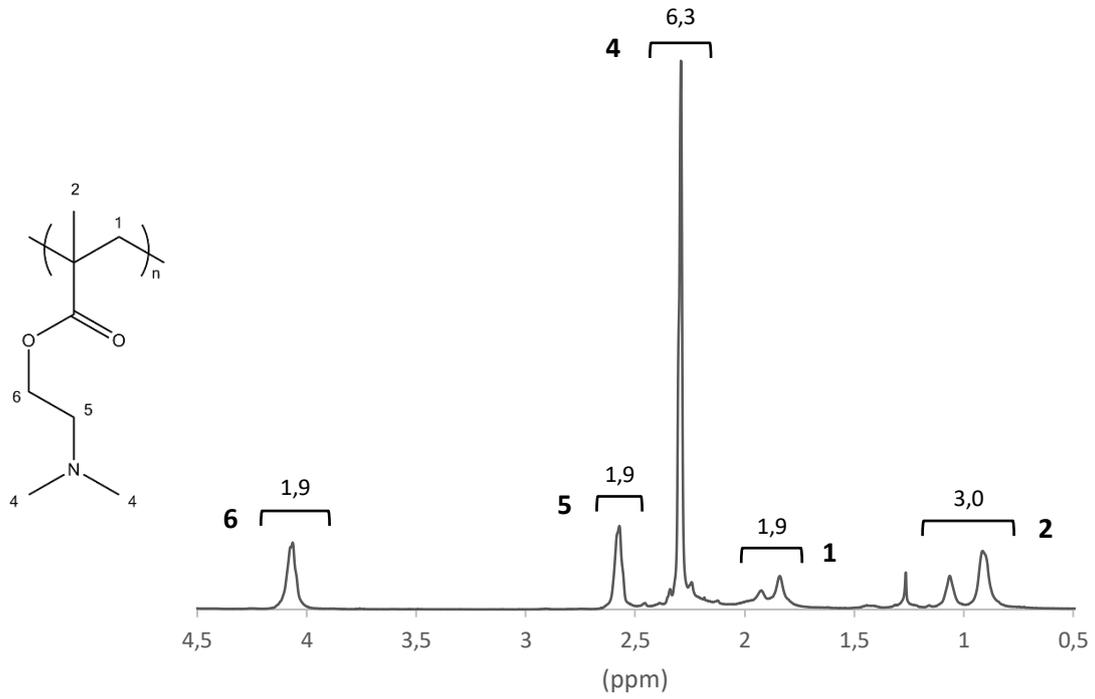
MESURES PIXE

Le fantôme utilisé pour les mesures au Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie est réalisé dans une boîte de Pétri de 3,6 cm de diamètre. Un gel d'agarose *low-melting* est préparé à 5% en masse dans de l'eau ultrapure. 2 mL sont coulés dans la boîte de Pétri, en présence d'un plot de 2 cm de diamètre situé au centre. Après gélification, le plot est retiré et 0,6 mL du même gel contenant 7 mg d'or sous forme de Au-PMAA sont injectés dans le trou ainsi formé.

Les mesures réalisées au Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie à 230 MeV sont effectuées avec le détecteur situé en amont de l'échantillon, à environ 45°. Le détecteur utilisé est un XR-100CdTe

(AMPTEK). La durée d'acquisition est de 600 secondes. Sur cette durée, la charge est d'environ 9300 nC, ce qui correspond à un flux de photons d'environ $9,7 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$.

Annexe B : Spectres RMN



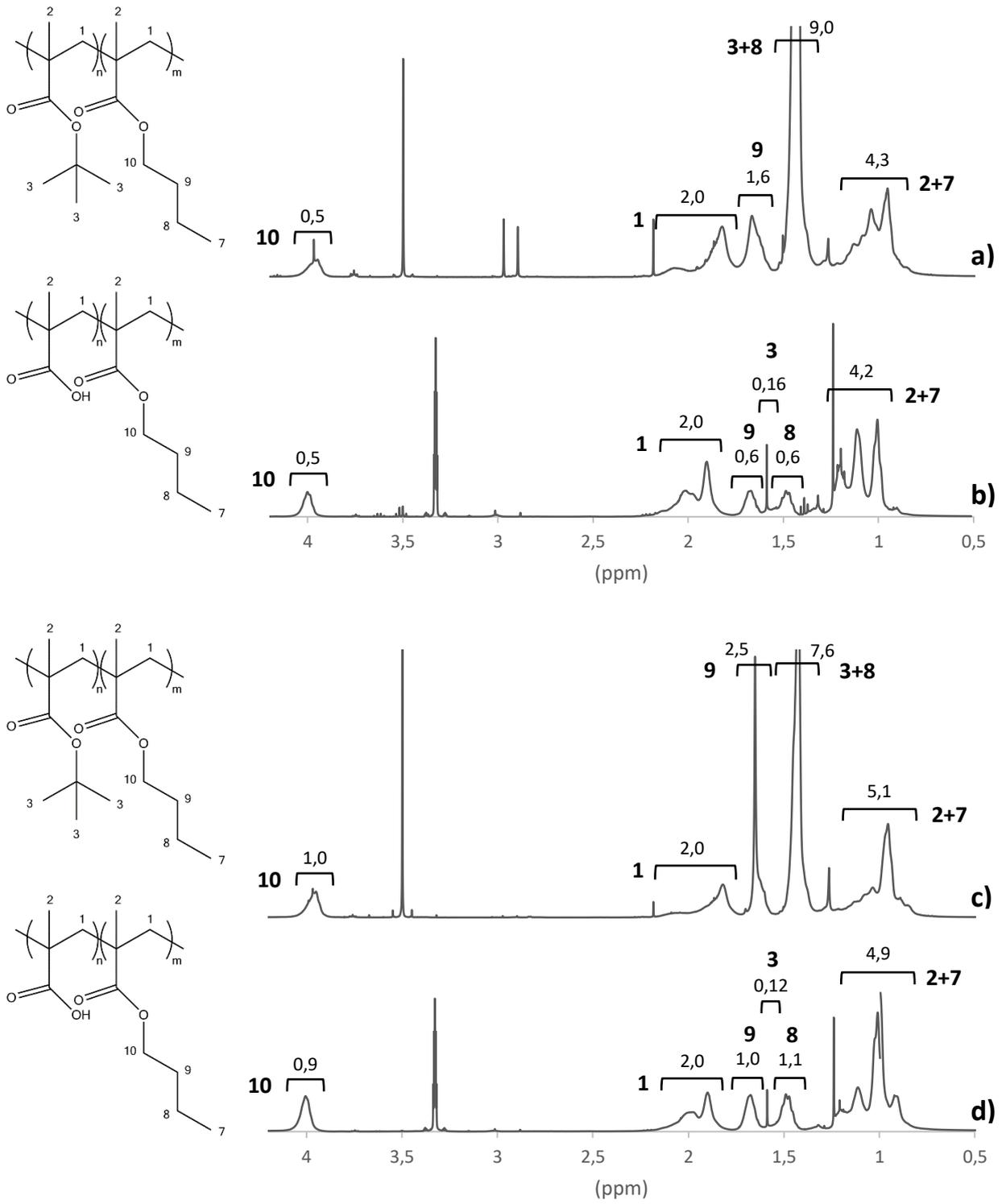


Figure A.4 - Spectres RMN ^1H des ligands (a) DS-P(MANBu-MATBu) (20/80), (b) DS-P(MANBu-MAA) (20/80), (c) DS-P(MANBu-MATBu) (40/60) et (d) DS-P(MANBu-MAA) (20/80)

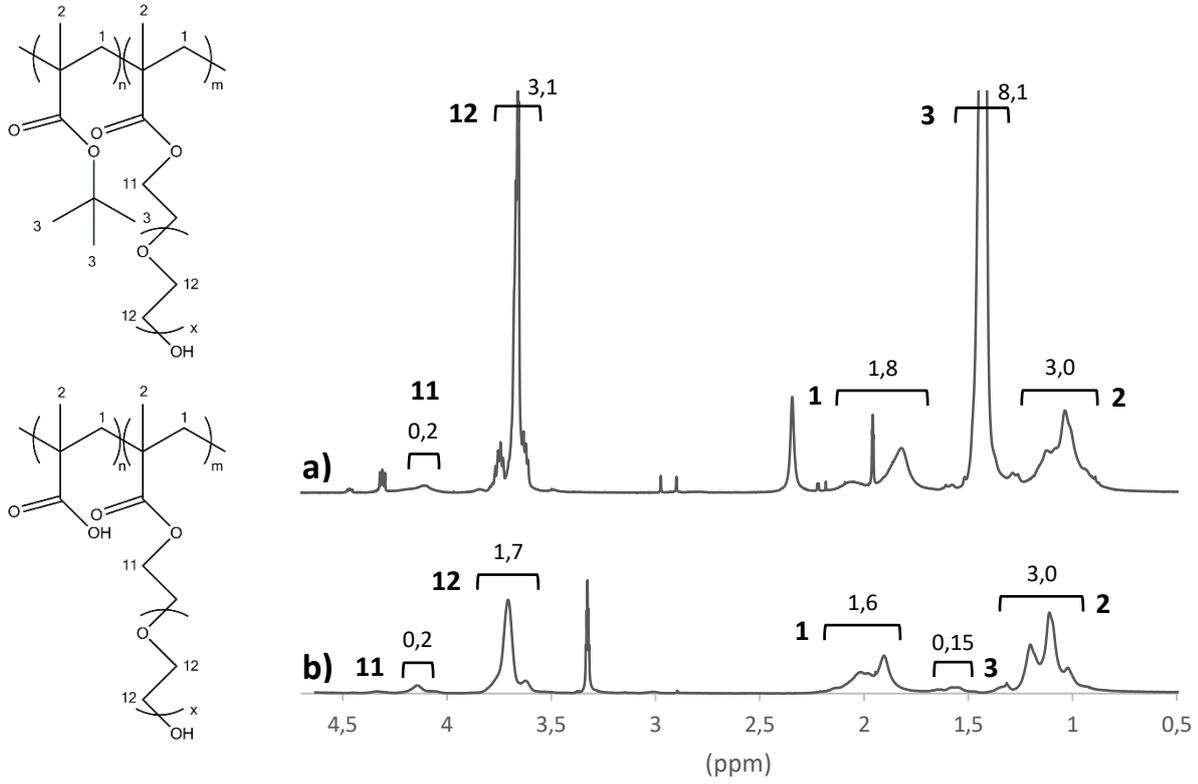


Figure A.5 - Spectres RMN ^1H des ligands (a) DS-P(PEGMA-MAtBu) et (b) DS-P(PEGMA-MAA)

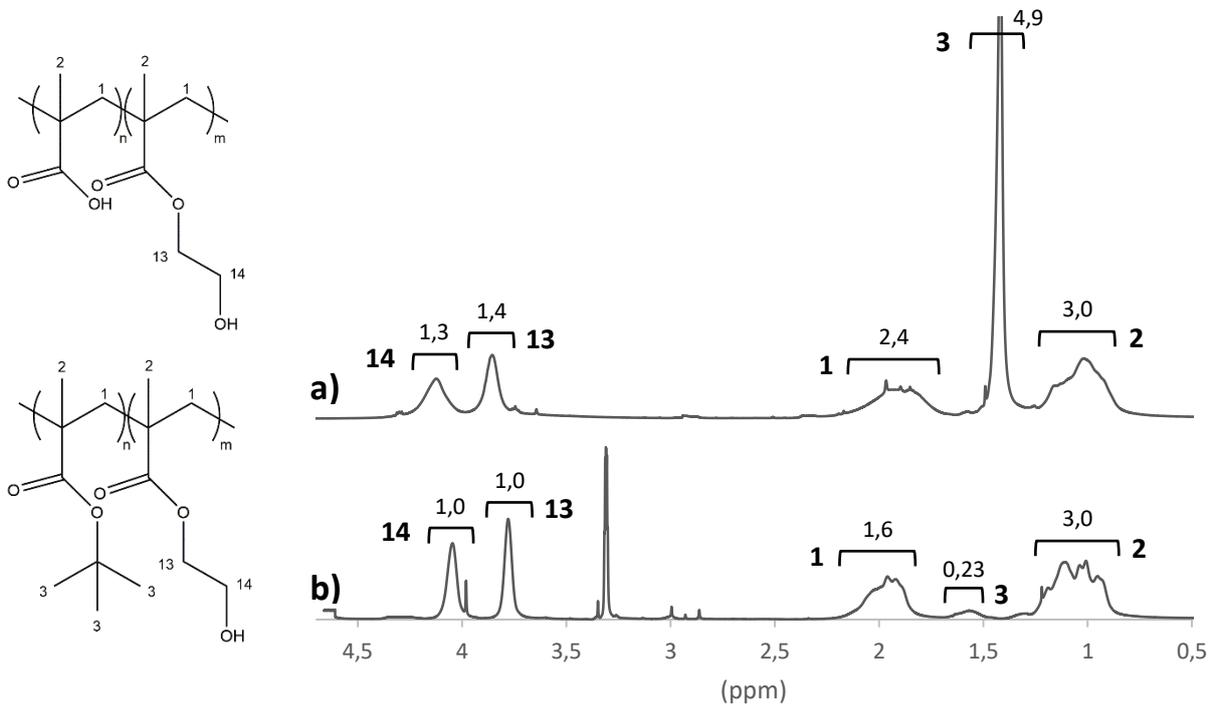


Figure A.6 - Spectres RMN ^1H des ligands (a) DS-P(HEMA-MAtBu) et (b) DS-P(HEMA-MAA)

Annexe C : Spectres UV-visible

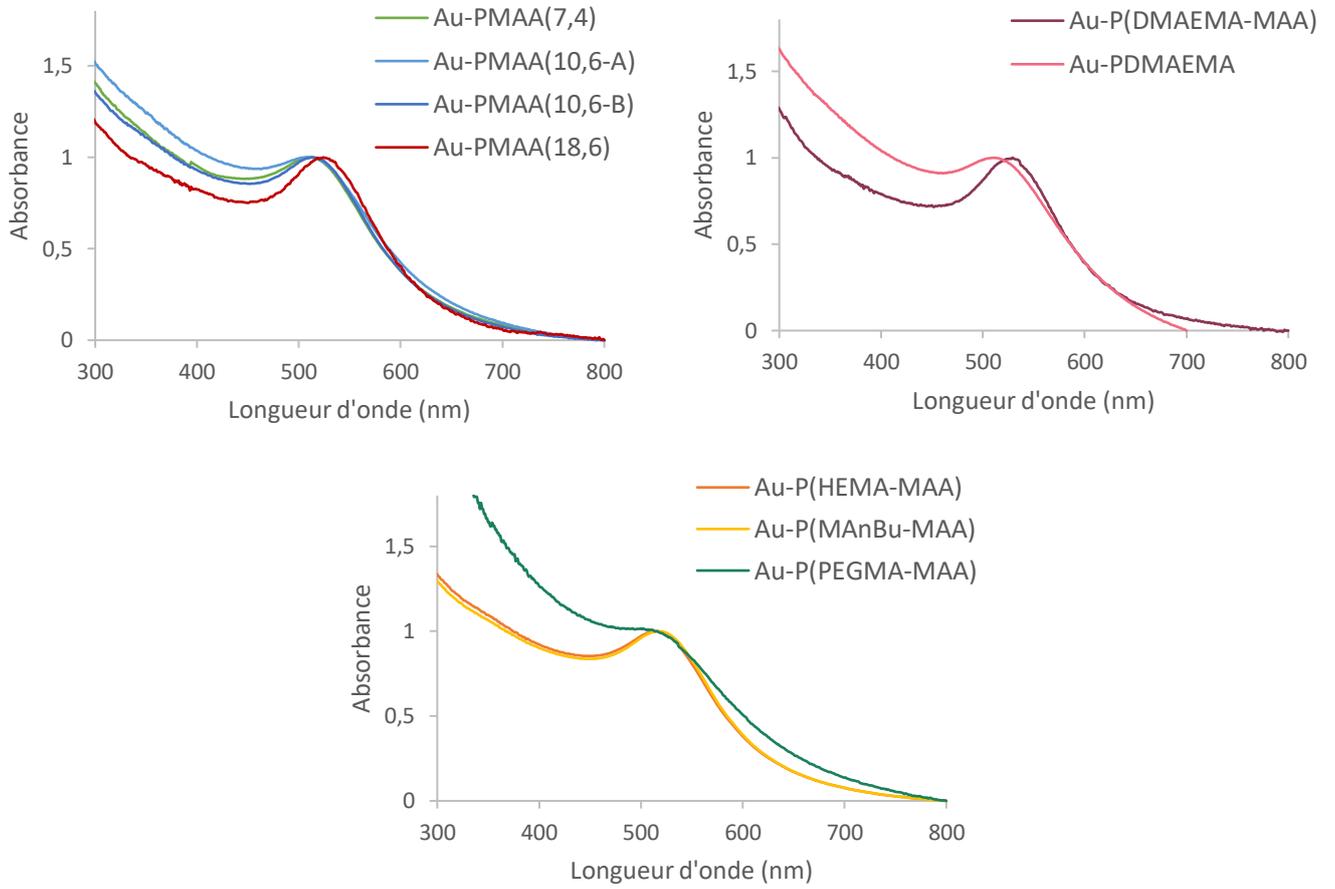


Figure A.7 - Spectres UV-visible des AuNPs dans l'eau (normalisés par la valeur maximale du pic plasmon)

Annexe D : Diffusion de rayonnements aux petits angles

Les techniques de diffusion du rayonnement (lumière, rayons X, neutrons) permettent de caractériser les propriétés structurales de solides, liquides ou gels. Dans cette étude, nous avons utilisé la diffusion de rayons X et de neutrons aux petits angles pour déterminer la taille et la forme de nos nano-objets.

PRINCIPES DES TECHNIQUES

MESURES

Les expériences de diffusion de rayonnements (rayons X ou neutrons) aux petits angles consistent à envoyer sur l'échantillon à étudier un faisceau monochromatique de longueur d'onde moyenne λ et de faible divergence incidente (Figure A.8).¹⁵ On mesure alors, grâce à un détecteur plan, la variation de l'intensité diffusée $I(\theta)$ en fonction du vecteur de diffusion \vec{q} , qui est relié à l'angle de diffusion θ et à la longueur d'onde λ du faisceau par l'expression suivante :

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (A.6)$$

La gamme de q choisie doit être adaptée en fonction des dimensions caractéristiques de l'échantillon que l'on cherche à analyser ($R \sim 1/q$). Pour ce faire, on peut jouer à la fois sur la longueur d'onde du faisceau et sur la distance échantillon-détecteur.

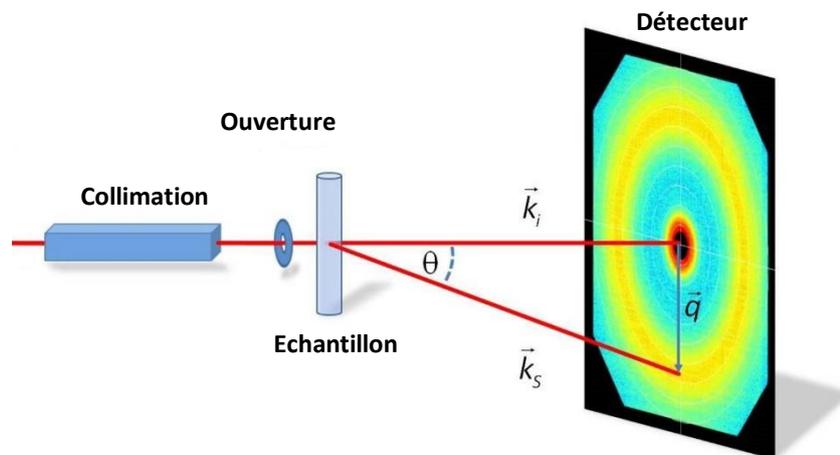


Figure A.8 - Schéma du dispositif typiquement utilisé en diffusion aux petits angles ¹⁶

INTENSITÉ DIFFUSÉE

Le signal $I(q)$ obtenu après traitement des données peut s'écrire sous la forme suivante, dans le cas d'objets centrosymétriques :

$$I(q) = \Phi V_{\text{objet}} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (\text{A. 7})$$

avec $\Delta\rho$ la différence entre les densités de longueur de diffusion de l'objet diffusant et du solvant, Φ la fraction volumique des objets diffusants, V_{objet} le volume des objets diffusants, $P(q)$ le facteur de forme, qui décrit la taille et la forme des objets diffusants, et $S(q)$ le facteur de structure, qui décrit les interactions entre les objets diffusants. Lorsqu'on travaille en milieu suffisamment dilué, on peut négliger les interactions entre les objets, et donc considérer $S(q)$ comme égal à 1.

CONTRASTE

Pour obtenir une intensité diffusée suffisamment élevée, il faut que le contraste soit bon entre les objets diffusants et le solvant, c'est-à-dire que $\Delta\rho$ soit élevé. La densité de longueur de diffusion d'un objet diffusant diffère pour les rayons X et les neutrons.

Les rayons X sont diffusés par les électrons des atomes. La densité de longueur de diffusion dépend donc du nombre d'électrons n_e contenus dans l'objet diffusant et de la densité de longueur de diffusion r_e produite par un seul électron (appelée facteur de Thomson) : ¹⁷

$$\rho = \frac{N_A d}{M} n_e r_e \quad (\text{A. 8})$$

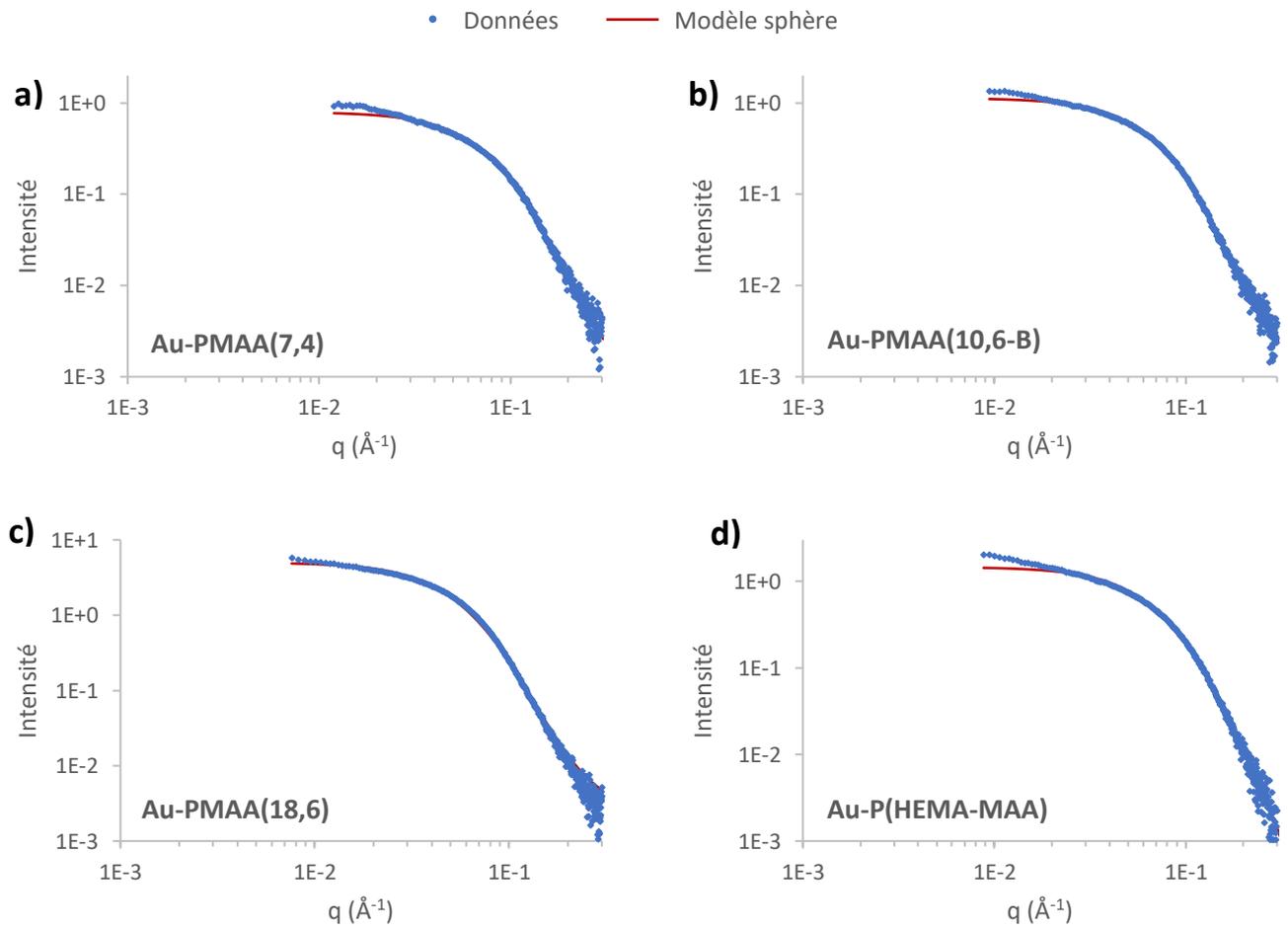
avec N_A le nombre d'Avogadro, d la densité de l'objet diffusant en g/cm et M sa masse molaire en g/mol. r_e est égal à $2,8 \cdot 10^{-15}$ m.

Les neutrons sont eux diffusés par les noyaux des atomes. La densité de longueur de diffusion de l'objet diffusant se calcule donc à partir des longueurs de diffusion cohérente b_i des atomes qui le constituent, selon l'expression suivante : ¹⁵

$$\rho = \frac{N_A d}{M} \sum_i a_i b_i \quad (\text{A. 9})$$

avec a_i le nombre d'atomes de longueur de diffusion b_i dans l'objet. Les valeurs de b_i varient d'un atome à l'autre, mais également d'un isotope à l'autre. C'est le cas de l'hydrogène ($b_H = -0,374 \cdot 10^{-12}$ cm) et du deutérium ($b_D = +0,667 \cdot 10^{-12}$ cm) en neutrons. Cette différence importante permet donc d'ajuster la composition du solvant (mélange d'espèces hydrogénées et deutérées) pour maximiser le contraste avec l'échantillon, ou pour distinguer préférentiellement un constituant de l'objet diffusant par rapport à l'autre.

DIAGRAMMES SAXS



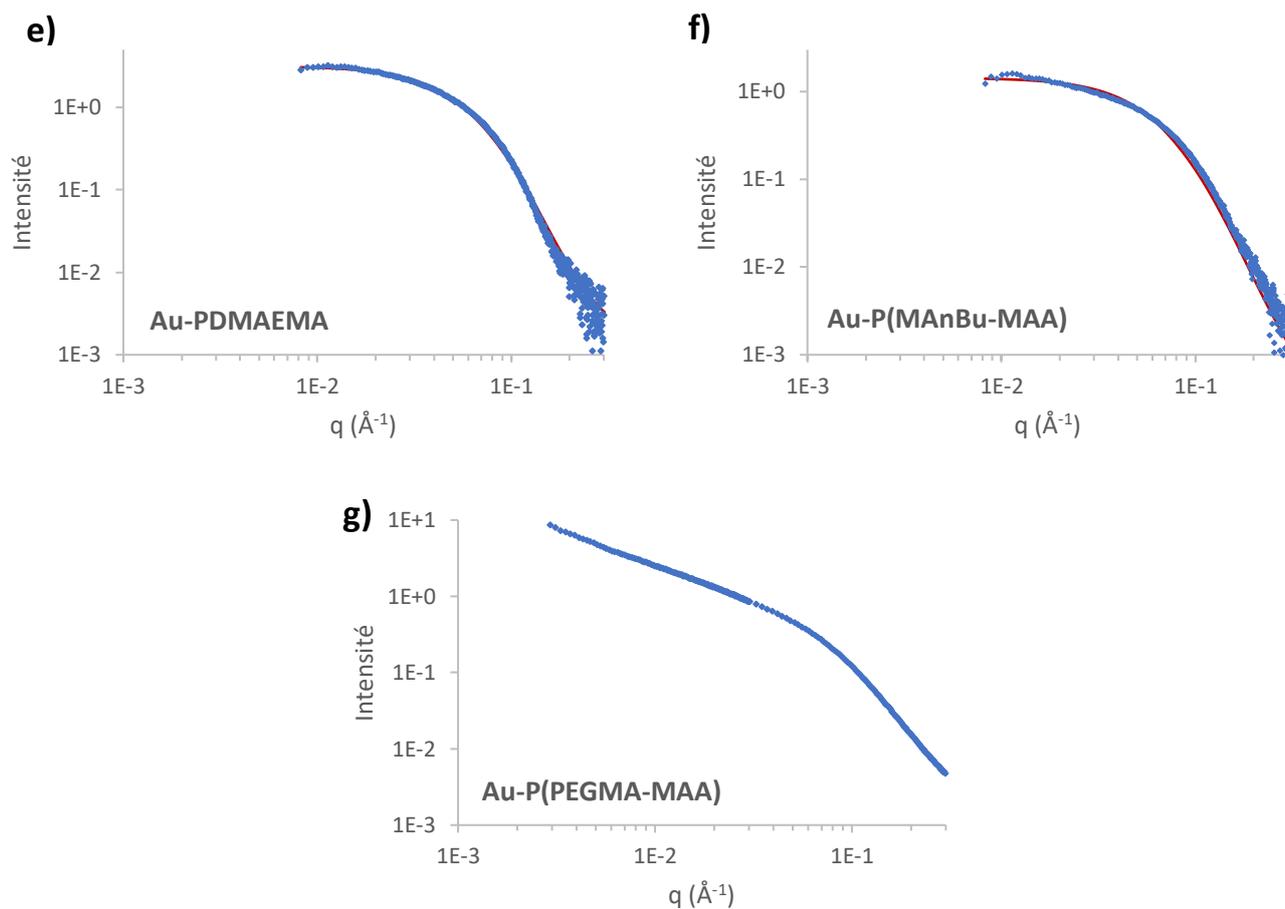
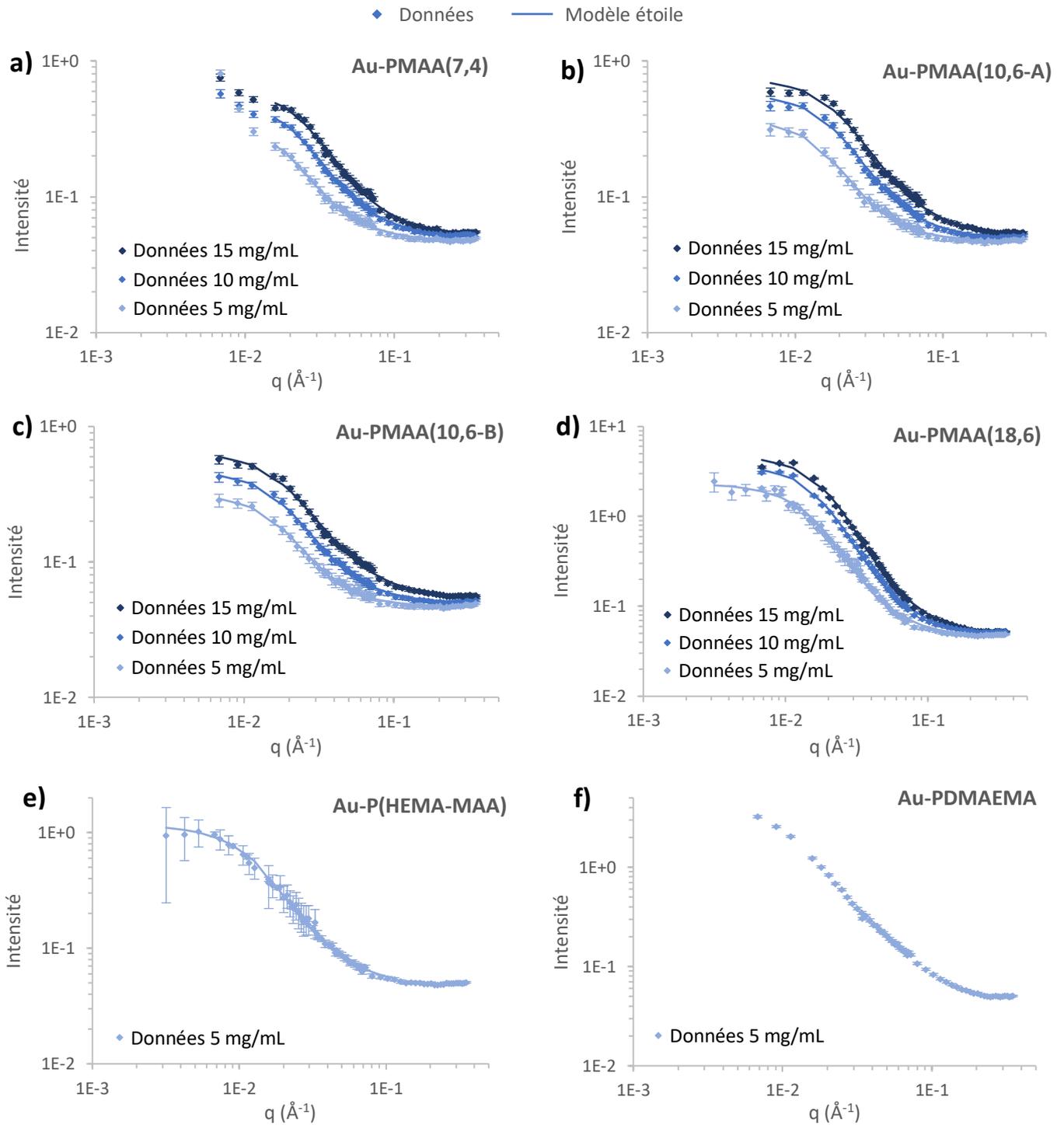
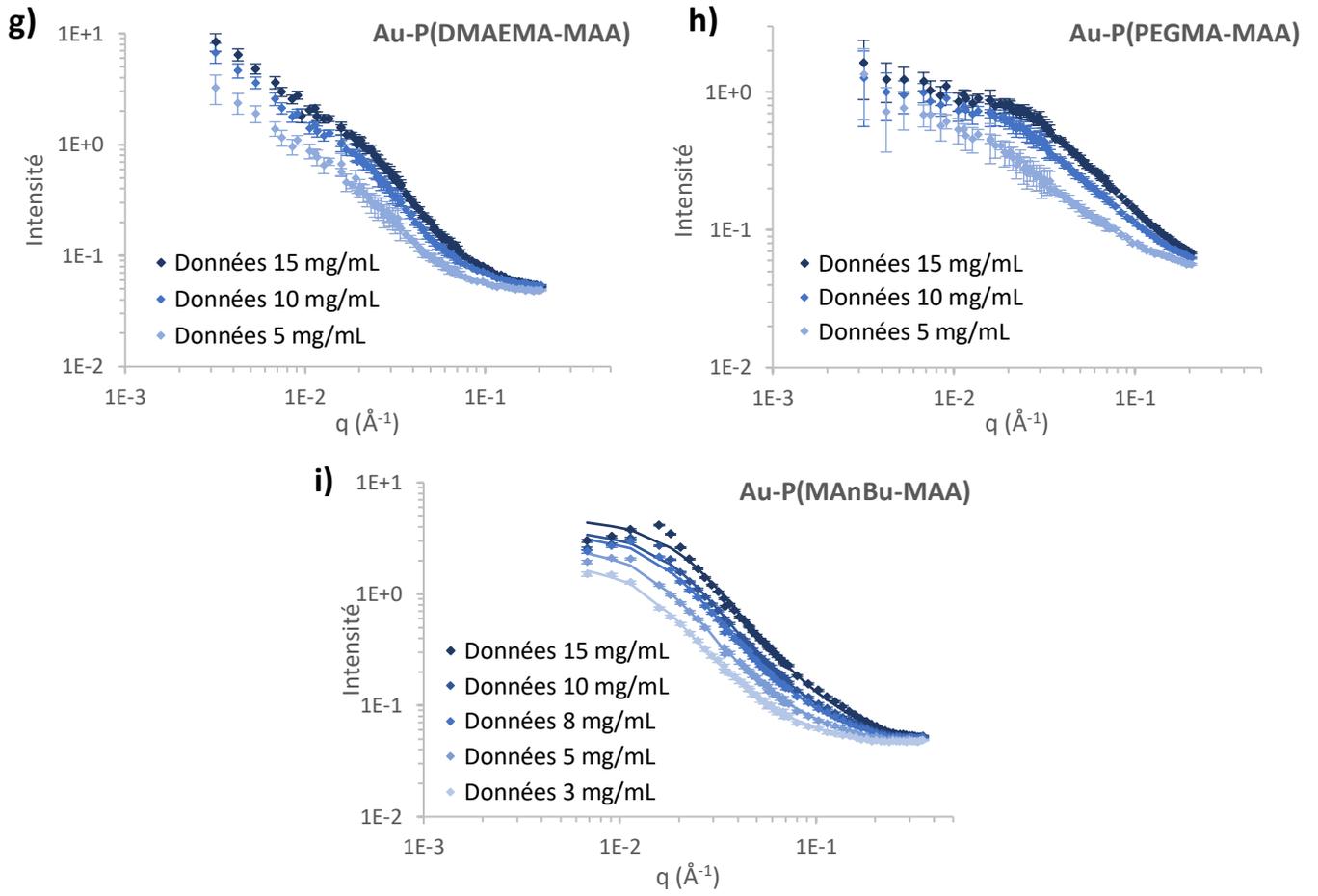


Figure A.9 - Analyses SAXS des solutions de AuNPs dans l'eau : courbes $I=f(q)$ et ajustement par un modèle de sphère polydisperse - (a) Au-PMAA(7,4), (b) Au-PMAA(10,6-B), (c) Au-PMAA(18,6), (d) Au-P(HEMA-MAA), (e) Au-PDMAEMA (f) Au-P(MAnBu-MAA) et (g) Au-P(PEGMA-MAA)

DIAGRAMMES SANS





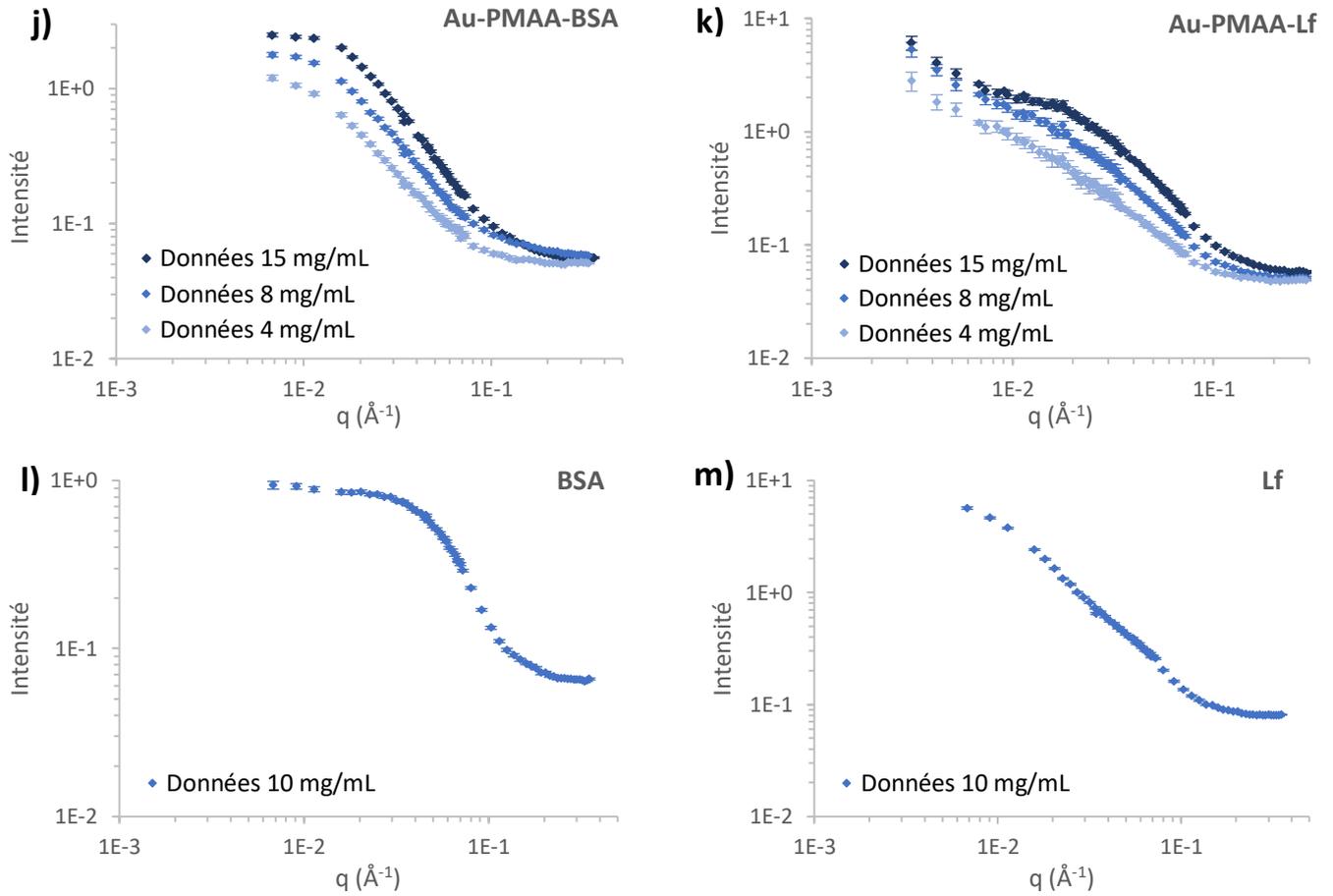


Figure A.10 - Analyses SANS des solutions de AuNPs dans le D2O : courbes $I=f(q)$ et ajustement par un modèle de polymère en étoile - (a) Au-PMAA(7,4), (b) Au-PMAA(10,6-A), (c) Au-PMAA(10,6-B), (d) Au-PMAA(18,6), (e) Au-P(HEMA-MAA), (f) Au-PDMAEMA (g) Au-P(DMAEMA-MAA), (h) Au-P(PEGMA-MAA), (i) Au-P(MAnBu-MAA), (j) Au-PMAA-BSA, (k) Au-PMAA-Lf, (l) BSA et (m) Lf

Tableau A.4 - Résumé des caractéristiques structurales obtenues par analyse des NPs par SANS

NP analysée	Concentration utilisée (mg/mL)	R_g Guinier (nm)	R_g Etoile (nm)	Nombre de branches
Au-PMAA(7,4)	15	/	$6,6 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$
	10	/	$7,4 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,5$
	5	/	$8,9 \pm 1,1$	$3,6 \pm 0,8$
Au-PMAA(10,6-A)	15	$6,7 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,3$
	10	$7,3 \pm 0,9$	$8,5 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$
	5	$7,8 \pm 1,0$	$10,1 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,8$
Au-PMAA(10,6-B)	15	$6,8 \pm 0,8$	$8,3 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$
	10	$7,3 \pm 1,0$	$8,5 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,5$
	5	$6,9 \pm 1,4$	$9,0 \pm 0,5$	$5,3 \pm 1,2$
Au-PMAA(18,6)	15	$8,6 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,3$
	10	$9,7 \pm 0,7$	$10,4 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,3$
	5	$10,4 \pm 1,0$	$11,5 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,4$
Au-P(HEMA-MAA)	5	$12,1 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,4$
Au-P(MAnBu-MAA)	15	$6,9 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$
	10	$7,6 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$
	8	$8,1 \pm 0,4$	$9,4 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$
	5	$9,2 \pm 0,7$	$10,8 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,2$
	3	$9,8 \pm 1,1$	$11,5 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,2$
Au-P(PEGMA-MAA)	15	$3,5 \pm 0,2$	/	/
	10	$3,7 \pm 0,3$	/	/
	5	$3,5 \pm 0,7$	/	/
Au-PMAA-BSA	15	$6,0 \pm 0,2$	/	/
	10	$5,7 \pm 0,3$	/	/
	5	$4,7 \pm 0,4$	/	/

Annexe E : Impact du polymère libre

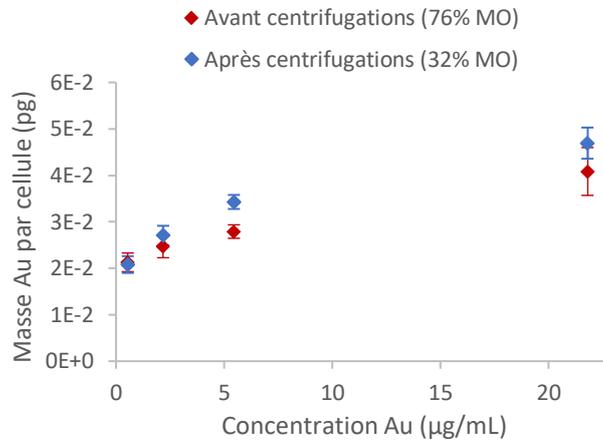


Figure A.11 - Comparaison de la captation des Au-PMAA(10,6-B) avant et après centrifugations, qui correspondent respectivement à des pourcentages de masse organique mesurés en ATG de 76 et 32%

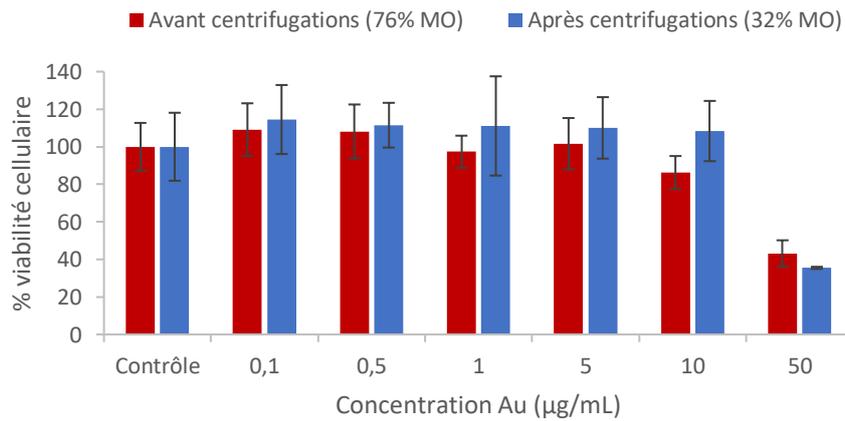


Figure A.12 - Comparaison de la cytotoxicité des Au-PMAA(10,6-B) avant et après centrifugations, qui correspondent respectivement à des pourcentages de masse organique mesurés en ATG de 76 et 32%

BIBLIOGRAPHIE

1. Pantoustier, N., Moins, S., Wautier, M., Degée, P. & Dubois, P. Solvent -free synthesis and purification of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] by atom transfer radical polymerization. *Chem. Commun.* **0**, 340–341 (2003).
2. Pasch, H. & Trathnigg, B. *Multidimensional HPLC of Polymers*. (Springer Science & Business Media, 2013).
3. Coelho, J. F. J., Carvalho, E. Y., Marques, D. S., Popov, A. V., Percec, V. & Gil, M. H. Influence of the isomeric structures of butyl acrylate on its single-electron transfer-degenerative chain transfer living radical polymerization in water Catalyzed by Na₂S₂O₄. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 6542–6551 (2008).
4. Theisen, A., Johann, C., Deacon, M. P. & Harding, S. E. *Refractive Increment Data-Book for Polymer and Biomolecular Scientists*. (Nottingham University Press, 2000).
5. Monroy Soto, V. M. & Galin, J. C. Poly(sulphopropylbetaines): 1. Synthesis and characterization. *Polymer* **25**, 121–128 (1984).
6. Mendrek, B., Sieroń, Ł., Libera, M., Smet, M., Trzebicka, B., Sieroń, A. L., Dworak, A. & Kowalczyk, A. Polycationic star polymers with hyperbranched cores for gene delivery. *Polymer* **55**, 4551–4562 (2014).
7. Liu, Y., Haley, J. C., Deng, K., Lau, W. & Winnik, M. A. Synthesis of Branched Poly(butyl methacrylate) via Semicontinuous Emulsion Polymerization. *Macromolecules* **41**, 4220–4225 (2008).
8. Hussain, H., Mya, K. Y. & He, C. Self-Assembly of Brush-Like Poly[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate] Synthesized via Aqueous Atom Transfer Radical Polymerization. *Langmuir* **24**, 13279–13286 (2008).
9. Zemb, T., Taché, O., Né, F. & Spalla, O. Improving sensitivity of a small angle x-ray scattering camera with pinhole collimation using separated optical elements. *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 2456–2462 (2003).
10. Taché, O., Rouzière, S., Joly, P., Amara, M., Fleury, B., Thill, A., Launois, P., Spalla, O. & Abécassis, B. MOMAC: a SAXS/WAXS laboratory instrument dedicated to nanomaterials. *J. Appl. Crystallogr.* **49**, 1624–1631 (2016).
11. SasView - Small Angle Scattering Analysis. <http://www.sasview.org/>.
12. Bestsel (Beta Structure Selection). <http://bestsel.elte.hu/index.php>.
13. Trihi, M., Mouhib, M., Rkiek, K. & Boulezhar, A. Dosimétrie à haut débit de dose : utilisation de la méthode de Fricke. (2002).
14. RStudio. <https://www.rstudio.com/products/rstudio/>.
15. Auvray, L. & Brûlet, A. Diffusion de neutrons aux petits angles appliquée aux études d'interfaces et de systèmes confinés. in *Collection de la Société Française de la Neutronique* **8**, 179–205 (EDP Sciences, 2007).
16. Rabe, C. Structural investigations using small angle scattering techniques and contrast variation. (Humboldt-Universität, 2014).
17. Narayanan, T. Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering. in *Soft Matter Characterization* 899–952 (2008).

Titre : Nanoparticules d'or à couronne polymère modulable : synthèse, interactions avec les systèmes biologiques et propriétés de radiosensibilisation

Mots clés : nanoparticules, polymères, radiothérapie, cancer

Résumé : La recherche concernant l'utilisation de nanoparticules dans le domaine médical a connu un essor considérable ces vingt dernières années, notamment dans le cadre du traitement du cancer. En particulier, l'effet radiosensibilisant des nanoparticules métalliques a été beaucoup étudié en radiothérapie, dans une perspective de réduction des effets secondaires générés par l'irradiation des tissus sains autour de la tumeur.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à des nanoparticules d'or greffées d'une couronne polymère. Celle-ci assure une grande stabilité des objets, tout en permettant de faire varier leurs propriétés physico-chimiques et d'en étudier l'impact sur leur comportement. Les polymères utilisés sont des polyméthacrylates, obtenus par polymérisation radicalaire contrôlée, qui jouent le rôle de ligands lors de la synthèse des nanoparticules d'or. Nous avons pu faire varier deux paramètres, la masse molaire et la nature chimique des (co)polymères, afin de constituer une gamme de nano-objets aux propriétés différentes. Une caractérisation approfondie, notamment par diffusion de rayonnements aux petits angles, a mis en évidence une structure similaire pour l'ensemble des objets synthétisés. Un agent de chimiothérapie, la doxorubicine, et deux protéines ont en outre pu être greffés sur les ligands polymères.

Les interactions de ces différentes nanoparticules avec

les systèmes biologiques ont été étudiées de manière détaillée, en particulier l'impact des propriétés de la couronne polymère. Quatre aspects ont été examinés : la stabilité colloïdale en milieux biologiques, la capacité à diffuser dans la matrice extracellulaire, la captation cellulaire et la cytotoxicité. Tous les ligands étudiés assurent une bonne stabilité. Concernant les autres aspects, la comparaison systématique des résultats obtenus pour la gamme d'objets a permis de mettre en évidence un fort impact de la nature de la couronne polymère, notamment de la présence de charges positives ou de segments hydrophobes. Nous avons également montré que les propriétés de toxicité de la doxorubicine, et de captation accrue d'une protéine étaient bien conservées après greffage.

Dans une perspective d'utilisation en radiosensibilisation, nous avons enfin étudié le comportement de nos nanoparticules sous irradiation. Une bonne stabilité de leur structure a été observée sous rayonnement, et leur association à l'iode 131 (radiothérapie interne) a montré un fort effet radiosensibilisant, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les résultats des essais menés en protonthérapie (radiothérapie externe) mettent cependant en évidence des différences de comportements selon le type d'irradiation. Nous avons également exploré la possibilité de détecter les nanoparticules *in situ*, lors d'une irradiation en protonthérapie, grâce à l'analyse des rayons X émis.

Title: Gold nanoparticles grafted with a versatile polymer corona: synthesis, interactions with biological systems and radiosensitizing properties

Keywords: nanoparticles, polymers, radiotherapy, cancer

Abstract: These past twenty years, there has been a great increase in the number of studies concerning the use of nanoparticles for medical applications, especially for cancer treatment. In particular, radiosensitizing effects of metal nanoparticles have been studied a lot in radiotherapy, in order to reduce the side effects created by the irradiation of healthy tissues surrounding the tumor.

In this work, we focused on polymer-grafted gold nanoparticles. The polymer corona both ensured a great stability of the objects and allowed to change their physico-chemical properties, in order to study their impact on the nanoparticles behavior. We used polymethacrylates which were obtained through controlled radical polymerization and acted as ligands during the gold nanoparticles synthesis. A library of nano-objects with different properties was established by varying both molar mass and chemical nature of (co)polymers. Thorough characterization, including by small-angle radiation scattering, revealed similar structures for all synthesized objects. Grafting of one chemotherapy agent, doxorubicin, and two proteins was also performed on polymer ligands.

Interactions between these various nanoparticles and

biological systems were studied in detail. Special attention was given to the impact of polymer corona properties. Four aspects were examined: colloidal stability in biological media, ability to diffuse inside the extracellular matrix, cellular uptake, and cytotoxicity. All studied ligands ensured a great stability. Regarding the other aspects, systematic comparison of the results obtained for the whole library highlighted a strong impact of the ligands nature, especially the presence of positive charges or hydrophobic segments. We have also shown that grafted doxorubicin and protein kept their toxic and targeting properties respectively.

Lastly, the prospect of using these nanoparticles for radiosensitization led us to study their behavior under radiations. When irradiated, their structure was found stable. Combining them with radioiodine (internal radiotherapy) showed a great radiosensitizing effect, both *in vitro* and *in vivo*, but experiments with protontherapy (external radiotherapy) revealed different behaviors depending on the type of radiations. We also investigated the use of particle-induced X-ray emission to detect nanoparticles *in situ*, during protontherapy treatment.

