



HAL
open science

Développement de nanovecteurs à base de nanoparticules d'or : Applications biomédicales

Hanane Moustouai

► **To cite this version:**

Hanane Moustouai. Développement de nanovecteurs à base de nanoparticules d'or : Applications biomédicales. Chimie thérapeutique. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018US-PCD065 . tel-02526969

HAL Id: tel-02526969

<https://theses.hal.science/tel-02526969>

Submitted on 31 Mar 2020

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

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

Université Paris 13-UFR SMBH

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

T H E S E

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline: Chimie

Présentée et soutenue publiquement par

Hanane MOUSTAOU

Le 10 Décembre 2018

Développement de nanovecteurs à base de nanoparticules d'or : Applications biomédicales

Directeurs de thèse: Dr. Jolanda Spadavecchia et Pr. Marc Lamy de la Chapelle

JURY

Pr. Claire Mangeney	Université Paris Descartes	Président
Pr. Maguy Jaber	Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Dr. Thomas Georgelin	Centre de Biophysique Moléculaire	Rapporteur
Pr. Adriele Prina-Mello	Trinity College Dublin	Examineur
Dr. Jolanda Spadavecchia	Université Paris 13	Co-directrice de thèse
Pr. Marc Lamy de la Chapelle	Université Paris 13	Co-directeur de thèse
Dr. Nadia Djaker	Université Paris 13	Encadrante

Remerciements

Travailler comme doctorante au laboratoire CSPBAT de l'université Paris 13 a été une expérience formidable et très stimulante. De nombreuses personnes ont été impliquées, directement ou indirectement dans le développement de ma thèse. Je voudrais donc saisir cette occasion pour exprimer ma profonde gratitude.

Tout d'abord, je voudrais remercier le professeur Maguy Jaber ainsi que le docteur Thomas Georgelin, de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également les professeurs Claire Mangeney et Adriele Prina Mello d'avoir accepté d'évaluer les travaux de cette thèse. Je vous remercie pour votre temps passé à évaluer ma thèse.

Je remercie le professeur Véronique Migonney de m'avoir accueillie au sein du laboratoire CSPBAT, ainsi qu'au professeur Philippe Savarin qui a repris la direction du laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse Jolanda Spadavecchia et Marc Lamy de la Chapelle. Merci Jolanda pour tout le temps et la patience que vous m'avez consacrée pour me former ainsi que pour tous les conseils avisés.

Merci Marc pour votre disponibilité, votre aide précieuse et votre pédagogie qui m'ont permis de travailler dans un cadre épanouissant.

Je vous remercie tous les deux pour vos encouragements, mais aussi de m'avoir fait confiance durant ces années.

Je tiens également à remercier mon encadrante, le docteur Nadia Djaker. Je lui suis reconnaissante du temps et de la patience qu'elle m'a consacré pour me transmettre ses connaissances durant ces trois ans de thèse. Merci de m'avoir fait partager votre amour pour la physique notamment à travers votre plateforme de spectroscopie de corrélation.

Un grand merci aux membres extérieurs qui ont collaboré dans les travaux de cette thèse. Je remercie Sandra Casale pour sa contribution en microscopie. Je souhaiterais remercier Dania Movia et Adriele Prina-Mello de leur contribution dans l'étude des nanovecteurs. Ils ont été d'une grande aide pour moi, une mention spéciale à Adriele avec qui j'ai eu la chance de travailler lors de sa venue au labo, avec qui j'ai beaucoup appris notamment dans l'étude *in vivo*.

Je voudrais remercier Anna Chiara De Luca et son doctorant Stefano pour m'avoir accueilli au sein de l'Institute of Protein Biochemistry à Naples (Italie). J'ai beaucoup appris grâce à vous notamment en imagerie Raman. Je vous remercie pour votre confiance et pour m'avoir laissé utiliser votre plateforme. De la même manière, je voudrais remercier le professeur Simion Astilean et le docteur Monica Focsan pour m'avoir accueilli au sein du Nanobiophotonics and Laser Microspectroscopy Center à Cluj (Roumanie). Ce

court séjour a permis d'effectuer un certain nombre de mesure de spectres Raman et de fluorescence.

Je souhaite ensuite remercier le docteur Milena Salerno pour ses précieux conseils concernant la culture cellulaire, FACS, AAS. . . Mes discussions avec vous ont été enrichissantes aussi bien sur le plan scientifique que sur la vie courante.

Un grand merci à Odile Sainte Catherine, technicienne biologiste, pour m'avoir fait découvrir les joies de l'expérimentation animale, et des différentes plateformes histologique et microscopique.

Un grand merci également à ceux qui ont contribué à ce travail, notamment Nadia Bouchemal pour son expertise dans le domaine de la RMN et sa bonne humeur, et à Nathalie Dupont pour tous ses calculs de DFT.

Je souhaite remercier infiniment Edith Hantz, Bei Wei-Sun ainsi que Giulia Fadda pour m'avoir fait découvrir l'enseignement supérieur.

Un grand merci à une personne qui a fait un très long chemin avec moi (bien avant la thèse), qui est devenue une très bonne amie pour moi, Agnès. Merci beaucoup pour ta présence tout au long de ma vie d'étudiante, toi et moi, nous avons vécu tellement d'aventures. Merci d'être une amie si merveilleuse!!

Au cours de ma deuxième année de thèse, j'ai eu la chance de faire connaissance de trois personnes exceptionnelles, qui ont été d'excellentes collègues de paillasse. Merci à Maroua qui est arrivée dans notre équipe en tant que post-doc, puis ingénieure industrielle. Je te remercie d'avoir apporté avec toi de la joie de vivre, de la passion, et une touche d'harissa dans l'équipe. Je te remercie pour ton amitié, les longues discussions scientifiques, mais aussi de la vie et surtout de cuisine qu'on a eus, ton humour et surtout de ton soutien. Merci à Célia pour ta gentillesse et ta sympathie, cela a été très agréable de travailler à tes côtés. Je te remercie pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble. Merci à Justine, qui a travaillé chez nous comme stagiaire et qui a été d'une aide très précieuse pour les travaux de cette thèse. Tu as été une merveilleuse collègue de SCS. Tes passages au labo étaient toujours un grand plaisir pour moi.

Je tiens également à remercier Médéric, pour tous les coups de main que tu m'as donnée. Merci pour toutes tes blagues, tes jeux de mots, . . . qui m'ont donné le sourire pendant tes pauses cafés. Je te souhaite un très bon courage pour ta dernière année de thèse.

Je voudrais remercier tous les membres permanents et non permanents du CSPBAT et notamment Tony, le nouveau venu, qui est venu avec l'ambiance chaleureuse de la Réunion. Ainsi qu'un grand merci aux autres stagiaires, doctorants, post-doctorant que

j'ai côtoyés pendant ces années, à savoir : Ines, Nikita, Fatima, Qiqian, Raymond, Diego, Romain, Dihia, Shivalika, Ryohei, Gennaro, Inga.

Enfin, je voudrais remercier les membres de ma famille. Tout d'abord mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu atteindre mon but. Si je suis arrivée jusqu'ici, c'est grâce à votre immense soutien. Merci de m'avoir inculqués ces vraies valeurs, je sais maintenant que mes racines sont solides. Je vous remercie pour tout l'amour que vous m'avez apporté.

Je tiens à remercier mes deux frères Walid et Rida qui ont toujours été là pour moi. Vos encouragements m'ont permis de surmonter des moments difficiles. Vous avez été d'une aide précieuse et votre présence a été indispensable.

Je vous témoigne à travers ce travail, toute ma reconnaissance et mon affection.

Liste des publications

Publications acceptées

- Jolanda Spadavecchia, Dania Movia, Caroline Moore, Ciaran Manus Maguire, Hanane Moustaoui, Sandra Casale, Yuri Volkov, and Adriele Prina-Mello; Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer : from synthesis to proof-of-concept *in vitro* studies. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11 : 791–822.
- Hanane Moustaoui, Dania Movia, Nathalie Dupont, Nadia Bouchemal, Sandra Casale, Nadia Djaker, Philippe Savarin, Adriele Prina-Mello, Marc Lamy de la Chapelle, and Jolanda Spadavecchia; Tunable Design of Gold(III)–Doxorubicin Complex–PEGylated Nanocarrier. *The Golden Doxorubicin for Oncological Applications*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8 (31), pp 19946–19957.
- Nadia Djaker, Sadequa Sultana, Dahia Issaad, Sanda Boca, Hanane Moustaoui, Jolanda Spadavecchia, Aicha Medjahed, Mohamed Bouafia, Simion Astilean, and Marc Lamy de la Chapelle; Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2016, 120 (21), pp 11700–11708.
- Dahia Issaad, Hanane Moustaoui, Aicha Medjahed, Lazhar Lalaoui, Jolanda Spadavecchia, Mohamed Bouafia, Marc Lamy de la Chapelle, and Nadia Djaker; Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles : Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins. *J. Phys. Chem. C*, 2017, 121 (33), pp 18254–18262.
- Valentina Melania, Maroua Ben Haddada, Hanane Moustaoui, Jessem Landoulsi, Nadia Djaker, Marc Lamy de la Chapelle, Jolanda Spadavecchia; Pegylated doxorubicin gold complex : From nanovector to potential intercalant agent for biosensor applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2017. 1(3) : p. 114-121.
- Dania Movia, Luisana Di Cristo, Roaa Alnemari, Joseph E. McCarthy, Hanane Moustaoui, Marc Lamy de la Chapelle, Jolanda Spadavecchia, Yuri Volkov, Adriele Prina-Mello; The curious case of how mimicking physiological complexity in *in vitro* models of the human respiratory system influences the inflammatory responses. A preliminary study focused on gold nanoparticles. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 2017. 2(2) : p. 110-130.

- Anne-Laure Morel, Sophie Giraud, Anne Bialecki, Hanane Moustououi, Marc Lamy de la Chapelle, Jolanda Spadavecchia ; Green extraction of endemic plants to synthesize gold nanoparticles for theranostic applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2017. 1(3) : p. 158-171.
- Gwendolyn Marguerit, Hanane Moustououi, Maroua Ben Haddada, Nadia Djaker, Marc Lamy de la Chapelle, Jolanda Spadavecchia ; Taxanes Hybrid Nanovectors : From Design to Physico-Chemical Evaluation of Docetaxel and Paclitaxel Gold (III)-PEGylated Complex Nanocarriers. *Part. Part. Syst. Charact.* 2018, 35, 1700299.
- Maelle Monteil, Hanane Moustououi, Gennaro Picardi, Fatima Aouidat, Nadia Djaker, Marc Lamy de la Chapelle, Marc Lecouvey, Jolanda Spadavecchia ; Polyphosphonate ligands : From synthesis to design of hybrid PEGylated nanoparticles toward phototherapy studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018. 513 : p. 205-213.

Publication en phase de soumission

- Hanane Moustououi, Justine Saber, Ines Djeddi, Qiqian Liu, Dania Movia, Adriele Prina-Mello, Jolanda Spadavecchia, Marc Lamy de la Chapelle, and Nadia Djaker ; Spherical und urchin-shaped gold nanoparticles interaction with proteins : In situ protein corona study by scattering correlation spectroscopy.
- Hanane Moustououi, Justine Saber, Qiqian Liu, Jolanda Spadavecchia, Marc Lamy de la Chapelle, and Nadia Djaker ; Shape and Size Effect on Temperature Elevation of Gold Nanoparticles : Comparative Study between Spherical and Urchin-shaped Gold Nanoparticles.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des publications	6
Table des figures	11
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	17
Introduction générale	19
Chapitre 1 Nanoparticules d'or pour la santé	21
1.1 Les nanoparticules	21
1.1.1 Définition	22
1.1.2 Synthèses et fonctionnalisation des nanoparticules d'or	24
a. La voie descendante	25
b. La voie ascendante	25
c. Le stabilisant	26
d. La synthèse de solutions colloïdales	27
e. Synthèse de nanoparticules colloïdales par méthode biologique	28
1.1.3 Propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'or	29
a. Le rapport surface sur volume	30
b. Propriétés optiques	30
<i>Effet de la taille des nanoparticules</i>	30
<i>Effet de l'indice de réfraction</i>	32
<i>Effet de la forme</i>	32
1.1.4 Applications	34
1.2 Application dans la santé	34
1.2.1 Nanovecteurs	35
a. Les vecteurs de première génération	37
b. Les vecteurs de deuxième génération	38

c. Les vecteurs de troisième génération	39
1.2.2 La thérapie photothermique	41
1.2.3 Interaction des nanoparticules avec les milieux biologiques	42
1.3 Références bibliographiques	47
Chapitre 2 Nouvelle génération de nanovecteurs synthétisés par complexation de l'or	53
2.1 Nanovecteurs or/doxorubicine : greffage par couplage carbodiimide	55
2.1.1 Matériels et méthodes	55
a. Synthèse des nanoparticules d'or	55
b. Greffage de la doxorubicine	55
2.1.2 Résultats et discussion	59
2.2 Nanovecteurs or/doxorubicine : greffage par complexation Au(III)-DOX	70
2.2.1 Synthèse et caractérisations du nanovecteur	71
2.2.2 Etude de la stabilité de la DOX IN dans des milieux biologiques	100
2.3 Références bibliographique	104
Chapitre 3 Etude de la couronne protéique par spectroscopie de corrélation	107
3.1 La spectroscopie de corrélation	108
a. Aspect théorique de la spectroscopie de corrélation	109
b. Montage optique de la spectroscopie de corrélation	114
3.2 Caractérisation de nanoparticules d'or par SCS	115
3.3 Etude de l'adsorption d'une molécule simple, le thiophénol, sur des nanoparticules d'or	119
3.3.1 Matériels et méthodes	119
3.3.2 Résultats et discussion	120
3.4 Etude de la couronne protéique sur des nanoparticules d'or	130
3.5 Références bibliographique	151
Chapitre 4 Les nanoparticules d'or pour une application d'hyperthermie	161
4.1 Evaluation du pouvoir thermique des nanoparticules en fonction de leurs tailles et de leurs formes	163
4.2 Application	178
Conclusions et perspectives	189
Annexes	191
Résumé	207

Table des figures

1.1	Domaines d'application des nanoparticules (d'après Tsuzuki, 2009). . . .	22
1.2	Echelle comparant les nanoparticules à des structures allant jusqu'au centimètre. (Adapté de US National Cancer Institute).	23
1.3	Photographie de la Coupe de Lycurgus (d'après The trustees of the British Museum) éclairée de l'extérieur (A), éclairée de l'intérieur (B), origine des couleurs (C), Porcelaines de Sceaux [7] (D).	24
1.4	Illustration des approches des deux voies de synthèses : Ascendante (à gauche) et Descendante (à droite).	25
1.5	Illustration d'une répulsion électrostatique.	26
1.6	Illustration d'une répulsion stérique.	26
1.7	Synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich [10].	27
1.8	Evolution de la structure électronique en fonction de la taille lorsque l'on passe de l'atome au matériau massif [17].	29
1.9	Variation de la couleur (à gauche) et de la position de la bande plasmon (à droite) de différentes solutions de nanobâtonnets suivant leur rapport d'aspect [19].	31
1.10	Spectres calculés de l'efficacité d'absorption (en rouge pointillé), de diffusion (en noir pointillé) et d'extinction (en vert pointillé) pour des nanoparticules d'or de 20 nm (a), 40 nm (b) et 80 nm (c) de diamètre [20]. . . .	31
1.11	Spectres d'extinction des nanoparticules d'or sphérique de différents diamètres allant de 9 à 99 nm [21].	32
1.12	Position de la bande plasmon de solution de nanoparticule de diamètre de 50 nm en fonction de l'indice de réfraction du milieu : (a) $n = 1,33$; (b) $n = 1,36$; (c) $n = 1,39$; (d) $n = 1,43$; (e) $n = 1,46$; (f) $n = 1,5$ [22].	32
1.13	Gamme spectrale de la résonance plasmon des nanoparticules d'or en fonction de leur forme [24].	33
1.14	Aperçu des différents types de nanoformulations trouvés dans le marché [41].	36
1.15	Les 3 générations de nanovecteurs : Première génération avec une nanoparticule « nue » (à gauche), Deuxième génération avec une nanoparticule « furtive » (au centre), et troisième génération avec une nanoparticule « furtive et ciblante » (à droite).	38

1.16	En haut : Quantité de nanoparticules d'or captée par les macrophages suivant leur taille et leur chimie de surface. En bas : Image microscopique des nanoparticules d'or de différentes chimie de surface, de 10 nm (a), de 20 nm (b) et de 40 nm (c), résident dans les macrophages après 0h et 48h d'incubation [42].	39
1.17	Nanoparticule multifonctionnelle : illustration de différents types d'agents permettant la création du nanovecteur idéal [43].	40
1.18	Spectres d'absorption de l'eau, de l'hémoglobine (HbO_2) et de la désoxy-hémoglobine (Hb) dans la zone spectrale 650 à 1100 nm [46].	41
1.19	Les différentes voies d'entrée des nanoparticules par endocytose [49].	43
2.1	Structure chimique de la doxorubicine.	54
2.2	Spectres d'absorption UV-Vis des nanovecteurs : AuPEGs (en noir), Doxorubicine (en vert), AuPEGs_DOX (en rouge) et AuPEGs_DOX_ab (en bleu).	59
2.3	Images MET de AuPEGs (A), AuPEGs_DOX (B), AuPEGs_DOX_ab (C) et la distribution de taille des AuPEGs (D), AuPEGs_DOX (E), AuPEGs_DOX_ab (F).	61
2.4	Image MET des AuPEGs montrant un noyau métallique et une couche du polymère (PEG) organique de quelques nanomètres.	61
2.5	Spectres Raman (à gauche) de la doxorubicine en poudre (en noir), d'AuPEGs (en bleu), d'AuPEGs_DOX (en rouge) et d'AuPEGs_DOX_ab (en rose). Tableau de valeurs des bandes Raman de la doxorubicine ainsi que leurs attributions [15] (à droite).	62
2.6	Pourcentage de cellules vivantes quantifiées par cytométrie en flux après expositions des PANC-1 aux différentes AuPEGs pour des concentrations allant de 0 à 250 μ M pendant 24h (à gauche). Ces courbes dose-réponse ont été extrapolées afin de déterminées les valeurs des CL50 reportées en histogramme (à droite). Les valeurs de CL50 sont rapportées avec une intervalle de confiance moyen de $\pm 95\%$	65
2.7	Pourcentage de cellules vivantes quantifiées par cytométrie en flux après expositions des PANC-1 à différentes concentrations de doxorubicine allant de 0 à 8 μ M pendant 24h (à gauche) Cette courbe dose-réponse a été extrapolée afin de déterminées la valeur de la CE50 de la DOX et comparée à la valeur de la CE50 de la doxorubicine chargée sur AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab (à droite). Les valeurs de CE50 sont rapportées avec une intervalle de confiance moyen de $\pm 95\%$	65

2.8	Histogramme représentant la FL2-A montrant les effets d'AuPEGs, AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab sur le cycle cellulaire des cellules PANC-1 après 24h d'exposition. Des histogrammes représentant la FL2-A des cellules non traitées (contrôle négatif, NT) et des cellules traitées à la doxorubicine avec une concentration de 1,5 μ M (témoin positif, PT), sont également présentés.	67
2.9	Images de microscopie confocale à balayage laser de cellules PANC-1 exposées aux AuPEGs_DOX ou AuPEGs_DOX_ab pendant 24h. Un témoin négatif (NT) constitué de cellules non traitées a été inclus. Les cellules ont été colorées pour les noyaux (en bleu) et pour l'expression de la LAMP-1 glycosylée (en vert). Les nanoparticules ont été imagées en mode réflectance et représentées en blanc sur l'image. La fluorescence de la doxorubicine a également été détectée (en rouge). Les images masquées démontrent une co-localisation des nanoparticules avec l'expression de la LAMP-1 (en jaune). Barres d'échelle : 5 μ m	68
2.10	Analyse de l'expression de LAMP-1 glycosylé et non glycosylé et de la protéine actine dans des lysats cellulaires de cellules PANC-1 non traitées (NT) ou exposées à AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab pendant 24h par western blot.	69
2.11	Spectres d'absorption UV-Vis de la DOX IN dispersée dans une solution de NaCl à différentes concentrations (allant de 0 à 500 <i>mM</i>).	100
2.12	Spectres d'absorption UV-Vis de la DOX IN dispersée dans une solution de NaCl à différentes concentrations (allant de 0 à 500 <i>mM</i>) en présence de 10% de SVF.	101
2.13	Spectres d'absorption UV-Vis de la DOX IN dans l'eau (A) et dans un milieu complet (RPMI complété de 10% de SVF),(B) à différents temps d'incubation (0h, 2h, 6h et 24h) à 37°C et à une pression en CO_2 de 5%.	102
2.14	Histogramme représentant le diamètre hydrodynamique (à gauche) de la DOX IN dans l'eau (en gris clair) et dans un milieu complet (RPMI supplémenté de 10% de SVF, en gris foncé) à différents temps d'incubation (0h, 2h, 6h et 24h) à 37°C et à une pression en CO_2 de 5%. A droite, tableau de valeur des potentiels zêta de la DOX IN dans les mêmes conditions à 0h et 24h.	102
3.1	Principe général de la spectroscopie de corrélation.	109
3.2	Courbe de corrélation dont l'amplitude à $G(0)$ est inversement proportionnelle au nombre moyen de particules présent dans le volume effectif et la largeur à mi-hauteur correspond au temps de diffusion, τ_D	111

3.3	Effet de la concentration sur les fluctuations d'intensité du signal et de la courbe de corrélation, d'après [21].	112
3.4	Effet de la taille des particules traversant le volume effectif sur les fluctuations de signal et sur la courbe de corrélation, d'après [21].	113
3.5	(A) : Profils latéraux et axiaux d'une bille fluorescente avec un diamètre de 170 <i>nm</i> (en haut), image de la bille fluorescente et paramètres obtenus dans le volume confocal (en bas). (B) : Courbe de corrélation croisée de fluorescence des molécules d'AF532 libres. La courbe d'ajustement (réalisée à l'aide de l'équation 3.3) donne un temps de diffusion de 102 μs (en haut). Paramètres utilisées et obtenus dans le volume confocal (en bas).	114
3.6	Montage de la spectroscopie de corrélation utilisée.	115
3.7	Images MET des nanoparticules d'or : (a) 20-a-GNS, (b) 30-a-GNS, (c) 50-a-GNS, (d) a-GNF (e) Spectres d'extinction des nanoparticules d'or avec (traits en pointillés) et sans (trait plein) PEG.	116
3.8	Courbes de corrélation normalisées (traits en pointillés) et leurs ajustements suivant l'équation 3.3 de la lumière diffusée par les GNS excitées à 532 <i>nm</i> (a, b, c et d) et les GNF excitées à 633 <i>nm</i> (e et f).	117
3.9	A gauche : Spectres d'extinction des GNS (en gris) et des GNU (en noir) avant (lignes pleines) et après incubation dans une solution de thiophénol à 1 <i>mM</i> (lignes en pointillées) et 1 <i>M</i> (lignes en traits discontinus) (a). Zoom des bandes d'extinction des GNS (b) et des GNU (c). A droite : Caractérisation des nanoparticules d'or par spectroscopie UV-visible et Zetasizer.	121
3.10	Spectres Raman d'une solution de thiophénol à 10 <i>mM</i> dans un mélange d'éthanol et d'eau (80%/20%), de l'éthanol et de l'eau pure (à gauche). Spectres SERS du thiophénol à 1 <i>mM</i> incubé avec du GNS et du GNU et du thiophénol à 1 <i>M</i> incubé avec du GNU, et en rouge le spectre Raman des nanoparticules (à droite).	122
3.11	Intensités SERS intégrées à partir des spectres Raman expérimentaux pour les bandes spécifiques du thiophénol (685, 992, 1015, 1066 et 1569 cm^{-1}) dans le cas des GNS et des GNU et ajustées à partir de l'équation 3.7 (a). Paramètres de l'équation de Hill obtenus à partir des courbes d'intensité Raman ci-contre (b).	123
3.12	Densité en thiophénol calculée sur la surface des GNS de 50, 80 et 1600 <i>nm</i> , à partir de l'équation 3.8.	125
3.13	Courbes SCS normalisées (cercle) et leurs ajustements avec l'équation 3.3 (lignes) des nanoparticules nues (a, b), incubées dans 1 <i>mM</i> de solution de thiophénol (c, d), et incubées dans 1 <i>M</i> de solution de thiophénol (e, f).	126

3.14	Courbes des rayons hydrodynamiques calculés pour les GNS (A) et les GNU (B), incubées à différentes concentrations de thiophénol. (C) Paramètres de l'équation de Hill obtenus à partir des courbes de R_h	128
3.15	Schéma de l'adsorption du thiophénol : saturation de la surface des GNS (a), adsorption au niveau du cœur des GNU (b), saturation totale des GNU (c).	129

Liste des tableaux

2.1	Diamètres hydrodynamiques moyens des nanoparticules dispersées dans du PBS, du FBS et du milieu complet (du DMEM complété avec 10% de FBS) avant et après incubation à 37°C pendant 24h, déterminés par NTA.	64
3.1	Caractérisation des nanoparticules d'or par spectroscopie UV-Vis, Potentiel zêta, DLS et SCS.	118
3.2	Attribution expérimentale des bandes principales SERS du thiophénol en comparaison avec la bibliographie.	122
3.3	Caractérisation des nanoparticules d'or par SCS.	127

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- APD** : Avalanche photo-diode
- CCD** : Charge coupled device (en français, Dispositif à transfert de charge)
- CTAB** : Cetyltriméthylammonium bromide
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (en français, Milieu Eagle modifié de Dulbecco)
- DLS** : Dynamic light scattering (en français, diffusion dynamique de la lumière)
- EDC** : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- EGF** : Epidermal Growth Factor (en français, facteur de croissance épidermique)
- EPR** : Enhanced permeability and retention (en français, effet de perméabilité et de rétention)
- FBS** : Fetal bovin serum (en français, sérum de veau foetal)
- FCS** : Fluorescence correlation spectroscopy (en français, spectroscopie de corrélation de fluorescence)
- GNF** : Gold nanoflower (en français, nanofleur d'or)
- GNS** : Gold nanosphere (en français, nanosphère d'or)
- GNU** : Gold nanourchin (en français, nanooursin d'or)
- ISO** : International organization for Standardization (en français, Organisation internationale de normalisation)
- IR** : Infrarouge
- LAMP-1** : Lysosomal-associated membrane protein 1 (en français, protéine membranaire associée au lysosome)
- LDL** : Low density lipoprotein (en français, lipoprotéines de basse densité)
- LSP** : Localized surface plasmon (en français, plasmon de surface localisés)
- LSPR** : Localized surface plasmon resonance (en français, résonance plasmon de surface localisés)
- MDR** : Multi-drug resistance (en français, résistance multi-drogues)
- MET** : Microscopie électronique en transmission
- NHS** : N-hydroxysuccinimide
- NTA** : Nanoparticle tracking analysis (en français, analyse du suivi individuel de particules)
- PBS** : Phosphate buffered saline (en français, tampon phosphate salin)
- PEG** : Polyéthylène glycol
- PSF** : Point spread function (en français, fonction d'étalement du point)
- QCM** : Quartz crystal microbalance (en français, microbalance à cristal de quartz)
- R_H** : Rayon hydrodynamique
- RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- SCS** : Scattering correlation spectroscopy (en français, spectroscopie de corrélation de diffusion)
- SERS** : Surface enhanced Raman spectroscopy (en français, spectroscopie Raman exalté de surface)
- SVF** : Sérum de veau foetal
- UV-vis** : Ultraviolet-visible
- XPS** : X-ray photoelectron spectroscopy (en français, spectroscopie photoélectronique par rayons X)

Introduction générale

Les nanoparticules d'or ont suscité un énorme intérêt scientifique et technologique en raison de leurs propriétés optiques uniques, de leur facilité à être synthétisées ou fonctionnalisées et de leur stabilité chimique. Les dernières études font des nanoparticules d'or de bons candidats pour des applications biomédicales telles que l'administration ciblée de médicament et le traitement par photothermie du cancer, mais aussi dans la détection chimique et l'imagerie biologique. Cependant, la connaissance de leur éventuelle toxicité et de leur impact sur la santé est un élément essentiel avant que ces nanomatériaux puissent être utilisés. Ainsi, les mécanismes d'interaction de ces nanoparticules avec des fluides biologiques sont des caractéristiques importantes dans la compréhension de leur impact biologique.

Le but de cette thèse a été dans un premier temps de concevoir et d'optimiser un nanovecteur permettant le transport d'un médicament et présentant une bonne stabilité et des effets thérapeutiques élevés. Pour cela, une méthode de synthèse par complexation a été utilisée et a permis le développement de plusieurs nanovecteurs d'agents thérapeutiques (doxorubicine, docétaxel, paclitaxel ou bisphosphonates) pour le traitement du cancer par délivrance de médicament. De plus, puisque les nanoparticules d'or sont amenées à interagir avec différentes biomolécules lors de leur déplacement dans l'organisme, une étude sur le comportement des nanoparticules d'or face à différentes protéines a été réalisée. Enfin, les propriétés thermiques des nanoparticules d'or ont été étudiées en fonction de leurs propriétés intrinsèques.

Un premier chapitre bibliographique expose les différentes méthodes de synthèse des nanoparticules d'or ainsi que leurs propriétés physiques. Par la suite, sont présentées leurs principales applications dans le domaine de la santé, notamment la nanovectorisation et l'hyperthermie. Enfin, une dernière partie est consacrée aux interactions entre les nanoparticules d'or et les milieux biologiques.

Un second chapitre est consacré à l'élaboration d'un nanovecteur à base d'or, de polyéthylène glycol et de doxorubicine. La doxorubicine est utilisée ici en tant qu'agent anticancéreux et sera greffée aux nanoparticules d'or de deux manières différentes. Une première stratégie, très utilisée dans la bibliographie, est la synthèse des nanoparticules

d'or PEGylées à la surface desquelles est greffée la doxorubicine via une chimie carbodiimide. Une deuxième stratégie consiste à complexer les molécules de doxorubicine avec les ions auriques, avant de procéder à la réduction de l'or en présence du polyéthylène glycol. Après avoir caractérisé les propriétés physico-chimiques, de ces deux nanovecteurs, une série de tests biologiques et de cytotoxicité a été menée.

Un troisième chapitre présente l'étude des interactions protéines-nanoparticules d'or suivant la taille et la forme des nanoparticules. Pour cela, une étude de la diffusion des nanoparticules en présence de trois protéines différentes (albumine, glycoprotéine et lysozyme) a été effectuée grâce à la spectroscopie de corrélation de diffusion. Cette technique a permis la détermination d'un certain nombre de propriétés fondamentales telles que la constante de liaison des protéines avec les nanoparticules d'or, l'épaisseur de la couche protéique et la conformation de la protéine lors de son adsorption sur les nanoparticules. De plus, combinée à d'autres techniques, la SCS fournit une perspective générale sur la manière dont la taille et la forme des nanoparticules affectent l'adsorption des protéines.

Enfin, un quatrième chapitre présente les propriétés photothermiques des nanoparticules d'or. Il s'agit dans ce chapitre d'étudier l'élévation de température provoquée par les nanoparticules d'or, illuminées par un laser à 808 *nm*, suivant la taille et la forme des nanoparticules. Ce chapitre se conclut par une application photothermique de nanoparticules d'or complexées avec des molécules bisphosphonates dans des cellules cancéreuses.

Chapitre 1

Nanoparticules d'or pour la santé

La nanotechnologie est un vaste champ disciplinaire qui traite principalement de la synthèse, de la caractérisation et de l'exploitation de matériaux nanostructurés. Ces matériaux sont caractérisés par le fait qu'ils ont une taille dans la plage du nanomètre, ils constituent donc un pont entre les molécules et les systèmes macroscopiques.

L'un des domaines des nanotechnologies qui est encore au stade de développement est la nanomédecine. Ce domaine consiste en l'application des concepts et techniques des nanotechnologies dans le domaine biomédical et est actuellement en pleine croissance. L'utilisation des nanotechnologies dans ce domaine permet de créer de nouveaux systèmes qui pourraient révolutionner la manière dont un grand nombre de maladies peuvent être diagnostiquées et traitées.

Dans ce chapitre, une première partie sera consacrée à une étude bibliographique des différentes synthèses de nanoparticule d'or, de leurs propriétés ainsi que de leurs applications diverses. Dans une deuxième partie nous nous intéresserons plus particulièrement aux applications dans le domaine de la santé.

1.1 Les nanoparticules

Les nanotechnologies peuvent être définies comme étant les technologies des systèmes exploitant des nanoparticules, des nanostructures ou des propriétés de la matière à l'échelle nanométrique. Les particules de taille nanométrique possèdent des propriétés différentes de celles des matériaux à l'échelle macroscopique.

Il existe différentes sources de nanoparticules :

- Les nanoparticules provenant de sources naturelles : ces particules proviennent de feux de forêt ou d'éruptions volcaniques.
- Les nanoparticules provenant de sources accidentelles, c'est ce que l'on appelle des nanoparticules anthropiques : elles proviennent d'émission de fumée de diesel, de

tabac, etc.

- Les nanoparticules provenant de sources industrielles, qui sont fabriquées pour une application donnée.

Ici, nous allons nous intéresser au dernier cas c'est-à-dire aux nanoparticules fabriquées par l'homme dans un but précis.

Les domaines d'applications des nanoparticules sont très variés. Ils concernent aussi bien l'environnement, l'électronique, le textile, la décoration, l'alimentation, le cosmétique ou encore la santé (Figure 1.1). L'application visée va dépendre des propriétés intrinsèques de la nanoparticule et notamment du type de matériau utilisé.

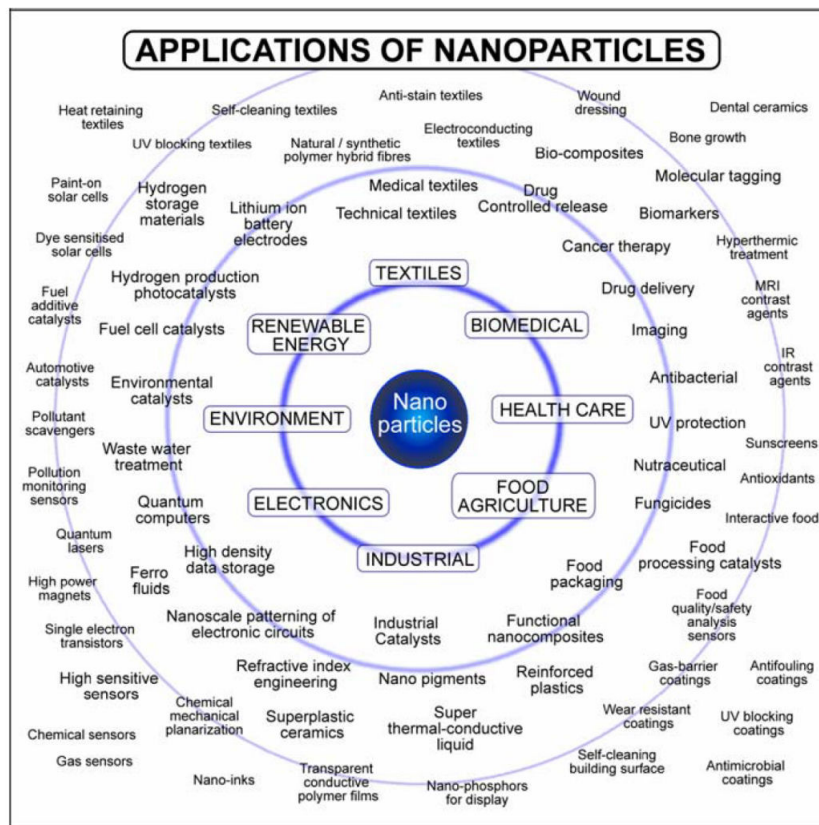


FIGURE 1.1 – Domaines d'application des nanoparticules (d'après Tsuzuki, 2009).

1.1.1 Définition

Une nanoparticule est définie comme étant un objet ayant une forme et une taille nanométrique bien définies, produit de façon naturelle, anthropique ou industriel. Cependant, ce qui définit réellement la nanoparticule est sa taille, si l'on considère la définition donnée par la norme ISO TS/27687 :2008 : une nanoparticule est un nano-objet dont les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique sachant que si la valeur de

la plus grande dimension et celle de la plus petite dimension diffère d'un facteur plus grand que trois, alors on ne parle plus de nanoparticule, mais plutôt de nanofibre ou nanofeuillet. Il est important de différencier les nanoparticules du nanoobjet qui lui est un matériau possédant une, deux ou trois dimensions externes comprises entre 1 et 100 *nm*. Les nanoobjets regroupent donc les nanoparticules, les nanofils et les nanofeuillets.

Lorsque l'on compare des nanoparticules avec des structures naturelles connues, les nanoparticules ont des tailles proches de celles des biomolécules telles que les protéines ou encore les virus (figure 1.2).

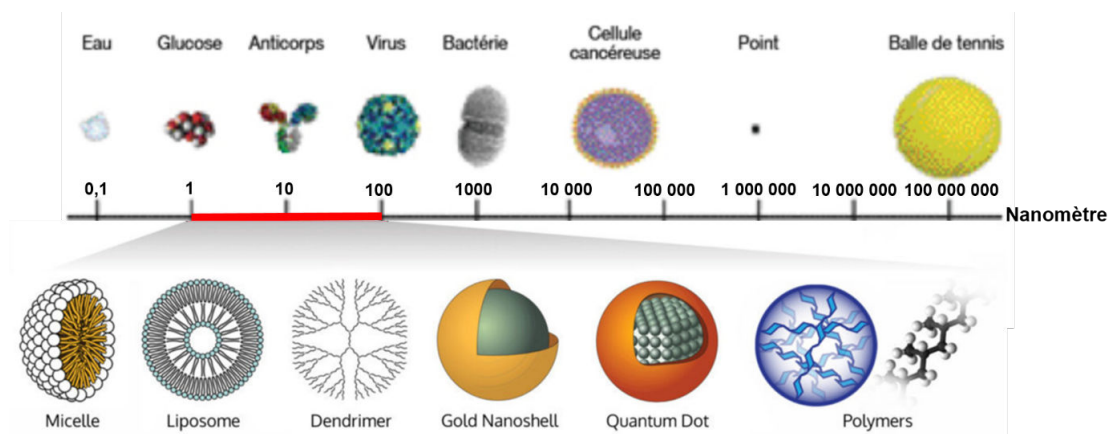


FIGURE 1.2 – Echelle comparant les nanoparticules à des structures allant jusqu'au centimètre. (Adapté de US National Cancer Institute).

Cette taille procure aux nanoparticules d'exceptionnelles propriétés physico-chimiques qui sont absente lorsque le matériau est à l'état massif.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux nanoparticules d'or.

Bien qu'elles sont synthétisées de manière contrôlées depuis moins de deux siècles, les nanoparticules d'or sont en fait utilisées depuis très longtemps. En effet, les nanoparticules d'or auraient été utilisées sous forme de solutions colloïdales, aux alentours du 4^{ème} siècle avant Jésus Christ, en Egypte et en Chine. En effet, à cette époque, l'or « soluble » était utilisé à des fins curatives. Cet or « soluble » destiné aux traitements de certaines maladies (la mélancolie, les maladies vénériennes ou des maladies cardiaques) a été utilisé jusqu'au Moyen-âge [1, 2]. Actuellement on peut encore trouver des solutions colloïdales d'or pour traiter l'arthrite rhumatoïde [3], l'anxiété ou encore la présence de nanoparticules d'or dans des crèmes auraient des effets anti-âge [4].

Les nanoparticules d'or ont aussi été utilisées à des fins artistiques, notamment dans la célèbre coupe de Lycurgus qui date de l'époque romaine [2, 5, 6]. En effet la présence

de nanoparticules d'or dans le verre de cette coupe lui procure des propriétés optiques particulières. Lorsque cette coupe est éclairée de l'extérieur (lumière réfléchi), elle apparaît verte (Figure 1.3A) alors que lorsque cette coupe est éclairée de l'intérieur (lumière transmise), la coupe apparaît rouge (Figure 1.3B). Ceci est dû aux propriétés optiques des nanomatériaux (essentiellement des nanoparticules d'argent et d'or) présents au sein de cette coupe, qui en interagissant avec la lumière vont absorber et diffuser la lumière.

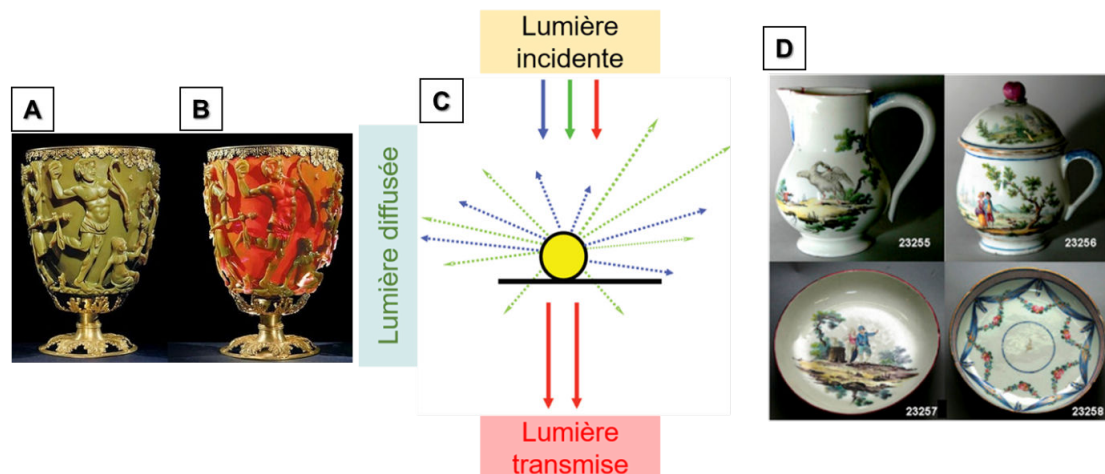


FIGURE 1.3 – Photographie de la Coupe de Lycurgus (d'après The trustees of the British Museum) éclairée de l'extérieur (A), éclairée de l'intérieur (B), origine des couleurs (C), Porcelaines de Sceaux [7] (D).

Au 18^{ème} siècle, des nanoparticules d'or colloïdales ont été utilisées dans une solution appelée pourpres de Cassius [1, 2] (qui est un mélange de chlorure aurique et d'étain) pour colorer des verres et des porcelaines (Figure 1.3D).

1.1.2 Synthèses et fonctionnalisation des nanoparticules d'or

Généralement les synthèses des nanoparticules d'or sont classées suivant deux voies :

- (i) par voie dite ascendante (Bottom-up), c'est-à-dire que l'on part de germes atomiques que l'on fait croître jusqu'à obtenir des nanoparticules.
- (ii) par voie dite descendante (Top-down), où dans ce cas, on part du matériau à l'état massif qu'on structure en parties plus fines jusqu'à obtenir des nanoparticules. (Figure 1.4)

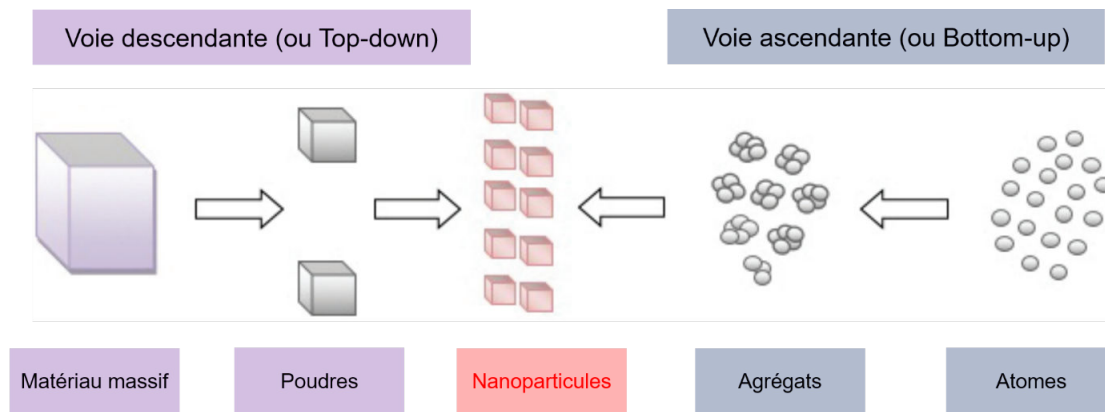


FIGURE 1.4 – Illustration des approches des deux voies de synthèses : Ascendante (à gauche) et Descendante (à droite).

a. La voie descendante

Les voies dites descendantes sont généralement des méthodes de synthèse qui utilisent des techniques physiques. Ces méthodes consistent à diviser la matière macroscopique grâce à une contrainte physique. Ce sont des méthodes qui vont utiliser des forces externes appliquées sur un solide et qui vont conduire à sa structuration à une échelle plus petite. La méthode la plus courante est la lithographie. Elle repose sur l'utilisation de couches minces métalliques ou non sur lesquelles seront bombardés des électrons ou des ions afin de dessiner des motifs, tels que des cylindres, des bâtonnets... , de tailles nanométriques sur ces surfaces.

Cependant, ces méthodes présentent des limites notamment au niveau de la taille des nano-objets puisqu'il est très difficile de descendre en dessous de 50 nm , mais aussi des limites économiques, puisque les instruments permettant la fabrication de ces nano-objets sont onéreux.

b. La voie ascendante

La voie dite ascendante consiste à produire et à assembler des composantes élémentaires, c'est-à-dire des atomes ou des molécules pour fabriquer des nanostructures simples ou élaborées en grandes quantités. Cette approche utilise des méthodes physiques ou chimiques lorsque l'élaboration est réalisée en phase gazeuse, comme par exemple la pulvérisation cathodique ou encore les dépôts chimiques en phase vapeur.

Lorsque cette approche est réalisée en phase liquide, les méthodes sont principalement des synthèses chimiques. Ces méthodes sont connues sous le nom de synthèses colloïdales et permettent de produire de grande quantité de nanoparticules. La méthode la plus utilisée pour le cas des nanoparticules d'or, est la synthèse par réduction chimique de sels d'or. La synthèse par réduction chimique nécessite l'utilisation d'agents stabilisant afin

d'éviter l'agrégation des nanoparticules d'or. Ainsi, le produit obtenu, c'est-à-dire la taille et la forme des nanoparticules, va dépendre du type d'agent stabilisant utilisé. Dans ce cas, la formation des nanoparticules se décompose en deux étapes qui sont la nucléation (formation d'un noyau à partir d'un précurseur moléculaire) et la croissance. C'est lors de cette deuxième étape que l'agent stabilisant va intervenir afin de limiter la croissance.

c. Le stabilisant

Le choix du stabilisant est très important car il peut influencer les propriétés des nanoparticules. Généralement, il existe deux manières de stabiliser les nanoparticules d'or : La méthode dite électrostatique (Figure 1.5). La stabilisation des nanoparticules se fait par l'intermédiaire des énergies d'interactions, notamment les forces de répulsion, entre les molécules adsorbées à la surface de la nanoparticule. Ainsi, ces molécules étant chargées, les charges de surface des nanoparticules sont identiques ce qui induit une répulsion entre les particules. Il faut savoir que cette méthode de stabilisation est très sensible à la force ionique de la solution.

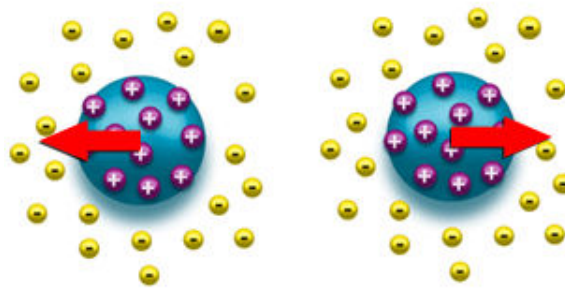


FIGURE 1.5 – Illustration d'une répulsion électrostatique.

La méthode dite stérique (Figure 1.6). Elle consiste à entourer la nanoparticule de polymères afin de constituer une barrière qui va limiter leur rapprochement à très courte distance et empêcher l'action de la force cohésive de Van der Waals.

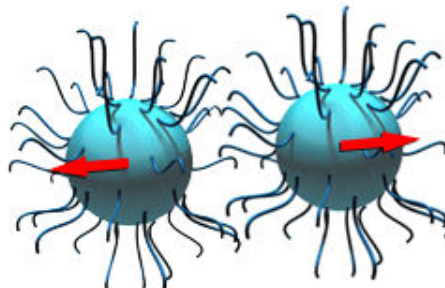


FIGURE 1.6 – Illustration d'une répulsion stérique.

d. La synthèse de solutions colloïdales

La première synthèse de colloïdes d'or a été effectuée par Michael Faraday en 1857. Faraday avait synthétisé des nanoparticules d'or en réduisant un sel d'or avec du phosphore solubilisé dans du disulfure de carbone. Il a étudié les propriétés optiques de films minces préparés à partir de solutions colloïdales séchées et observé les changements de couleur réversibles des films lors de la mise sous pression [8].

Une des méthodes de synthèse de nanoparticules d'or couramment utilisée, est la méthode dite de Turkevich qui a été réalisée par Turkevich & al en 1951 [9]. Elle consiste en la réduction d'un sel d'or en milieu aqueux où l'agent réducteur et l'agent stabilisant est le citrate de sodium (Figure 1.7). Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules de géométrie sphérique d'environ 20 nm.

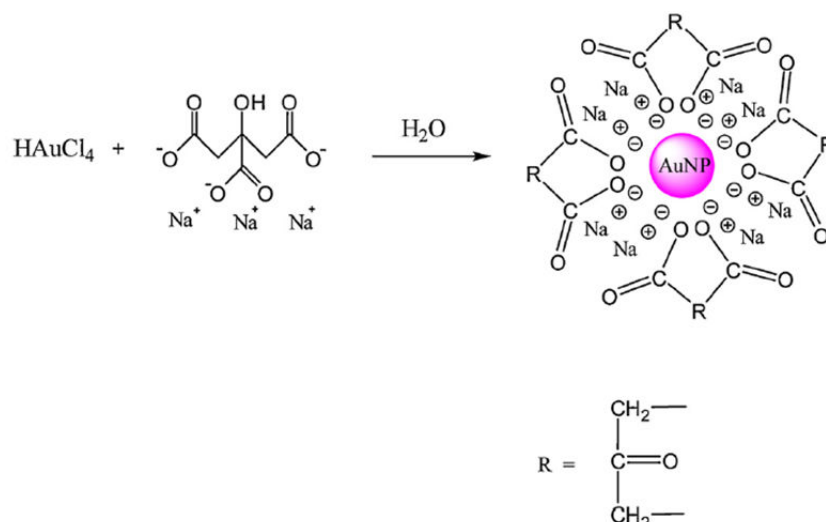


FIGURE 1.7 – Synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich [10].

Dans le cas de la méthode de Turkevich, les ions de citrate vont s'adsorber à la surface des nanoparticules pour les charger négativement afin de permettre une stabilisation par répulsion électrostatique et éviter l'agrégation des nanoparticules. Cette synthèse a été améliorée par Frens & al, pour obtenir des nanosphères d'or de taille variant entre 15 et 150 nm [10].

Une autre synthèse qui a révolutionné le monde de la chimie des nanoparticules d'or colloïdales, est la synthèse de Brust et Schiffrin qui, en 1994, ont permis la synthèse de nanoparticules d'or de petite taille et de diamètre contrôlable [11]. Cette synthèse se fait en milieu organique et consiste à réduire l'acide tétrachloroaurique par le tétrahydroborate de sodium, qui est un agent réducteur fort, en présence de molécules organiques thiolées. Ces dernières vont venir jouer le rôle d'agent stabilisant en formant une couche

protectrice autour des nanoparticules, et éviter, ou contrôler, leur agrégation. Cette synthèse a permis, et permet actuellement la synthèse de nanoparticules d'or entourées de polymères biocompatibles, tel que le polyéthylène glycol (PEG) thiolé, très utilisé dans le domaine biomédical.

Depuis de nombreuses synthèses ont été réalisées avec des agents stabilisants différents, des agents réducteurs doux/forts, afin de créer des nanoparticules de tailles et de formes contrôlées. C'est le cas de la méthode de synthèse de Murphy, qui a permis de synthétiser des nanobâtonnets, à partir de germes d'or [12]. Cette synthèse est dite « seed-mediated » en anglais ou synthèse à partir de germes. C'est une synthèse qui se déroule en deux étapes : une étape de germination puis une étape de croissance.

L'étape de germination et de nucléation permet l'obtention de nanoparticules d'environ 4 nm de géométrie sphérique, par réduction du sel d'or par le $NaBH_4$ en présence de CTAB. Ces germes sont ensuite incorporés à une solution de croissance contenant un sel d'or, un agent stabilisant (CTAB) et un agent réducteur faible (Acide ascorbique). Dans ce cas, l'agent réducteur étant faible, il n'est pas possible de réduire l'Au(III) en Au(0) sauf en présence des germes d'or qui joue un rôle de catalyseur. Ceci permet d'éviter la formation de nanoparticules secondaires. La variation de la taille de ces nanobâtonnets va se faire en fonction de la quantité de sels d'or présente dans la solution de croissance, mais aussi de la quantité de solution de graine incorporée dans la solution de croissance [13].

Le mécanisme de formation des nanobâtonnets fait toujours l'objet d'études, mais il a été démontré que la formation de bâtonnets est due à l'emplacement spécifique et préférentiel du CTAB sur certaines faces des nanoparticules sphériques. Ainsi, le CTAB agit comme un agent bloquant sur ces facettes afin de réduire la croissance dans ce sens et donc permettre l'allongement au niveau des autres facettes d'orientations cristallines différentes.

De plus, l'ajout d' $AgNO_3$ dans la solution de croissance permet de favoriser la formation de ces nano-bâtonnets [14]. La variation de la concentration d' $AgNO_3$ permet de faire varier le rapport d'aspect des nano-bâtonnets, c'est-à-dire le rapport de taille entre la longueur du nano-bâtonnet et de son diamètre. De la même manière que le CTAB, les ions Ag^+ issus de l' $AgNO_3$, s'adsorbent préférentiellement sur une facette de la surface des particules d'or limitant ainsi leur croissance dans un sens.

e. Synthèse de nanoparticules colloïdales par méthode biologique

De nouvelles manières de fabriquer des nanoparticules d'or émergent basées sur l'utilisation de méthodes biologiques. Dans ce cas, le mécanisme est similaire à celui de la synthèse chimique. La seule différence étant que les agents réducteurs utilisés sont des

biomolécules tels que des enzymes [15], ou encore des métabolites naturels présents dans des plantes [16], etc. Cette approche permet de supprimer l'utilisation de produits chimiques nocifs comme certains surfactants et stabilisants. Cette approche que l'on connaît sous le nom de chimie verte est donc une approche biocompatible et plus sûre.

1.1.3 Propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'or

Les nanoparticules, en terme de taille, sont situées à l'interface entre les atomes/molécules individuels et le matériau à l'état massif. Ainsi, elles n'obéissent donc ni à la physique quantique, ni aux lois de la physique classique. La structure électronique des atomes ou molécules individuels est caractérisée par des niveaux d'énergie discrets, alors que celle du matériau massif est caractérisée par des niveaux continus appelés bandes d'énergie (valence ou conduction). Dans le cas de la nanoparticule, la structure électronique change complètement et ne correspond ni à celle de l'atome et ni à celle de la matière condensée. En effet, la continuité des niveaux d'énergie est remplacée par un ensemble de niveaux d'énergies discrètes, c'est pourquoi la structure électronique des nanoparticules est un hybride entre celle d'un atome et celle du solide massif (Figure 1.8).

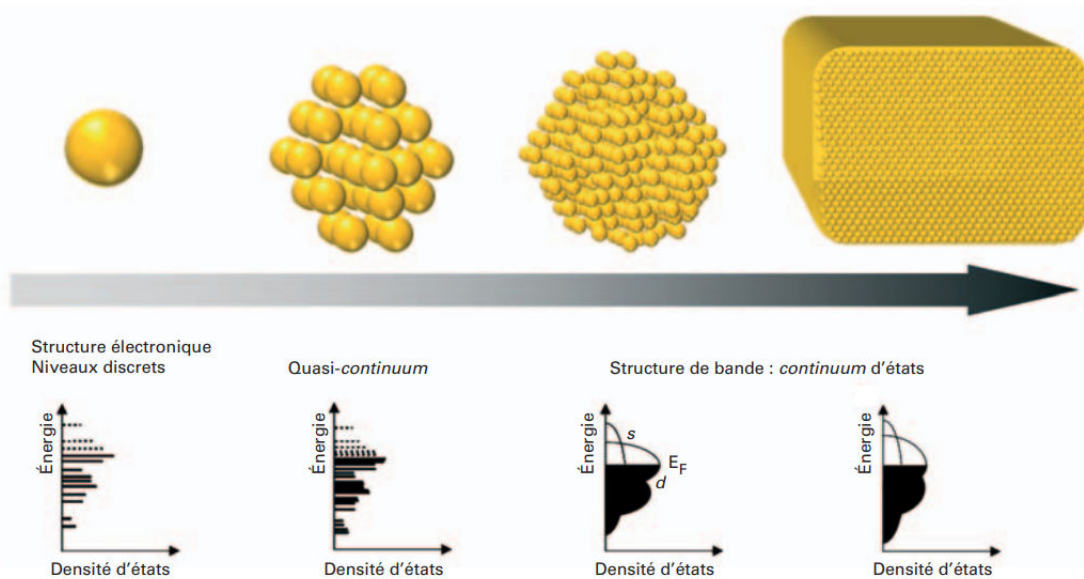


FIGURE 1.8 – Evolution de la structure électronique en fonction de la taille lorsque l'on passe de l'atome au matériau massif [17].

En conséquence de cette structure électronique particulière, les nanoparticules possèdent des propriétés optiques, catalytiques, thermiques ou encore biologiques uniques.

a. Le rapport surface sur volume

La particule à l'échelle nanométrique va présenter un rapport surface sur volume important. En effet, plus la taille d'une particule est petite et plus le nombre d'atomes présents en surface est grand. Cette grande fraction d'atomes présents en surface devient non négligeable par rapport au volume total de la particule et offre de nouvelles propriétés qui étaient inexistantes à l'état macroscopique. Ceci induit notamment une grande réactivité chimique de la nanoparticule d'or. Cette caractéristique de la nanoparticule va faciliter sa fonctionnalisation de la surface. Mais en contrepartie, elle est la cause du phénomène d'agrégation que l'on peut observer lors de la synthèse des nanoparticules.

b. Propriétés optiques

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec un métal, les électrons libres de la bande de conduction peuvent être excités. Cette interaction provoque l'oscillation collective des électrons libres à une fréquence imposée par le champ incident. Cette oscillation est appelée plasmon.

Lorsque cette interaction se produit à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique, ces plasmons sont dits de surface. Il en existe 2 types :

- Les plasmons de surface délocalisés ou plasmons de surface propagatifs : On observe ces plasmons dans des films métalliques minces déposés sur une surface diélectrique. Dans ce cas-là, l'oscillation créée se propage sur la surface métallique, mais reste confinée dans la direction perpendiculaire à la surface (onde évanescente).
- Les plasmons de surface localisés : les plasmons de surface sont confinés au sein d'une nanoparticule métallique. Ce genre de plasmon a la particularité de renforcer (exalter) le champ électromagnétique autour de la nanoparticule.

La théorie de Mie [18] permet de décrire l'interaction entre une onde électromagnétique et une particule sphérique de taille et de matériau quelconques et donne donc accès aux résonances plasmons dans le cas des nanoparticules métalliques. Ainsi, grâce à cette théorie, il est possible de calculer les sections efficaces de diffusion, d'absorption et d'extinction (qui est en fait la somme de celle de la diffusion et de l'absorption) des particules métalliques. Cette théorie permet de mettre en évidence l'influence des paramètres de particules sphériques (taille, type de métal, environnement) sur leur réponse optique.

Effet de la taille des nanoparticules

La taille de la nanoparticule est un paramètre important lors de l'interaction entre l'onde lumineuse et la particule. En effet, en faisant varier la taille de la particule, il est possible de décaler la position de la résonance plasmon dans l'ensemble de la gamme du visible. De plus, sachant que la couleur de solutions colloïdales contenant des particules

métalliques est directement liée à la position de la résonance plasmon, des solutions colloïdales d'or présentent des couleurs allant du rouge au bleu (Figure 1.9), simplement en modifiant la taille des particules.

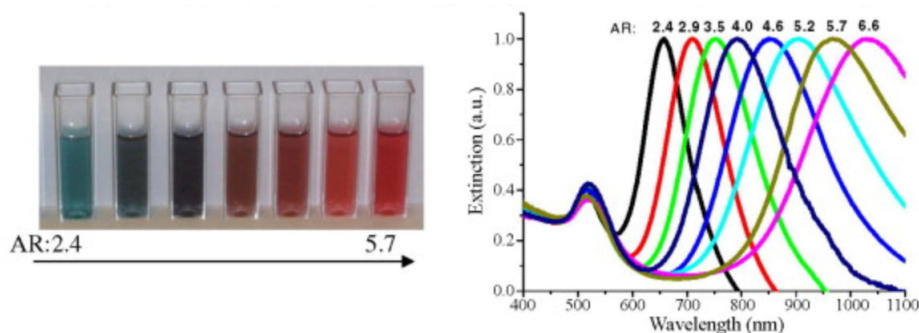


FIGURE 1.9 – Variation de la couleur (à gauche) et de la position de la bande plasmon (à droite) de différentes solutions de nanobâtonnets suivant leur rapport d'aspect [19].

Dans le cas de nanoparticules sphériques dont le diamètre (D) est très petit par rapport à la longueur d'onde ($\lambda \gg D$), on peut appliquer l'approximation quasi-statique (ou de Rayleigh). Le champ incident est alors considéré comme constant dans l'ensemble de la nanoparticule. Dans ce cas-là, le spectre d'extinction est dominé par l'absorption comme le montre la figure 1.10, et la position de la résonance de plasmon dépend uniquement des indices de réfraction du métal et du milieu environnant.

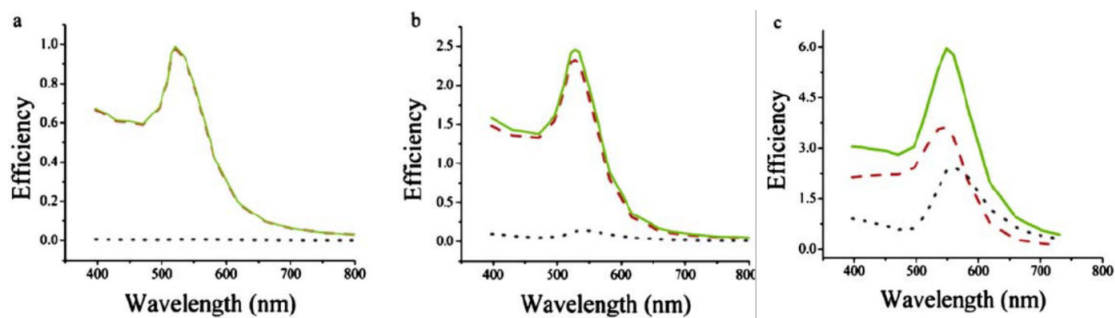


FIGURE 1.10 – Spectres calculés de l'efficacité d'absorption (en rouge pointillé), de diffusion (en noir pointillé) et d'extinction (en vert pointillé) pour des nanosphères d'or de 20 nm (a), 40 nm (b) et 80 nm (c) de diamètre [20].

Ainsi, en faisant varier la taille des nanoparticules, il est possible de déplacer la position de la résonance plasmon sur l'ensemble de la gamme du visible voire dans le proche infrarouge, comme le montre les figures 1.9 et 1.11. De plus on peut voir pour le cas des nanosphères sur la figure 1.11, que plus la taille des nanosphères diminue, plus la position de la résonance plasmon se déplace vers les faibles longueurs d'onde.

Dans le cas des particules ayant une taille située au-delà de 100 nm de diamètre, la théorie

de Mie prédit l'apparition de modes de résonance d'ordres supérieurs multipolaires (ordres quadripolaire, hexapolaire. . .).

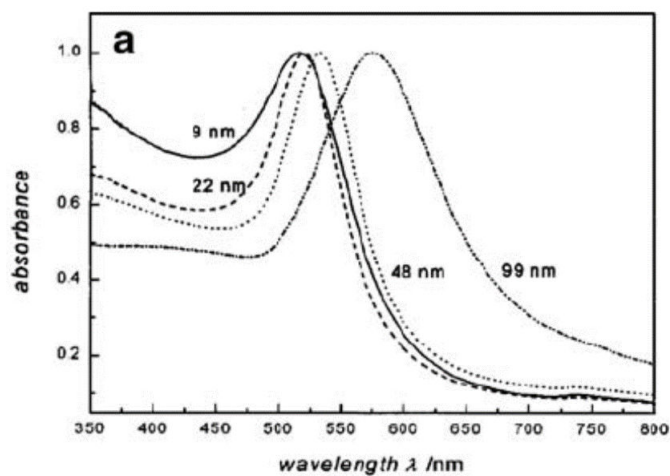


FIGURE 1.11 – Spectres d’extinction des nanoparticules d’or sphérique de différents diamètres allant de 9 à 99 nm [21].

Effet de l’indice de réfraction

D’après la théorie de Mie, la position de la résonance plasmon va aussi dépendre de l’indice de réfraction du milieu environnant la nanoparticule. Il est montré que plus l’indice du milieu environnant augmente, plus la position de la résonance plasmon se décale vers de plus grandes longueurs d’onde (Figure 1.12). Ceci est dû à un amortissement et une perte d’énergie du plasmon de surface causés par l’interaction du champ avec son milieu.

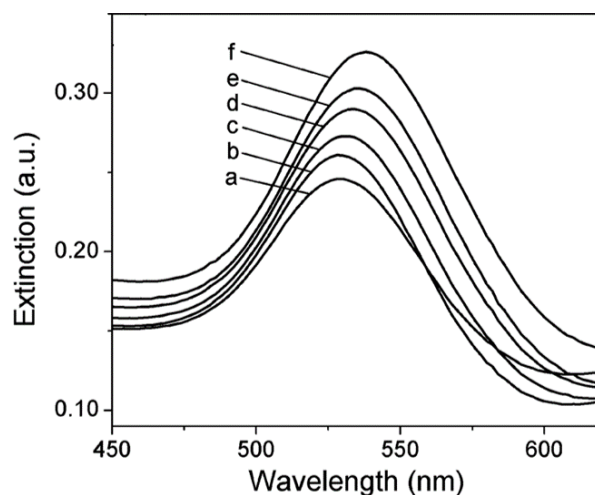


FIGURE 1.12 – Position de la bande plasmon de solution de nanoparticule de diamètre de 50 nm en fonction de l’indice de réfraction du milieu : (a) $n = 1,33$; (b) $n = 1,36$; (c) $n = 1,39$; (d) $n = 1,43$; (e) $n = 1,46$; (f) $n = 1,5$ [22].

Effet de la forme

Cet effet a été traité par Richard Gans [23], par extension de la théorie de Mie, en prenant le cas d'un ellipsoïde défini par ses axes a , b , et c (lorsque ses trois axes sont égaux, on obtient une sphère). Il a montré que la réponse optique est modifiée en changeant la forme de la nanoparticule (pour un même métal et dans un même environnement).

Dans le cas d'une nanoparticule métallique non sphérique, le plasmon de la nanoparticule est réparti de façon inhomogène, ce qui a pour conséquence un changement dans le spectre d'extinction de cette nanoparticule. En effet, dans le cas des nano-bâtonnets d'or, il y a une levée de dégénérescence de la résonance plasmon selon les trois directions. Il y a apparition de deux bandes plasmon à haute énergie correspondant aux modes transversaux (oscillation des électrons perpendiculairement à l'axe principal), et une bande plasmon à basse énergie correspondant au mode longitudinal (oscillations des électrons le long de l'axe principal). La position de ces modes va dépendre du rapport d'aspect, rapport entre la longueur du nano-bâtonnet et le diamètre. Lorsque le rapport d'aspect augmente, le mode longitudinal se déplace vers de plus grande longueur d'onde, jusqu'à atteindre l'infrarouge.

Ainsi, les résonances plasmon des nanoparticules d'or anisotropes peuvent être positionnées dans la fenêtre thérapeutique optique (700 à 900 nm), c'est-à-dire la gamme spectrale permettant une pénétration de la lumière en profondeur dans les tissus (sur plusieurs millimètres), comme le montre la figure 1.13.

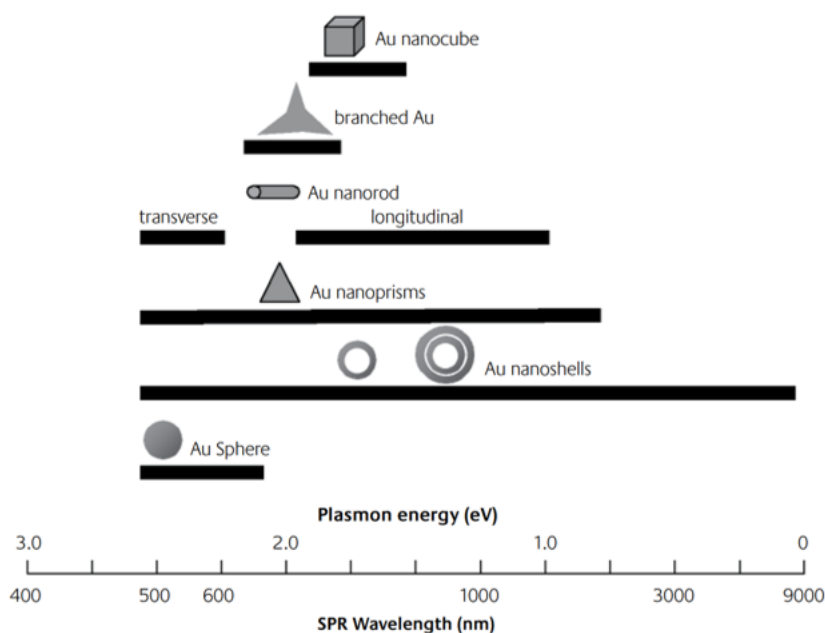


FIGURE 1.13 – Gamme spectrale de la résonance plasmon des nanoparticules d'or en fonction de leur forme [24].

Comme nous avons pu voir, les fréquences de résonance plasmon des nanoparticules d'or vont dépendre de plusieurs paramètres : la taille et la forme de la particule et l'indice de

réfraction du milieu environnant.

Les propriétés plasmoniques de l'or ont beaucoup été utilisées dans la coloration de différents matériaux. Aujourd'hui ces propriétés sont très utilisées dans le domaine biomédical, notamment pour la détection précoce de cancer via la fabrication de biocapteur, pour l'exaltation de certains signaux en imagerie, mais aussi pour la destruction de cellules cancéreuses par thérapie photothermique.

1.1.4 Applications

Au vu des propriétés exceptionnelles des nanoparticules d'or, on les retrouve dans diverses applications. Leurs propriétés plasmoniques, qui donnent accès à une palette de couleur allant du rouge au bleu, font qu'on les retrouve dans des applications décoratives, comme nous l'avons vu précédemment, les nanoparticules d'or ont été retrouvées dans des poteries, dans la célèbre coupe de Lycurgus, dans les vitraux des cathédrales,...

L'or à l'état nanométrique étant très réactif (rapport surface sur volume important), on retrouve les nanoparticules d'or dans le domaine de la catalyse. Celles-ci ont notamment été utilisées pour la conversion de l'oxyde de carbone en dioxyde de carbone (nanoparticules d'or de taille inférieure à 5 *nm*) à température ambiante [25]. La première application industrielle des nanoparticules d'or en catalyse, a été réalisée au Japon, en 1992, pour décomposer les molécules odorantes dans les toilettes.

De plus, on peut aussi retrouver l'or dans des applications électroniques, telles que la fabrication de transistors à un électron [26] (stade du prototype) ou encore dans la miniaturisation de composants électroniques [27].

Enfin, de par leurs propriétés plasmoniques et thermiques, mais aussi pour leur biocompatibilité, les nanoparticules d'or sont exploitées dans le domaine biomédical, c'est-à-dire dans ce que l'on appelle la nanomédecine. En effet, la nanomédecine est un domaine où l'on va utiliser des nanomatériaux de différents types tels que des liposomes, des polymères, des métaux, et donc dans notre cas des nanoparticules d'or, afin de diagnostiquer, traiter ou les deux simultanément (théranostic) des maladies (cancer, maladies cardiovasculaires...).

Cependant, leur utilisation pour des applications médicales est limitée par la faible connaissance de leur toxicité.

1.2 Application dans la santé

L'or a toujours existé dans le domaine de la santé. Un nom a d'ailleurs été donné à cette pratique, c'est la chrysothérapie.

Historiquement, les premières utilisations de l'or dans le domaine de la santé datent de

l'antiquité. Les chinois et les égyptiens l'utilisaient pour traiter différentes maladies de peaux, ulcères, varioles etc [28]. C'est ensuite à partir du 17^{ème} siècle, que sont apparus en Europe des élixirs d'or pour le traitement de la fièvre et de la syphilis [29]. Actuellement on trouve l'or dans des implants tels que les stents coronariens [30], la restauration dentaire [31], mais aussi dans le traitement de la tuberculose ou la polyarthrite rhumatoïde [32]. Enfin, l'or est aussi utilisé dans le diagnostic de maladie notamment avec l'or radioactif, Au^{198} , qui est utilisé comme marqueur pour les scintigraphies hépatiques [33]. Actuellement, la recherche met l'accent sur l'utilisation de ce métal à l'état nanométrique. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, les nanoparticules d'or ont montré des propriétés spécifiques à cette échelle, notamment des propriétés plasmoniques qui sont très utilisées dans le domaine médical. En effet, on peut trouver des travaux utilisant des nanoparticules d'or dans le traitement des cellules cancéreuses par thérapie photothermique et par thérapie radiofréquence, qui sont des méthodes non invasives et très efficaces.

De plus, les nanoparticules d'or sont de plus en plus utilisées comme nanovecteurs dans la délivrance de molécules thérapeutiques, comme en témoigne différentes études menées par Rotello (délivrance d'ADN) [34] ou encore Mirkin (thérapie génique) [35].

Cependant, bien qu'étant biocompatibles et utilisées comme agents thérapeutiques, des incertitudes existent sur leur éventuelle toxicité. Des études ont montré que la toxicité des nanoparticules d'or proviendrait de leur chimie de surface, de leur forme et de leur taille.

1.2.1 Nanovecteurs

Généralement, les médicaments sont administrés soit par voie orale soit par injection à l'organisme. Cependant, la quantité de médicament atteignant la cible est très faible par rapport à la dose injectée initialement. L'accumulation de principe actif dans les tissus sains peut conduire à des effets secondaires néfastes. De plus, la plupart des principes actifs utilisés dans le traitement de différentes maladies sont dégradés chimiquement ou enzymatiquement par l'organisme. Enfin, si on prend le cas de nombreux médicaments utilisés en chimiothérapie, il est apparu que certaines cellules cancéreuses développent une résistance croisée pour ces substances anticancéreuses. En effet, après l'emploi d'un agent anticancéreux en chimiothérapie, de nombreuses cellules expriment une résistance à différentes molécules telles que les anthracyclines. Ce phénomène est appelé résistance multi-drogue (MDR). Elle induit une diminution de la captation des médicaments par la cellule et une augmentation de leur efflux. Ceci a pour conséquence une diminution de leur concentration intracellulaire et l'augmentation du gène MDR qui code la protéine responsable de l'efflux cellulaire [36].

Ainsi, la vectorisation de médicaments pourrait permettre de pallier ces problèmes. En effet cette méthode va permettre d'une part de protéger le médicament contre ces dégradations, augmenter l'index thérapeutique (amélioration de l'efficacité et diminution de la toxicité) de certains principes actifs en les adressant de manière spécifique vers les cellules malades, mais aussi faciliter le passage à travers des barrières biologiques [37]. Cette méthode est développée comme une nouvelle stratégie dans le traitement et/ou le diagnostic de différentes maladies, en particulier le cancer.

La vectorisation de médicament est une des applications privilégiée en nanomédecine. Elle consiste généralement à apporter un principe actif spécifiquement vers des cellules cibles. Ces principes actifs peuvent être de différents types selon l'application envisagée :

- ADN ou oligonucléotides pour la thérapie génique [34, 35].
- Agents anticancéreux (doxorubicine, paclitaxel, ...) pour la chimiothérapie [6, 38]
- Des facteurs de croissance dans le but de réparer un tissu [39].
- Des marqueurs fluorescent, radioactif, magnétique ou plasmonique pour une application diagnostique ou théranostique pour les deux derniers cas [6].

Il existe actuellement plusieurs nanovecteurs sur le marché (Figure 1.14). Le plus connu et le premier à être approuvé est le Doxil®, qui est un liposome pegylé qui encapsule la doxorubicine, molécule très utilisée en chimiothérapie, notamment pour le traitement du cancer ovarien [40].

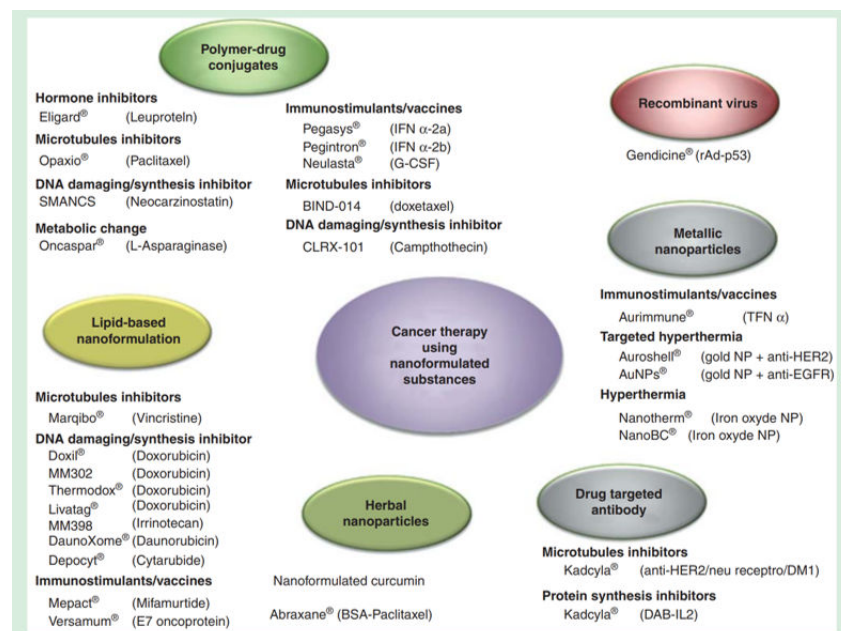


FIGURE 1.14 – Aperçu des différents types de nanoformulations trouvés dans le marché [41].

Le vecteur va jouer un rôle primordial dans la vectorisation des molécules, c'est donc un élément clé. Pour être efficace, le vecteur idéal doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Il doit être composé d'un matériau biocompatible, non toxique pour l'organisme, stable en milieu physiologique et pouvoir être facilement éliminé par l'organisme une fois que le principe actif a été libéré. Parmi ces systèmes, on peut citer les liposomes, les dendrimères, les polymères, les nanoparticules de fer ou d'or. En général, les nanoparticules métalliques sont recouvertes d'une couche de polymères pour former des nanoparticules hybrides.
- Il doit avoir une forte affinité avec le principe actif qu'il va transporter. Le vecteur doit également permettre au principe actif de rester stable tout au long de l'acheminement.
- Il doit avoir une longue durée de vie dans la circulation sanguine et posséder une grande spécificité pour les cellules cibles.
- Il doit avoir une taille adéquate afin de permettre à la fois le transport d'une quantité suffisante de principes actifs, mais aussi permettre sa diffusion à travers les barrières physiologiques pour atteindre la cellule cible.
- Une fois la cellule cible atteinte, il doit pouvoir procéder à la libération du principe actif dans la cellule cible ou à proximité, via différents processus (dépendant du type de matériau utilisé). Il existe différents types de processus de libérations tels que la rupture enzymatique, la libération sous l'effet d'une modification du pH ou de la température. . .

On distingue trois générations de nanovecteurs :

a. Les vecteurs de première génération

Ce sont en général des colloïdes stables sur lesquels est accroché le principe actif afin de ralentir leur élimination par le système rénal. L'effet de ces particules est alors prolongé. Cependant, bien que ce genre de particules permette le ralentissement de leur élimination par voie rénale, elles sont tout de même considérées comme étant des corps étrangers par l'organisme et donc facilement reconnues par le système immunitaire. Lorsque ces nanoparticules se retrouvent dans le sang, elles sont rapidement reconnues par des protéines que l'on appelle opsonines. Ces protéines vont s'adsorber à la surface des vecteurs, ce qui provoque leur reconnaissance par le système réticuloendothélial, notamment les macrophages qui vont procéder à leur phagocytose.

Ces nanovecteurs de première génération ont donc une courte durée de vie en circulation sanguine, et s'accumulent généralement dans certains organes comme le foie et la rate.

Ceci pourrait être tout de même avantageux pour cibler ces organes.

Cependant, si le but n'est pas de cibler les macrophages, le foie ou la rate, il faut rendre ces nanoparticules « furtives » vis-à-vis du système immunitaire, afin de réduire le phénomène d'opsonisation, et donc augmenter leur temps de circulation dans le sang afin qu'elles puissent atteindre leur cellule cible. C'est le cas des vecteurs de deuxième génération.

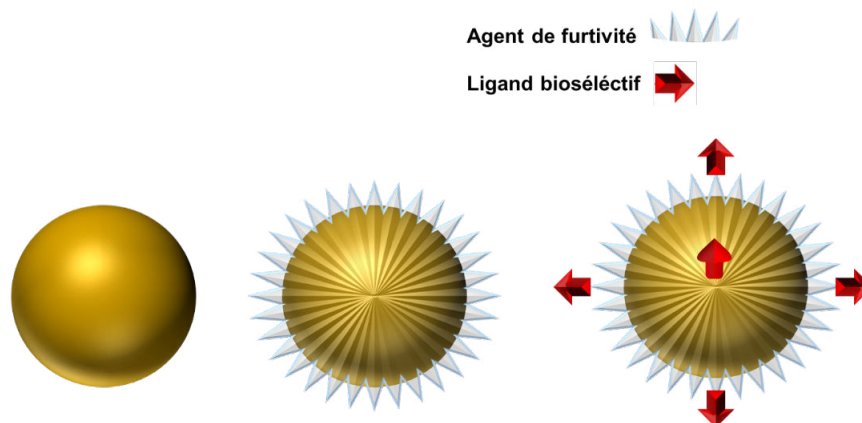


FIGURE 1.15 – Les 3 générations de nanovecteurs : Première génération avec une nanoparticule « nue » (à gauche), Deuxième génération avec une nanoparticule « furtive » (au centre), et troisième génération avec une nanoparticule « furtive et ciblante » (à droite).

b. Les vecteurs de deuxième génération

Ce sont des colloïdes dont la surface a été modifiée par un polymère hydrophile, le plus souvent avec du polyéthylène glycol, afin de rendre les nanoparticules « furtives » vis à vis des défenses immunitaires (Figure 1.15). Ces nanovecteurs permettent donc de réduire le phénomène d'opsonisation et donc leur phagocytose par les macrophages comme le montre la figure 1.16, où l'on peut voir que lorsque les nanoparticules sont pegylées, elles ont tendance à être moins présente dans ces cellules protectrice de l'organisme. Ainsi, cette protection de la nanoparticule va permettre un plus long temps de circulation dans le sang et donc le relargage du principe actif dans le sang, ou une accumulation de ces particules au sein du tissu par ciblage passif.

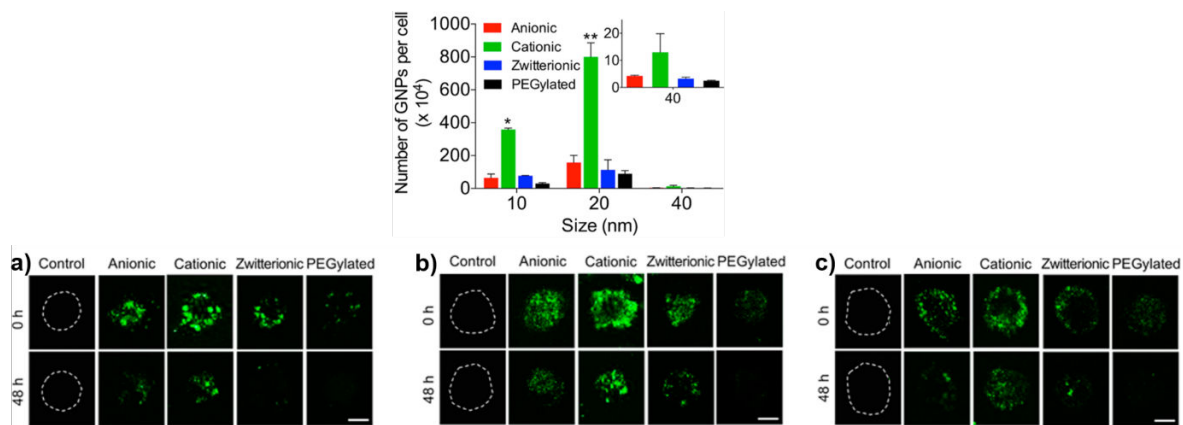


FIGURE 1.16 – En haut : Quantité de nanoparticules d’or captée par les macrophages suivant leur taille et leur chimie de surface. En bas : Image microscopique des nanoparticules d’or de différentes chimie de surface, de 10 nm (a), de 20 nm (b) et de 40 nm (c), résident dans les macrophages après 0h et 48h d’incubation [42].

Ces nanoparticules « furtives », bien qu’elles aient une longue durée de vie de circulation sanguine, elles finissent par être éliminées et le plus souvent ont du mal à atteindre un tissu spécifique. Ainsi, pour qu’elles puissent atteindre un tissu spécifique, il est indispensable de fonctionnaliser ces nanovecteurs avec un ligand spécifique qui sera reconnue par la cellule cible. C’est la fonction des vecteurs de troisième génération.

c. Les vecteurs de troisième génération

Afin de pouvoir cibler une cellule donnée, ces nanoparticules sont dotées non seulement d’une protection qui les rend « furtives », mais leur surface est également fonctionnalisée avec des ligands biosélectifs, qui permettent un ciblage actif par reconnaissance cellulaire (Figure 1.15). Ces ligands sont de différents types : anticorps, oligonucléotides, des peptides ou d’autres molécules telles que l’acide folique ou des saccharides ; ils permettent donc un ciblage actif des cellules cancéreuses.

Au fur et à mesure de l’évolution des nanovecteurs, on voit se construire une nanoparticule idéale pour une délivrance ciblée de médicaments. Un nanovecteur idéal serait donc une nanoparticule de type plateforme contenant différents types d’agents : thérapeutique, de furtivité, de ciblage, de contraste (permettant le suivi de la vectorisation et de son devenir), améliorant la pénétration de certaines barrières biologiques. Ainsi, on obtiendrait une nanoparticule multifonctionnelle comme proposé par Ferrari [43] (Figure 1.17).

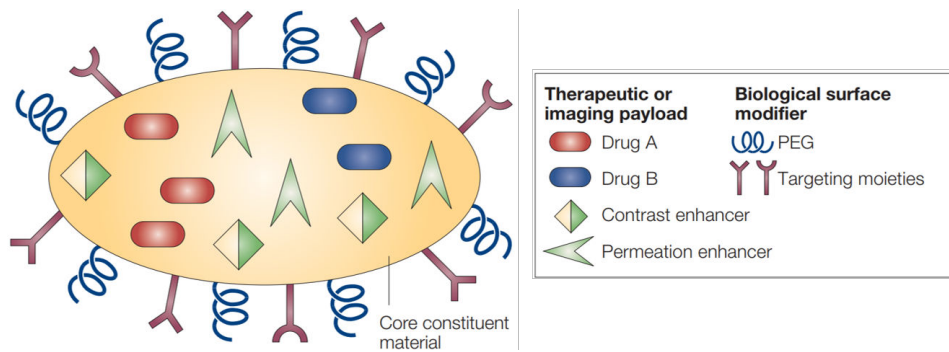


FIGURE 1.17 – Nanoparticule multifonctionnelle : illustration de différents types d’agents permettant la création du nanovecteur idéal [43].

Il existe deux stratégies de passage des nanovecteurs à travers les cellules cancéreuses [44] :

- **Le passage passif** : Dans ce cas-là, les nanoparticules se servent du fait que la cellule tumorale possède deux anomalies anatomiques différentes. D’une part, une cellule tumorale possède un endothélium vasculaire très perméable, ce qui permet un apport en nutriment important afin de favoriser la croissance tumorale. Cette anomalie est utilisée afin de favoriser l’influx des nanoparticules. D’autre part, la cellule tumorale possède un drainage lymphatique déficient, ce qui est favorable à la libération de molécules au sein de la tumeur. Ce phénomène est appelé « effet EPR » pour Enhanced Permeability and Retention effect, soit effet de perméabilité et rétention exaltées. Ainsi, grâce à ce phénomène, les particules de taille adaptée pourront traverser les vaisseaux afin de s’accumuler au niveau de la tumeur. La taille de la particule est un facteur important car si elle est trop grosse, elle ne passera pas à travers les vaisseaux endothéliaux, et si elle est trop petite, elle va être éliminée de l’organisme par voie rénale. De plus, cette particule doit être « furtive » afin qu’elle ait une longue durée de circulation sanguine et qu’elle puisse s’accumuler au sein des cellules tumorales. Cependant, le phénomène EPR très utilisé jusqu’à présent ne serait pas aussi fiable qu’il y paraît. En effet, il a été montré que l’utilisation de modèles de tumeurs chez les animaux pour étudier l’EPR diffère des tumeurs humaines en phase clinique et il semblerait que l’effet EPR soit plus prononcé chez l’animal que chez l’homme. De plus, l’administration de médicaments utilisant cette voie serait compliquée à cause de la présence d’une pression élevée du liquide interstitiel tumoral, de la distribution vasculaire irrégulière et du flux sanguin médiocre présent au sein de la tumeur. Ainsi, il serait judicieux d’évoquer le phénomène EPR au cas par cas, c’est-à-dire lorsque des preuves cliniques prouvent la sensibilité des tumeurs à cet effet.
- **Le passage actif** : Cette stratégie de passage est possible si et seulement si les nanoparticules sont fonctionnalisées par des molécules spécifiques permettant la re-

connaissance de récepteurs spécifiques présents sur la cellule malade. Cette stratégie permet d'accentuer le ciblage afin d'éviter les interactions du médicament avec des cellules saines.

1.2.2 La thérapie photothermique

La thérapie photothermique utilisée pour le traitement des cancers consiste à chauffer des nanoparticules métalliques au sein des cellules cancéreuses afin de provoquer la mort cellulaire. Les nanoparticules d'or sont de plus en plus utilisées pour ce genre de thérapie, d'une part du fait qu'elles soient biocompatibles, mais aussi du fait de leurs propriétés optiques et thermiques. En effet, lorsque les nanoparticules d'or sont illuminées par un laser, elles vont absorber fortement l'énergie du laser et par la suite relaxer cette énergie sous forme de chaleur conduisant à la destruction des éléments biologiques autour d'elles. Pour que cette méthode soit efficace, les nanoparticules d'or doivent tout d'abord pouvoir cibler les cellules cancéreuses. Pour cela, comme nous l'avons vu précédemment, soit les nanoparticules d'or vont cibler les tumeurs de manière passive, ou active.

De plus, les nanoparticules d'or doivent pouvoir être excitées par un laser en profondeur des tissus tout en préservant l'intégrité des tissus biologiques lors de leur chauffage (entre 41°C et 47°C) [45]. Ainsi, il existe une zone spectrale que l'on dit de transparence des tissus humains et qui est située entre 650 et 1100 nm [46]. Pour cette plage spectrale, la lumière pourra pénétrer les tissus sur une profondeur importante en raison d'une absorption minimale de l'hémoglobine (Figure 1.18) et des molécules d'eau dans cette région spectrale. Ainsi, la production de nanoparticules d'or dont l'absorption optique est située dans cette plage est importante afin d'exciter efficacement les nanoparticules.

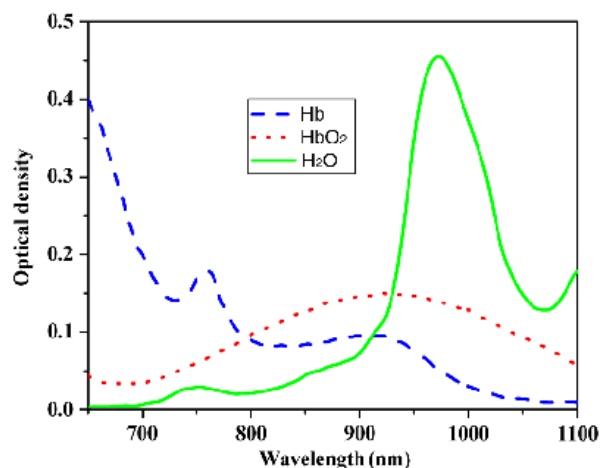


FIGURE 1.18 – Spectres d'absorption de l'eau, de l'hémoglobine (HbO_2) et de la désoxyhémoglobine (Hb) dans la zone spectrale 650 à 1100 nm [46].

L'utilisation des nanoparticules d'or pour cette thérapie, va induire deux morts cellu-

lares différentes suivant l'augmentation de la température induite. En effet, une légère augmentation de température (jusqu'à 43°C au sein de la cellule) va déclencher des voies apoptotiques [47] en altérant différentes fonctions cellulaires normales, entraînant une perte de l'homéostasie cellulaire ainsi que la dénaturation de protéines et enzymes. De plus, ce choc thermique va générer la fragmentation de l'ADN et l'arrêt de la prolifération cellulaire. Des augmentations plus rapides et plus importantes de température produisent des morts cellulaires par nécrose. Dans ce cas-là, la rupture de la membrane cellulaire est souvent prédominante.

Les propriétés photothermiques des nanoparticules d'or ont déjà été étudiées par Link & El-Sayed [48]. Ils ont montré que l'excitation des nanoparticules métalliques par une source lumineuse entraîne l'échauffement du gaz d'électrons présent au niveau de ces particules qui par la suite se désexcite rapidement (en environ 1 *ps*) en transférant l'énergie au réseau atomique. Ceci est suivi par des interactions phonon-phonon où le réseau métallique se refroidit en transférant l'énergie au milieu environnant (~ 100 *ps*). Ces conversion et dissipation d'énergie rapide peuvent être utilisée pour traiter les cellules cancéreuses, puisqu'elle permet de chauffer l'environnement local des nanoparticules d'or en utilisant un rayonnement lumineux. Ce processus est d'autant plus efficace que la fréquence du laser est proche de la résonance plasmon des nanoparticules. Link & El-Sayed [48] ont montré que des températures de quelques dizaines de degrés pouvaient être atteintes avec des puissances d'excitation laser d'environ 100 nJ.

Cette production efficace d'énergie thermique à partir de l'énergie lumineuse absorbée par les nanoparticules d'or les rend très attrayantes pour la thérapie photothermique des cancers.

1.2.3 Interaction des nanoparticules avec les milieux biologiques

Il est important de comprendre les mécanismes d'interaction qui entrent en jeu lorsque les nanoparticules sont placées dans des milieux biologiques. C'est un point encore plus important pour la nanomédecine. En effet la compréhension de ces interactions peut permettre d'appréhender non seulement leur internalisation cellulaire, mais aussi leur biodistribution au sein de l'organisme et donc d'estimer leurs éventuelles efficacités ou leur toxicité.

La membrane plasmique est une structure dynamique permettant la séparation entre le milieu intracellulaire (le cytoplasme) et l'environnement extracellulaire, tout en régulant l'entrée et sortie de molécules. Les petites molécules essentielles à la survie de la cellule (acides aminés, sucres et ions) peuvent entrer dans la cellule simplement en traversant la membrane plasmique via des pompes ou des canaux protéiques ancrées dans la membrane.

Les plus grosses molécules doivent, quant à elles, être transportées dans la cellule, via des vésicules membranaires formées via l'invagination et le pincement de morceaux de membrane plasmique, c'est ce que l'on appelle le processus d'endocytose.

L'endocytose est un processus qui est divisé en deux grandes catégories : la phagocytose et la pinocytose qui est elle-même divisée en quatre mécanismes, la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéoline-dépendante et l'endocytose indépendante de la clathrine et la cavéoline (Figure 1.19). Ces différents mécanismes d'endocytose permettent de contrôler des processus physiologiques dont l'homéostasie cellulaire.

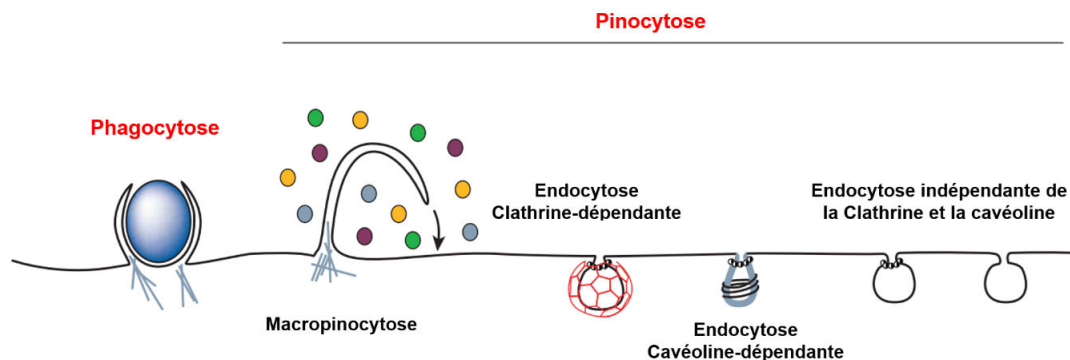


FIGURE 1.19 – Les différentes voies d'entrée des nanoparticules par endocytose [49].

La phagocytose (ou « cellule qui mange ») est un mécanisme d'endocytose utilisé principalement par les cellules immunitaires (macrophages, neutrophile et cellules dendritiques), elle constitue un système de défense contre les organismes étrangers, et élimine les cellules mortes par apoptose. Ce mécanisme permet la formation de vésicules que l'on appelle phagosomes de taille supérieure à $5 \mu m$ [50, 51], et dépend de l'actine du cytosquelette. Comme nous l'avons vu précédemment, ce processus intervient lors de l'opsonisation des nanoparticules. En effet, lorsque la nanoparticule est reconnue par certaines protéines que l'on appelle les opsonines, ces protéines s'adsorbent à la surface des nanoparticules afin qu'elles puissent être reconnues par les cellules phagocytaires, grâce aux récepteurs présents à la surface des cellules, et être phagocytées. Ainsi, la chimie de surface des nanoparticules (pour éviter la reconnaissance par les opsonines) est un point important pour éviter d'être phagocytées par les macrophages.

La pinocytose (ou « cellule qui boit ») existe dans tous les types de cellules et regroupe donc :

- **L'endocytose dépendante des clathrines.** Elle se caractérise par la formation de vésicules de 100 à 200 nm [52], recouverte d'un manteau protéique composé principalement de clathrines. Cette voie d'internalisation n'est possible que par activation des récepteurs membranaires par des ligands spécifiques tels que les immunoglobulines, la transferrine, l'insuline, le LDL ou encore l'EGF.

- **L’endocytose dépendante des cavéolines.** Elle se caractérise par la formation de vésicules de 50 à 100 *nm* [52], riches en cavéolines et en lipides. De la même manière que pour l’endocytose dépendante des clathrines, cette voie peut être induite par la présence de protéines.
- **La macropinocytose.** Elle se caractérise par la formation de vésicules de très grandes tailles (jusqu’à 5 μm) que l’on appelle macropinosomes [51]. L’internalisation par cette voie n’est possible que par la présence de facteurs de croissance ou d’agents mitogènes.
- **L’endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles.** Elle provoque la formation de petites vésicules au sein de la cellule. C’est un processus utilisé par la cellule pour transporter des molécules, mais les mécanismes qui régissent cette voie sont encore mal compris.

Ainsi, l’internalisation des nanoparticules peut se faire via ces différentes voies. La préférence d’un processus par rapport à l’autre va se faire suivant différents paramètres dont les paramètres intrinsèques des nanoparticules. Tout d’abord, il y a tous les paramètres physico-chimiques des nanoparticules, c’est-à-dire, leur taille, leur forme et leur fonctionnalisation de surface.

Des études ont été réalisées avec des nanoparticules polymériques de deux tailles différentes 24 *nm* et 43 *nm*. Dans le cas des cellules HELA et HUVEC, il a été démontré que les nanoparticules de 24 *nm* utilisaient les voies d’endocytose indépendante des clathrines et des cavéolines alors que les nanoparticules de 43 *nm* utilisaient la voie d’endocytose dépendante des clathrines [53]. Mironava & al ont montré que des nanoparticules d’or d’environ 45 *nm* s’internalisent en utilisant l’endocytose dépendante des clathrines alors que les nanoparticules d’or de plus petites taille, 13 *nm*, se font directement phagocytées [54].

Wang & al ont montré que la taille optimale des nanoparticules d’or pour avoir une grande quantité de nanoparticules internalisées dans des cellules de poumons et des cellules HELA était d’environ 45 *nm* [55]. En effet, plusieurs groupes de chercheurs sont d’accord pour estimer que la taille optimale d’internalisation cellulaire des nanoparticules d’or est d’environ 50 *nm* [55-57]. Ainsi, la taille de la nanoparticule peut fortement affecter l’efficacité d’internalisation cellulaire, mais aussi le mode d’endocytose emprunté, et par conséquent l’efficacité du traitement ou sa toxicité. En effet, Connor & al. ont montré que les nanoparticules d’or n’étaient pas toxiques pour des tailles de 4, 12 et 18 *nm* avec différentes chimie de surface dans le cas des cellules de leucémie et des cellules du système immunitaire [58]. Pan et al, quant à eux, montrent que la toxicité des nanoparticules d’or va dépendre de leur taille, puisque dans son étude, il utilise des nanoparticules de 1.2, 1.4 et 15 *nm*, sur quatre lignées cellulaires différentes (fibroblastes,

cellules épithéliales, macrophages et cellules de mélanome) et montre une toxicité pour les nanoparticules de 1.2 et 1.4 *nm* alors que celles de 15 *nm* ne montrent aucune toxicité. Il va plus loin, en montrant que les nanoparticules de 1.4 *nm* provoqueraient une mort cellulaire par nécrose alors que les nanoparticules de 1.2 *nm* provoqueraient une mort cellulaire par apoptose [59].

La forme des nanoparticules semble également influencer leur mode d'internalisation cellulaire. Une étude sur des cellules HELA a comparé des nanoparticules d'or de forme sphérique et en bâtonnet. Cette étude a montré une plus grande absorption des nanosphères par rapport aux nanobâtonnets. Cependant, la chimie de surface étant différentes, il est très difficile de dire si cette faible absorption des nanobâtonnets est due à la forme ou à la chimie de surface [57]. De plus, une autre étude effectuée sur des macrophages, montre que les nanotriangles d'or ont une meilleure absorption cellulaire par rapport aux nanobâtonnets et aux nanoétoiles. De plus, les voies empruntées par ces différentes formes ne seraient pas les mêmes. Les nanotriangles utiliseraient plutôt la voie d'endocytose dépendante des clathrines alors que les nanobâtonnets utiliseraient la voie d'endocytose dépendante des cavéoles. Enfin, la faible absorption des nanoétoiles viendrait du fait que la présence de plusieurs branches de différentes longueurs demanderait à la membrane une plus grande énergie de flexion [60]. Enfin, une étude a été réalisée sur des nanoparticules de 50 *nm* de formes différentes (sphériques et fleurs) sur des cellules endothéliales humaines. Cette étude montre une toxicité provenant directement de la forme puisque les nanofleurs présentent des effets néfastes sur ces cellules par rapport aux nanosphères de même taille [61]. Il est très difficile de trouver des travaux montrant une toxicité propre aux nanoparticules en fonction de leur forme car la chimie de surface de ces nanoparticules diffère souvent suivant la forme.

La fonctionnalisation de surface est un paramètre très important, car comme nous l'avons vu précédemment, elle permet de rendre les nanoparticules « furtives » et donc d'éviter la phagocytose qui est due au phénomène d'opsonisation par rapport aux nanoparticules « nues ». On pourrait penser qu'une chimie de surface cationique permet une meilleure endocytose, puisque la membrane plasmique présente à sa surface des charges négatives. Les nanoparticules cationiques se fixent ainsi plus facilement à sa surface et ceci se traduit par une endocytose plus rapide et plus importante que les nanoparticules anioniques. Cependant, plusieurs études, comme celle de Goodman et al montrent une toxicité plus élevée des nanoparticules d'or cationiques par rapport aux nanoparticules d'or anioniques. En effet, les nanoparticules cationiques semblent perturber la membrane plasmique via des interactions électrostatiques [62].

Il existe, bien sûr, d'autres paramètres pouvant influencer l'internalisation cellulaire et la toxicité des nanoparticules, tels que le degré d'agrégation des nanoparticules, mais aussi

la lignée cellulaire utilisée et les protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule lors de son acheminement.

En effet, il faut savoir que la nanoparticule d'or, avant d'interagir avec la cellule, va devoir interagir avec une multitude de biomolécules présentes dans les milieux biologiques. Par exemple, dans une application médicale, les nanoparticules d'or sont amenées à être injectées par voie intraveineuse et à interagir avec les protéines présentes dans le sang, qui sont très nombreuses (les plus abondantes dont : l'albumine, les globulines et le fibrinogène).

Il a été démontré que lorsque des nanoparticules sont dans un tel fluide, elles sont rapidement recouvertes d'une couronne protéique baptisée « protein corona » [63]. Cette adsorption se fait naturellement et quasi instantanément, puisque dès les premières secondes voire premières minutes, des protéines de haute mobilité s'adsorbent sur la surface des nanoparticules. En générale, ces protéines sont les plus abondantes et forment ce que l'on appelle la couronne douce. Au cours des heures suivantes, des protéines qui ont une plus faible mobilité, mais une très grande affinité avec la surface des particules viennent s'adsorber à leur tour, en remplaçant les protéines initiales, pour former la couronne dure. Ainsi, les nanoparticules sont constamment dans un flux de protéines qui s'adsorbent et se désorbent (effet Vroman). L'adsorption des protéines sur la surface des nanoparticules va se faire grâce à différents types d'interactions telles que les liaisons hydrogène, les interactions de Van der Waals ou encore les forces de solvations [64].

La structure et la composition de la couronne protéique vont dépendre des propriétés physico-chimiques de la nanoparticule (taille, forme, chimie de surface), de la nature du milieu biologique (sang, cytoplasme, liquide interstitiel), mais aussi de la durée d'exposition dans le milieu biologique. Ainsi, une fois formée, la couronne protéique modifie la taille et la chimie de surface de la nanoparticule, lui conférant une nouvelle identité biologique. On ne parle plus de nanoparticules synthétiques, mais plutôt de nanoparticules biologiques, et c'est sous cette forme que la nanoparticule va interagir avec les cellules. Ainsi, si les protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule interagissent avec des récepteurs de surface cellulaire, elles peuvent accélérer l'adsorption des nanoparticules dans les cellules et donc augmenter leur efficacité. A l'inverse les protéines adsorbées qui ont une faible interaction avec les biomolécules de la membrane plasmique diminueront l'adsorption des nanoparticules. L'identité biologique va donc déterminer la réponse physiologique (agglomération, internalisation cellulaire, durée de vie de circulation, cinétique, transport, accumulation et toxicité).

Au vu des données bibliographiques, il est donc important d'étudier d'une part les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et d'autre part d'étudier leurs interactions avec les protéines afin de comprendre leur devenir *in vitro* et *in vivo*.

1.3 Références bibliographiques

1. Horikoshi, S. and N. Serpone, Introduction to Nanoparticles, in *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. 2013. p. 1-24.
2. Daniel, M.-C. and D. Astruc, Gold Nanoparticles : Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2004. 104(1) : p. 293-346.
3. Thakor, A.S., et al., Gold nanoparticles : a revival in precious metal administration to patients. *Nano Lett*, 2011. 11(10) : p. 4029-36.
4. Kim, J.H., et al., Anti-glycation effect of gold nanoparticles on collagen. *Biol Pharm Bull*, 2012. 35(2) : p. 260-4.
5. Freestone, I., et al., The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, 2007. 40(4) : p. 270-277.
6. Boisselier, E. and D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine : preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*, 2009. 38(6) : p. 1759-82.
7. Mancini, D., C. Dupont-Logié, and P. Colomban, On-site identification of Sceaux porcelain and faience using a portable Raman instrument. *Ceramics International*, 2016. 42(13) : p. 14918-14927.
8. Michael, F., The Bakerian Lecture-Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* , 1857. 147 : p. 145-181.
9. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 1951. 11(0) : p. 55-75.
10. Zhao, P., N. Li, and D. Astruc, State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013. 257(3) : p. 638-665.
11. Brust, M., et al., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1994(7) : p. 801-802.
12. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Advanced Materials*, 2001. 13(18) : p. 1389-1393.
13. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001. 105(19) : p. 4065-4067.

14. Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials*, 2003. 15(10) : p. 1957-1962.
15. Sanghi, R., P. Verma, and S. Puri, Enzymatic Formation of Gold Nanoparticles Using *Phanerochaete Chrysosporium*. Vol. 01. 2011.
16. Morel, A.-L., et al., Green extraction of endemic plants to synthesize gold nanoparticles for theranostic applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2017. 1(3) : p. 158-171.
17. Pluchery, O. and M. Carrière, *Nanoparticules d'or*. *Techniques de l'ingénieur*, 2011.
18. Mie, G., Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Annalen der Physik*, 1908. 330 : p. 377-445.
19. Huang, X. and M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles : Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 2010. 1(1) : p. 13-28.
20. Jain, P.K., et al., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition : Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006. 110(14) : p. 7238-7248.
21. Link, S. and M.A. El-Sayed, Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999. 103(21) : p. 4212-4217.
22. Sun, Y. and Y. Xia, Increased Sensitivity of Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoshells Compared to That of Gold Solid Colloids in Response to Environmental Changes. *Analytical Chemistry*, 2002. 74(20) : p. 5297-5305.
23. Gans, R., Über die Form ultramikroskopischer Silberteilchen. *Annalen der Physik*, 1915. 47 : p. 270.
24. Tréguer-Delapierre, M., et al., Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Golden Bulletin*, 2008. 41 : p. 195-207.
25. Haruta, M., et al., Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 °C. *Chemistry Letters*, 1987. 16(2) : p. 405-408.
26. Bitton, O., et al., Multiple periodicity in a nanoparticle-based single-electron transistor. *Nature Communications*, 2017. 8 : p. 402.
27. Tokonami, S., et al., Green Electroless Plating Method Using Gold Nanoparticles for Conducting Microbeads : Application to Anisotropic Conductive Films. *Journal of The Electrochemical Society*, 2009. 156 : p. D558-D563.

28. Huaizhi, Z. and N. Yuantao, China's ancient gold drugs. *Gold Bulletin*, 2001. 34(1) : p. 24-29.
29. Rubbiani, R., B. Wahrig, and I. Ott, Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014. 19(6) : p. 961-965.
30. Edelman, E., et al., Gold-Coated NIR Stents in Porcine Coronary Arteries. Vol. 103. 2001. 429-34.
31. Abrahamsson, I. and G. Cardaropoli, Peri-implant hard and soft tissue integration to dental implants made of titanium and gold. *Clin Oral Implants Res*, 2007. 18(3) : p. 269-74.
32. Benedek, G.T., The History of Gold Therapy for Tuberculosis. Vol. 59. 2004. 50-89.
33. Bartley, O., et al., Scintigraphy and Angiography in Demonstration of Hepatic Tumours. *Acta Radiologica. Diagnosis*, 1969. 8(2) : p. 161-167.
34. Han, G., et al., Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. 45(19) : p. 3165-9.
35. Giljohann, D.A., et al., Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131(6) : p. 2072-2073.
36. Peer, D., et al., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*, 2007. 2(12) : p. 751-60.
37. Zhang, L., et al., Nanoparticles in Medicine : Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007. 83(5) : p. 761-769.
38. Moustaooui, H., et al., Tunable Design of Gold(III)-Doxorubicin Complex-PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Oncological Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016. 8(31) : p. 19946-19957.
39. Bhattacharya, R. and P. Mukherjee, Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(11) : p. 1289-306.
40. Barenholz, Y., Doxil® — The first FDA-approved nano-drug : Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 2012. 160(2) : p. 117-134.
41. Alphantery, E., et al., Cancer therapy using nanoformulated substances : scientific, regulatory and financial aspects. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015. 15(10) : p. 1233-55.
42. Oh, N. and J.-H. Park, Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Mediates Their Exocytosis in Macrophages. *ACS Nano*, 2014. 8(6) : p. 6232-6241.
43. Ferrari, M., Cancer nanotechnology : opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(3) : p. 161-71.

44. Danhier, F., O. Feron, and V. Préat, To exploit the tumor microenvironment : Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2010. 148(2) : p. 135-146.
45. Huang, X., et al., Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*, 2008. 23(3) : p. 217-28.
46. Sordillo, L.A., et al., Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. *J Biomed Opt*, 2014. 19(5) : p. 056004.
47. Bettaieb, A. and D.A. Averill-Bates, Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochem Cell Biol*, 2008. 86(6) : p. 521-38.
48. Link, S. and M.A. El-Sayed, Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 2000. 19(3) : p. 409-453.
49. Conner, S.D. and S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 2003. 422 : p. 37.
50. Kinchen, J.M. and K.S. Ravichandran, Phagosome maturation : going through the acid test. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2008. 9(10) : p. 781-795.
51. Sakhrani, N.M. and H. Padh, Organelle targeting : third level of drug targeting. *Drug Design, Development and Therapy*, 2013. 7 : p. 585-599.
52. Parkar, N.S., et al., Vesicle Formation and Endocytosis : Function, Machinery, Mechanisms, and Modeling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009. 11(6) : p. 1301-1312.
53. Lai, S.K., et al., Characterization of the Intracellular Dynamics of a Non-Degradative Pathway Accessed by Polymer Nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2008. 125(2) : p. 107-111.
54. Mironava, T., et al., Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery : effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 2010. 4(1) : p. 120-37.
55. Wang, S.-H., et al., Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology*, 2010. 8(1) : p. 33.
56. Malugin, A. and H. Ghandehari, Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells : a comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol*, 2010. 30(3) : p. 212-7.
57. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C.W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*, 2006. 6(4) : p. 662-668.

58. Connor, E.E., et al., Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small*, 2005. 1(3) : p. 325-327.
59. Pan, Y., et al., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 2007. 3(11) : p. 1941-9.
60. Xie, X., et al., The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Scientific Reports*, 2017. 7(1) : p. 3827.
61. Sadequa, S., et al., Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology*, 2015. 26(5) : p. 055101.
62. Goodman, C.M., et al., Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem*, 2004. 15(4) : p. 897-900.
63. Nguyen, V.H. and B.-J. Lee, Protein corona : a new approach for nanomedicine design. *International Journal of Nanomedicine*, 2017. 12 : p. 3137-3151.
64. Saptarshi, S.R., A. Duschl, and A.L. Lopata, Interaction of nanoparticles with proteins : relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 2013. 11 : p. 26-26.

Chapitre 2

Nouvelle génération de nanovecteurs synthétisés par complexation de l'or

Ce chapitre sera dédié au développement de nanovecteurs à base de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec la doxorubicine. L'utilisation de ce médicament anticancéreux permet diverses interactions avec l'or grâce à sa structure riche en groupements chimiques. La doxorubicine est une molécule composée d'un noyau tétracyclique appelé noyau aglycone et d'un sucre, la daunosamine (figure 2.1). Le noyau aglycone est composé d'une quinone sur le cycle B, d'une hydroquinone sur le cycle C, d'un groupement méthoxy sur le cycle A et pour finir le sucre est accroché par une liaison glycosidique au cycle D qui possède également un groupement hydroxyle et une chaîne latérale [1]. (Figure 2.1)

La doxorubicine est une molécule qui est à la fois amphiphile, puisque la partie anthraquinone de la molécule est lipophile alors que le sucre est hydrophile. Elle est également amphotère car elle possède une fonction basique au niveau du sucre représentée par le groupement amine et des fonctions acides au niveau des cycles phénoliques. Ceci permet à la molécule de se lier facilement aux protéines et aux membranes cellulaires [2].

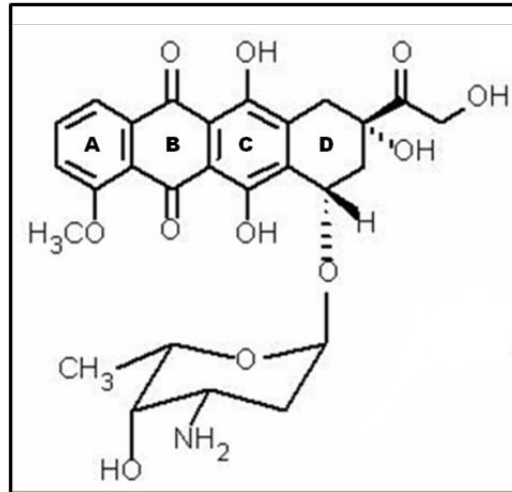


FIGURE 2.1 – Structure chimique de la doxorubicine.

La doxorubicine agit sur les cellules de différentes manières. Elle s'accumule principalement dans le noyau de la cellule du fait de sa forte affinité avec l'ADN [3]. En effet sa structure lui permet de s'intercaler entre les paires de bases azotées de l'ADN modifiant ainsi sa structure et pouvant donc provoquer la cassure de l'ADN. Cette modification de l'ADN inhibe la progression de l'activité de l'enzyme topoisomérase II qui est une enzyme jouant un rôle crucial lors de la transcription et de la réplication. Ainsi, l'arrêt de la topoisomérase II par l'action intercalante de la doxorubicine provoque l'arrêt du cycle cellulaire par activation de points de contrôle permettant la réparation de l'ADN. Si les dégradations sont trop conséquentes, ceci provoque l'apoptose cellulaire c'est à dire la mort cellulaire programmée [4, 5].

La doxorubicine est aussi capable de générer des radicaux libres qui sont transférés sur une molécule d'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde (O_2^-) qui sera lui-même oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Enfin, le H_2O_2 peut déclencher la création de radicaux très réactifs, les hydroxyles (OH) qui seront capables d'endommager l'ADN, les membranes cellulaires ou encore des protéines [1, 6].

Pour toutes ces raisons, la doxorubicine est un anticancéreux très efficace et couramment utilisé en chimiothérapie.

L'or, en tant que métaux noble, a une véritable importance dans le domaine biomédical. Il est utilisé pour ces propriétés physico-chimiques uniques (citées dans le chapitre précédent), mais aussi en raison de sa biocompatibilité.

Dans ce chapitre, nous allons étudier les propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'or ainsi que leur modification en fonction de la méthode de fonctionnalisation de la doxorubicine à leur surface.

Une première partie sera consacrée au greffage de la doxorubicine par couplage carbodiimide alors que la deuxième partie (sous forme d'article) sera consacrée aux nanoparticules d'or synthétisées par complexation avec la doxorubicine. Dans les deux cas, les nanoparticules seront caractérisées et leurs activités biologiques et médicales étudiées.

2.1 Nanovecteurs or/doxorubicine : greffage par couplage carbodiimide

La première stratégie consiste à synthétiser des nanoparticules d'or en utilisant le polyéthylène glycol di-carboxylique (PEG) comme stabilisant, puis d'y accrocher de manière covalente la doxorubicine et un anticorps, l'anti-Kv11.1. Ce dernier est un anticorps polyclonal spécifique des biomarqueurs de surfaces exprimés de manière aberrante à la surface des membranes des cellules de l'adénocarcinome canalaire pancréatique [7]. La doxorubicine permet le traitement de la tumeur alors que l'anti-Kv11.1 permet un ciblage actif des cellules cancéreuses.

2.1.1 Matériels et méthodes

a. Synthèse des nanoparticules d'or

Les colloïdes d'or stabilisés de PEG (AuPEGs) ont été préparés en se basant sur la méthode de Burst. 250 μL de PEG diacide ont été mélangés à 20 mL d'acide chloraurique de 1 mM , sous agitation magnétique pendant 10 minutes à température ambiante. Par la suite, 6 mL d'une solution de NaBH_4 de 0,01 M ont été ajoutées. La couleur de la solution passe instantanément du jaune au rouge lorsque le NaBH_4 est ajouté à la solution d'or en présence du PEG, confirmant la formation des colloïdes d'or. Les AuPEGs sont ensuite centrifugés et redispersés dans de l'eau ultra-pure afin de retirer le PEG en excès.

b. Greffage de la doxorubicine

La fonctionnalisation des AuPEGs par la doxorubicine a été réalisée de manière covalente en utilisant la chimie des carbodiimide, des fonctions acides carboxyliques présentent à la surface des nanoparticules d'or. Pour cela, un couple de réactifs a été utilisé, l'EDC/NHS. Ces réactifs vont permettre l'activation des fonctions carboxyliques des PEGs présents à la surface des nanoparticules en transformant la fonction acide en fonction ester. Les fonctions ester NHS présent à la surface des nanoparticules d'or vont ensuite pouvoir réagir avec les fonctions amines présentes dans la molécule de doxorubicine afin de former une liaison amide entre les AuPEGs et la doxorubicine. Ces nanoparticules seront désignées par AuPEGs_DOX par la suite.

20 μL d'une solution d'EDC/NHS (avec un rapport de 4:1) ont été ajoutés à 5 mL d'une solution d'AuPEGs pendant 2h, afin d'activer les groupements carboxyliques. Puis 1 mL de doxorubicine (0,1 mg/mL) a été ajouté et la solution est stockée à l'abri de la lumière pendant 2h. Les nanoparticules ont ensuite été centrifugées plusieurs fois afin de retirer la doxorubicine qui était en excès. Enfin, 50 μL d'anticorps anti-Kv11.1 (0,1 ng/mL) ont été ajoutés à la solution puis centrifugée. L'anticorps a été greffé à la surface des nanoparticules par formation de liaison amide entre le groupement COOH présent à la surface des nanoparticules et le groupement NH_2 présent dans l'anticorps. Cette solution sera appelé AuPEGs_DOX_ab par la suite.

Chaque étape de la synthèse du nanovecteur a été caractérisée par les techniques suivantes dont les principes sont expliqués en annexe :

1. **La spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible :** Les mesures ont été faites sur un spectrophotomètre UV-visible Uvikon 941 de Kontron instruments piloté par le logiciel Thermalys Uvikon 900. Les solutions ont été placées dans des cellules en copolymère acrylique (PMMA) de 1 cm de trajet optique. Les spectres d'absorption des nanoparticules d'or fonctionnalisées ou non ont été enregistrés dans la gamme spectrale allant de 350 nm à 900 nm .
2. **La microscopie électronique à transmission (MET) :** Les images MET ont été enregistrées avec un microscope JEOL JEM 1011 fonctionnant à une tension d'accélération de 100 kV . Les images MET ont été prises après centrifugation des différentes solutions à une vitesse de 14000 rpm pendant 20 min . Le surnageant a été éliminé et le culot a été redispersé dans de l'eau distillée. Enfin, 2 μl de cette solution redispersée ont été placés sur une grille de cuivre revêtue de carbone et ont été séchés à température ambiante.
3. **Le potentiel zêta :** Le potentiel de surface des nanoparticules dispersées dans l'eau a été déterminé grâce au Zetasizer NANOZS de Malvern Instruments.
4. **La spectroscopie Raman :** Les expériences ont été réalisées avec un spectromètre Xplora développé par Horiba Scientifics. Ce spectromètre utilise une source monochromatique qui est focalisée sur la solution par un objectif x4. Le signal Raman est collecté en configuration de rétrodiffusion et analysé par une caméra CCD qui donne un spectre par l'intermédiaire du logiciel LABSPEC. L'étude du nanovecteur a été réalisée en utilisant les paramètres suivants :
 - Laser : 785 nm
 - Puissance laser : 27 mW
 - Réseau : 600 traits/mm ou 1200 traits/mm correspondant aux résolutions spectrales respectives de 3 cm^{-1} et 1 cm^{-1} .

- Trou confocal : 300 μm
- Temps d'acquisition : 150 secondes répétées 2 fois

5. **L'analyse du suivi individuel des particules (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)** : Les diamètres hydrodynamiques moyens des nanoparticules synthétisées ont été caractérisés dans des milieux de dispersion complexes en utilisant l'analyse de suivi des nanoparticules développée par NanoSight (Malvern Instruments Ltd). Cet équipement utilise les propriétés de diffusion de la lumière et de mouvement brownien pour obtenir des distributions granulométriques d'échantillons en suspension liquide [8]. Les nanoparticules d'or ont été diluées dans du PBS et du sérum de veau fœtal (SVF) (ou Fœtal Bovin Serum FBS), ainsi que dans un milieu de culture cellulaire complet (Dulbecco's Milieu d'Eagle modifié (DMEM) complété avec 10% de FBS). Ce dernier a été inclus afin d'évaluer les interactions potentielles entre les nanoparticules d'or et l'environnement utilisé dans les études *in vitro*. Le NTA a été conduit à l'instant 0 (directement après dispersion dans le milieu complexe) et après 24 heures d'incubation à 37°C.[9]

L'efficacité et l'internalisation des différentes AuPEGs ont été expérimentées sur des cellules cancéreuses pancréatiques (PANC-1) selon les protocoles suivants :

1. **Culture cellulaire** : Les cellules PANC-1, une lignée cellulaire de carcinome pancréatique humain, ont été obtenues auprès de l'American Tissue Culture Collection (ATCC). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco, Bio-Sciences Ltd, Irlande) complété avec 10% de FBS (Sigma-Aldrich) dans une atmosphère humidifiée à 37°C et 5% de CO_2 . Les cellules ont étéensemencées à une densité de 8.10^4 cellules/ml (4.10^4 cellules/puits, 500 $\mu\text{L}/\text{puits}$) dans une plaque de 24 puits.
2. **Détermination de l'efficacité du nanovecteur** : Il s'agit ici de déterminer la concentration létale (CL50) qui est la concentration d'un produit qui induit une cytotoxicité et donc une mort cellulaire de 50% de la population initiale. Et également déterminer par la suite la concentration efficace (CE50) qui est la concentration à laquelle un médicament induit 50% de la mort cellulaire. Pour cela, les cellules PANC-1 ont été exposées à une série de solutions d'AuPEGs (incluant les AuPEGs, les AuPEGs_DOX et les AuPEGs_DOX_ab) dans des milieux complets (concentrations allant de 0 à 250 μM , 500 $\mu\text{L}/\text{puits}$) ou de doxorubicine (concentrations allant de 0 à 8 μM) pendant 24 heures dans des plaques de 24 puits. Des études de cellules non traitées (témoin négatif) et des cellules exposées à 70% d'acétone pendant 30 minutes (contrôle positif) ont également été incluses. Après 24 heures d'exposition aux différentes solutions, les cellules PANC-1 ont été lavées avec du PBS, détachées des puits en utilisant 200 $\mu\text{L}/\text{puits}$ de trypsine et transférées dans des tubes Eppendorf contenant 600 μL de milieu. Le comptage des cellules a en-

suite été effectué sur les suspensions cellulaires au moyen du cytomètre en flux BD Accuri® C6 (Becton Dickinson Biosciences, Oxford, Royaume-Uni), en maintenant constant le temps de comptage parmi les échantillons [9]. Les mesures pour chaque échantillon ont été effectuées trois fois et sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. Des courbes dose-réponse ont été ajustées à de telles données, en appliquant une équation dose-réponse pour l'inhibition (Prism, Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Puisque la fonction logarithmique de 0 est indéfinie, la concentration nulle (contrôle négatif) a été estimée à $10^{-8}M$ pour les AuPEGs et à $0,06 \mu M$ pour la doxorubicine, soit environ deux unités logarithmiques en dessous de la plus petite valeur. Des données de concentration létale demi-maximale (CL50) pour PEG-AuNPs et une concentration efficace mi-maximale (EC50) de doxorubicine ont été extrapolées à partir des courbes ainsi obtenues.

3. **Analyse du cycle cellulaire :** Il s'agit ici par marquage de l'ADN de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire se trouvent les cellules en présence des différentes AuPEGs_DOX. En effet pour comprendre comment les nanoparticules agissent au niveau de la cellule, il faut étudier le cycle cellulaire de la lignée cellulaire, ici les PANC-1. Le cycle cellulaire est une série d'événements qui constituent la vie d'une cellule. Ce mécanisme permet de reproduire une cellule mère en 2 cellules filles. C'est un phénomène très important puisqu'il va permettre le maintien de l'homéostasie tissulaire en renouvelant les cellules mortes. Dans le cas des cellules eucaryote, le cycle cellulaire est divisé en quatre parties : G1, S, G2 et M. La phase G1 est la plus longue. Elle permet la préparation de la cellule à la réplication, en contrôlant d'une part l'intégrité de l'ADN, mais aussi en synthétisant tout ce qui est nécessaire pour la réplication de l'ADN. La phase S correspond à la phase de réplication de l'ADN, la quantité d'ADN est doublée pour la mitose. La troisième phase, G2, est comme la phase G1, un point de contrôle, permettant le contrôle de l'intégrité de l'ADN et sa réparation en cas de défauts. C'est la phase qui prépare la cellule à la division cellulaire. Enfin, la phase M, qui correspond à la division cellulaire et qui aboutira à la fin de cette phase à l'obtention de deux cellules filles. Pour suivre le cycle cellulaire, les cellules PANC-1 cultivées dans des plaques de 24 puits ont été exposées à des solutions d'AuPEGs pendant 24 h à deux concentrations qui se sont révélées être sous-cytotoxiques (choisies grâce aux expériences de détermination de la CL50). Les concentrations choisies étaient : 13 et $19 \mu M$ pour AuPEGs; 25 et $40 nM$ pour AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab. Les cellules non traitées (témoin négatif) et les cellules exposées à la doxorubicine à $1,5 \mu M$ (témoin positif) ont également été incluses. Les effets possibles sur le cycle cellulaire provoqués par l'exposition à la doxorubicine greffée sur les AuPEGs_DOX et les AuPEGs_DOX_ab, ou par les AuPEGs seules, ont été évalués en utilisant le Kit

de réactifs BD CycletestTM Plus (Becton Dickinson Biosciences, Oxford, Royaume-Uni). Après 24 h d'exposition, les cellules ont été récoltées en utilisant de la trypsine (200 $\mu\text{L}/\text{puits}$), transférées dans des tubes Eppendorf contenant 600 μL de milieu et centrifugées à 4000 *rpm* pendant 5 minutes. Les surnageants ont été éliminés après centrifugation et 1 *ml* de tampon de lyse a été ajouté, suivi d'un vortexage de chaque échantillon (cette étape de lavage a été réalisée deux fois). Le test du cycle cellulaire a ensuite été effectué selon le protocole du fabricant. Les cellules colorées ont été analysées et quantifiées en utilisant un cytomètre en flux BD Accuri[®] C6 (Becton Dickinson Biosciences, Oxford, Royaume-Uni).[9]

Au vu des résultats de l'efficacité des AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab, une étude d'internalisation a été réalisée par localisation des AuPEGs au niveau des lysosomes par microscopie confocale et confirmé par l'étude de l'expression de la protéine LAMP-1 par western blot, dont les protocoles sont détaillés dans l'article [9].

2.1.2 Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'Université de Dublin (Trinity College-Hopital S. James (TCD)) sous la supervision du Pr. Adriele Prina Mello.

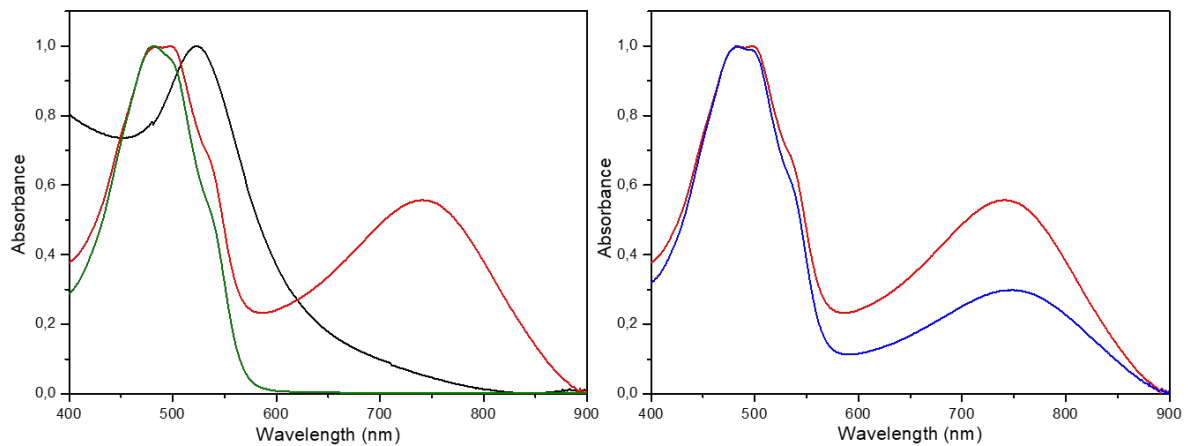


FIGURE 2.2 – Spectres d'absorption UV-Vis des nanovecteurs : AuPEGs (en noir), Doxorubicine (en vert), AuPEGs_DOX (en rouge) et AuPEGs_DOX_ab (en bleu).

La figure 2.2 montre la bande plasmon des nanoparticules d'or avant (AuPEGs) et après (AuPEGs_DOX) greffage de doxorubicines. Le spectre d'extinction des AuPEGs (Figure 2.2, trait noir) montre une bande LSP centrée à $\sim 520 \text{ nm}$, typique de nanoparticules d'or sphériques [10, 11]. Cela démontre que les nanoparticules d'or ont bien été formées suite à la réduction du AuCl_4^- . [10] De plus, la formation des AuPEGs a été confirmée par DLS et potentiel zêta. Un diamètre hydrodynamique de $19,4 \pm 4,3 \text{ nm}$ a été mesuré avec un potentiel négatif de $-13,8 \pm 2,0 \text{ mV}$. Ce potentiel négatif indique l'adsorption de

molécules PEG à la surface des nanoparticules d'or, et cette charge négative provient des groupements carboxyliques du PEG.

Le spectre d'extinction d'AuPEGs_DOX (Figure 2.2, trait rouge) présente une bande intense à 483 *nm* et deux petits pics à 470 et 533 *nm*, en bon accord avec les caractéristiques optiques de la bande d'absorbance de la doxorubicine (Figure 2.2, trait vert). De plus ce même spectre montre l'apparition d'une bande plasmon à 738 *nm*, conséquence de la modification de la taille des nanosphères d'or due au changement de leur environnement. En effet l'interaction de la doxorubicine avec les AuPEGs, s'accompagne d'une agrégation des AuPEGs, caractérisée d'une part par le changement de couleur de la solution qui passe d'une couleur rouge vin à une couleur violette, mais aussi comme il est indiqué sur la figure 2.2, d'un décalage vers le rouge du plasmon. De plus, le greffage de la doxorubicine à la surface des AuPEGs, provoque l'augmentation du diamètre hydrodynamique à 39 ± 5 *nm* et une charge de $-3,6 \pm 0,1$ *mV*. Ainsi, l'augmentation du potentiel zêta confirme bien l'accroche de la doxorubicine sur la surface des AuPEGs.

Enfin, après la conjugaison des AuPEGs_DOX à l'anticorps anti-Kv11.1 (AuPEGs_DOX_ab), le spectre présente une diminution de l'intensité et un léger décalage vers le rouge de la bande plasmon (d'environ 15 *nm*) puisqu'elle passe de 738 *nm* à 753 *nm* (Figure 2.2, trait bleu). Ce phénomène est attribué au changement de l'indice de réfraction à la surface des nanoparticules, indiquant que l'anti-Kv11.1-pAb a été conjugué avec succès à la surface des AuPEGs. Cette conjugaison induit l'augmentation du diamètre hydrodynamique passant de 39 à 70 ± 4 *nm*, mais aussi une augmentation du potentiel zêta à une valeur de 12 ± 3 *mV*.

Ainsi, on voit que chaque étape de fonctionnalisation modifie les propriétés optiques des nanoparticules d'or et influence non seulement la taille des nanoparticules, mais aussi la charge des nanoparticules d'or.

La morphologie des nanoparticules d'or ainsi que la présence d'agrégats a été suivi par microscopie électronique en transmission (Figure 2.3). La figure 2.3a montre les AuPEGs de formes sphériques bien dispersées de forme et de taille homogènes, avec un diamètre moyen de $5,4 \pm 0,8$ *nm*. Après le greffage de la doxorubicine, les AuPEGs_DOX, sont toujours de forme sphérique avec un diamètre moyen de $11,3 \pm 2,8$ *nm*, et l'apparition d'une légère agrégation. Cette agrégation peut être expliquée par le fait que lorsque la doxorubicine qui a été greffée sur les AuPEGs, a provoqué une modification de la surface des nanoparticules, ce qui a induit ce changement du potentiel surfacique des AuPEGs, qui se rapproche de 0 *mV*. Ce changement peut déstabiliser les AuPEGs en solution en diminuant les forces électrostatiques répulsives, ce qui entraîne une agrégation des AuPEGs due aux forces de Van der Waals entre les particules en solution [12].

Enfin, l'image des AuPEGs_DOX_ab (Figure 2.3c) montre la formation d'une grappe. Il est possible que cette formation de chaîne linéaire soit provoquée par des effets stériques et des forces électrostatiques entre l'anticorps et la surface des AuPEGs. Cependant, il convient de noter que cette formation en grappe, pourrait également être associée à des artefacts apparaissant pendant la préparation des échantillons.

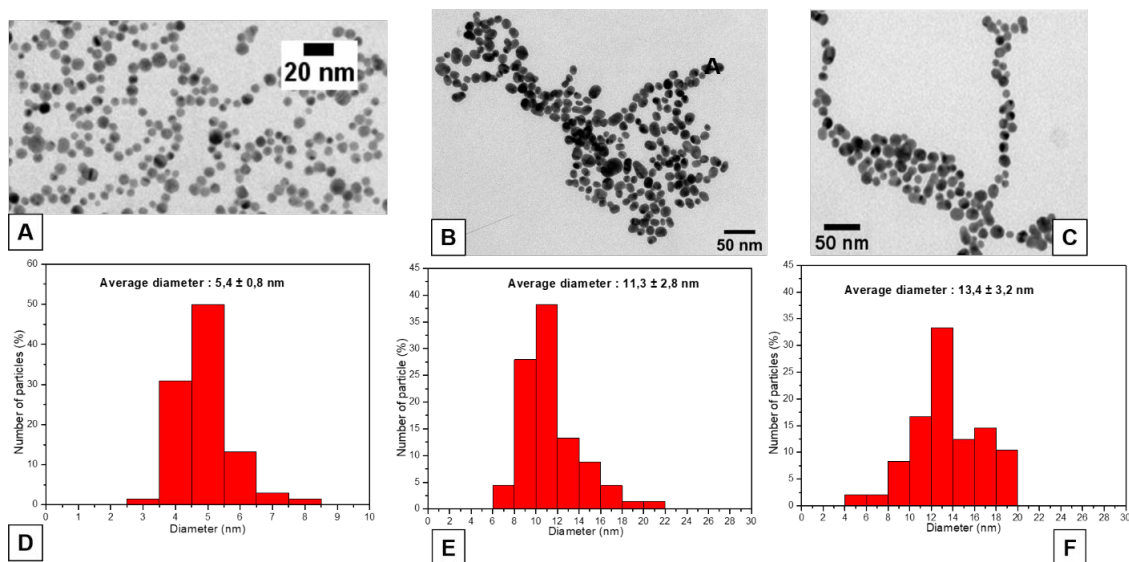


FIGURE 2.3 – Images MET de AuPEGs (A), AuPEGs_DOX (B), AuPEGs_DOX_ab (C) et la distribution de taille des AuPEGs (D), AuPEGs_DOX (E), AuPEGs_DOX_ab (F).

De plus, cette technique confirme la présence de PEG tout autour de la nanoparticule d'or comme présenté dans la figure 2.4. En effet, on observe une différence de contraste entre le métal (l'or) et le polymère, qui est due à la présence de PEG autour des nanoparticules métalliques. Son épaisseur est évaluée à plusieurs nanomètres et confirmée par XPS avec une épaisseur de 10 nm [9].

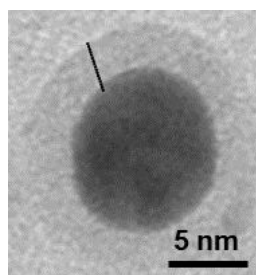


FIGURE 2.4 – Image MET des AuPEGs montrant un noyau métallique et une couche du polymère (PEG) organique de quelques nanomètres.

Le greffage de la doxorubicine a été suivi par spectroscopie Raman (figure 2.5), dont les spectres montrent d'une part la présence du polymère autour de la nanoparticule d'or puisque le spectre correspondant (spectre bleu Figure 2.5) présente les pics spécifique

du PEG. La large bande située à 849 cm^{-1} est assignée aux vibrations du squelette du PEG [13]. Les bandes qui apparaissent à 1070 et 1136 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation des groupements C-O et aux vibrations de rotation des groupements CH_2 [14]. Les vibrations de torsion des groupements CH_2 sont observées à 1246 et 1287 cm^{-1} [14]. La bande Raman située à 1368 cm^{-1} est due aux vibrations de balancement et de torsion des groupements CH_2 [14]. Enfin, le doublet à 1447 et 1473 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des groupements CH_2-CH_2 [14]. Après greffage de la doxorubicine (spectre rouge Figure 2.5), on voit la disparition de certaines bandes du PEG. Cependant, on retrouve en plus faible intensité certaines bandes du PEG, notamment à 849 , 1136 et 1287 cm^{-1} , ce qui permet de confirmer la présence du PEG autour des nanoparticules d'or. De plus, on voit l'apparition de nouvelles bandes correspondant à la doxorubicine pure (spectre noir Figure 2.5) dont les principales bandes Raman sont attribuées dans le tableau de la figure 2.5. Cependant, quelques différences sont à noter. Tout d'abord la bande située à 502 cm^{-1} , s'est déplacée à 505 cm^{-1} et à gagner en intensité. De plus la bande située à 1241 cm^{-1} , correspondant aux groupements situés au niveau du sucre, diminue en intensité. Enfin, la bande située à 1412 cm^{-1} tend à disparaître alors que celles situées à 1433 et 1460 cm^{-1} se transforment en une bande située à 1444 cm^{-1} . Toutes ces bandes correspondent principalement aux groupements situés au niveau du sucre. De plus la bande située à 1444 cm^{-1} correspondrait aux groupements d'une amine secondaire [15, 16]. Ainsi, la spectroscopie Raman nous montre que la doxorubicine est greffée à la surface de la nanoparticule d'or, mais aussi l'apparition de l'amine secondaire indique une liaison créée au niveau de ce groupement.

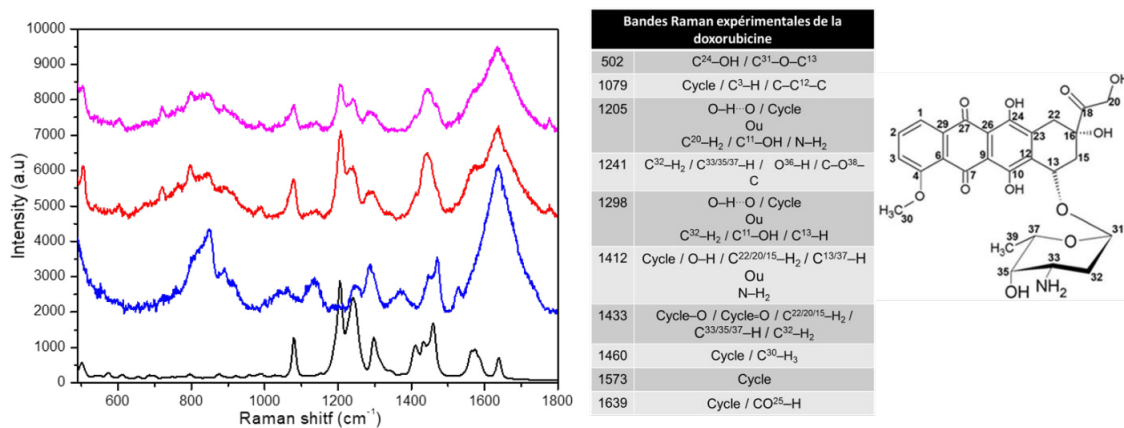


FIGURE 2.5 – Spectres Raman (à gauche) de la doxorubicine en poudre (en noir), d'AuPEGs (en bleu), d'AuPEGs_DOX (en rouge) et d'AuPEGs_DOX_ab (en rose). Tableau de valeurs des bandes Raman de la doxorubicine ainsi que leurs attributions [15] (à droite).

Pour le cas des AuPEGs_DOX_ab (spectre rose de la figure 2.5), aucun changement significatif n'a été détecté, hormis une diminution des bandes de vibrations correspondant à la doxorubicine qui pourrait indiquer un changement d'orientation de la doxorubicine

suite à l'accrochage de l'anticorps.

Une fois la caractérisation physique des nanoparticules réalisée, nous avons étudié l'interaction des nanoparticules d'or avec les milieux biologiques. C'est pourquoi, les différentes nanoparticules synthétisées ont été par la suite caractérisées par NTA, dans différents milieux biologiques, allant d'une solution tampon simple, le PBS, à des milieux plus complexes, le SVF et le DMEM complété par 10% de SVF. Le tableau 2.1 résume les résultats obtenus où l'on peut voir une augmentation du diamètre hydrodynamique des AuPEGs avec l'ajout de fonctionnalités sur la surface des AuPEGs (à l'exception des AuPEGs dispersées dans le FBS). En d'autres termes, le diamètre hydrodynamique augmente lorsque l'on passe des AuPEGs non fonctionnalisées au AuPEG_DOX_ab, chargées en doxorubicine et en anticorps au temps 0h.

Cette tendance n'a pas été observée dans le FBS, probablement car ce milieu est riche en protéines. Ainsi, on suppose que les protéines présentes dans le FBS s'adsorbent et se dissocient de façon aléatoire à la surface des AuPEGs, afin de former une couronne protéique autour des nanoparticules, ce qui induit une discordance sur les tailles des nanoparticules.

De manière générale, aucune agrégation significative n'a été mise en évidence au cours du temps, sauf pour le cas des AuPEGs incubées dans du PBS, où l'on voit une augmentation du diamètre hydrodynamique due à l'apparition d'agrégats de AuPEGs du fait de la présence de sel en forte concentration.

Il est à noter, tout de même, que les suspensions des différentes AuPEGs, dans le milieu cellulaire complet, se sont révélées être les plus stables dans le temps.

PBS		
Sample	t = 0 h (nm)	t = 24 h (nm)
AuPEGs	81 ± 10	127 ± 8
AuPEGs_DOX	130 ± 5	139 ± 4
AuPEGs_DOX_ab	133 ± 3	97 ± 1
FBS		
Sample	t = 0 h (nm)	t = 24 h (nm)
AuPEGs	132 ± 3	123 ± 4
AuPEGs_DOX	112 ± 3	103 ± 6
AuPEGs_DOX_ab	113 ± 4	99 ± 11
DMEM supplemented with 10% FBS		
Sample	t = 0 h (nm)	t = 24 h (nm)
AuPEGs	89 ± 6	97 ± 7
AuPEGs_DOX	92 ± 4	90 ± 4
AuPEGs_DOX_ab	107 ± 7	99 ± 6

TABLE 2.1 – Diamètres hydrodynamiques moyens des nanoparticules dispersées dans du PBS, du FBS et du milieu complet (du DMEM complété avec 10% de FBS) avant et après incubation à 37°C pendant 24h, déterminés par NTA.

Afin d'évaluer l'efficacité cytotoxique des différentes nanoparticules, un test de viabilité cellulaire a été réalisé sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome pancréatique PANC-1. Pour cela, la cytométrie en flux a été utilisée pour évaluer les variations en pourcentage de cellules vivantes après 24h de traitement avec diverses concentrations en AuPEGs (allant de 0 à 250 μM).

Les courbes dose-réponse obtenues (Figure 2.6) montrent que les valeurs de concentration létale à 50%, CL50 (Figure 2.6), c'est-à-dire la concentration létale qui provoque 50% de mortalité cellulaire, diminue lorsque les AuPEGs sont chargées en doxorubicine, puisque l'on passe d'une CL50 de $100 \pm 4 \mu\text{M}$ pour le cas des AuPEGs à une CL50 de $130 \pm 27 \text{ nM}$ pour les AuPEGs_DOX. Cette diminution a été accentuée lorsque les AuPEGs_DOX sont couvertes d'anticorps anti-Kv11-1 (CL50 = $84 \pm 20 \text{ nM}$). Il convient de noter que la différence de la CL50 entre AuPEGs et AuPEGs_DOX (de même pour AuPEGs_DOX_ab) est très importante, de l'ordre de trois ordres de grandeur (Figure 2.6).

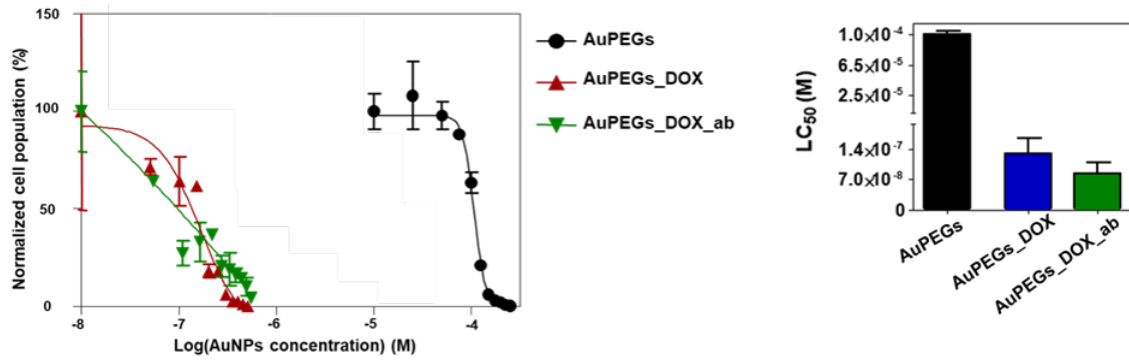


FIGURE 2.6 – Pourcentage de cellules vivantes quantifiées par cytométrie en flux après expositions des PANC-1 aux différentes AuPEGs pour des concentrations allant de 0 à 250 μ M pendant 24h (à gauche). Ces courbes dose-réponse ont été extrapolées afin de déterminées les valeurs des CL50 reportées en histogramme (à droite). Les valeurs de CL50 sont rapportées avec une intervalle de confiance moyen de \pm 95%.

Sur la base des résultats obtenus en spectroscopie UV-Vis, il a été estimé que 10 μ g de doxorubicine ont été chargés sur 5.10^{-8} mole d'AuPEGs_DOX et d'AuPEGs_DOX_ab. En extrapolant la quantité de doxorubicine présents dans AuPEGs_DOX et AuPEG_DOX_ab à leur CL50, on estime que la concentration efficace médiane (CE50) pour la doxorubicine délivrée par AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab est égale à 45 nM et 29 nM respectivement. La CE50 de la doxorubicine seule a été déterminée (Figure 2.7) à $1,4 \pm 0,7$ μ M. En comparant ces 3 concentrations (Figure 2.7), on constate que les AuPEGs_DOX augmentent l'effet chimiothérapeutique de la doxorubicine contre les cellules cancéreuses pancréatiques de plus de 30 fois alors que les AuPEGs_DOX_ab l'augmentent de 48 fois.

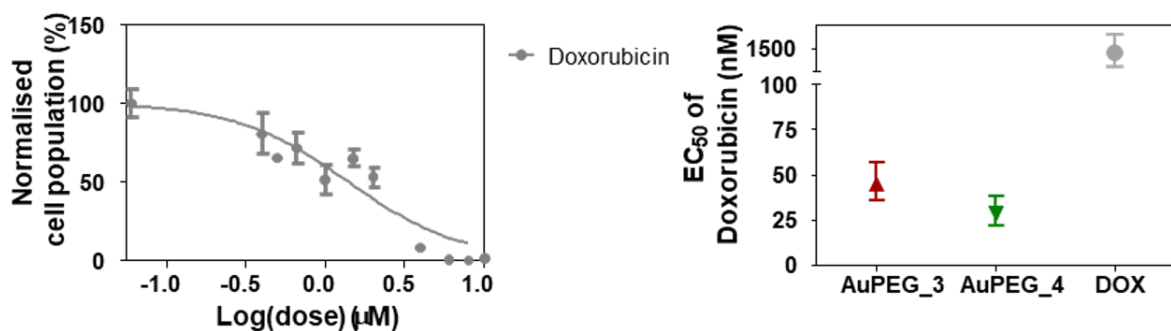


FIGURE 2.7 – Pourcentage de cellules vivantes quantifiées par cytométrie en flux après expositions des PANC-1 à différentes concentrations de doxorubicine allant de 0 à 8 μ M pendant 24h (à gauche) Cette courbe dose-réponse a été extrapolée afin de déterminées la valeur de la CE50 de la DOX et comparée à la valeur de la CE50 de la doxorubicine chargée sur AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab (à droite). Les valeurs de CE50 sont rapportées avec une intervalle de confiance moyen de \pm 95%.

Une autre méthode a été utilisée pour évaluer l'activité *in vitro* de la doxorubicine avec

les cellules PANC-1, lorsqu'elle était délivrée grâce aux AuPEGs (Figure 2.8). Il s'agit ici d'observer les effets sur le cycle cellulaire induits suite à l'exposition à la doxorubicine seule aux AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab. En effet, la doxorubicine qui interagit avec l'ADN va provoquer un arrêt du cycle cellulaire en G2/M [17].

Ainsi, l'exposition des cellules à AuPEGs_DOX montre d'une part une diminution de la phase G0/G1, qui est due au déplacement de la population cellulaire à la phase G2/M. Ces résultats démontrent que la mort cellulaire déclenchée par AuPEGs_DOX est liée à l'activité de la doxorubicine. L'exposition des cellules aux AuPEGs_DOX_ab a provoqué en plus une légère augmentation du nombre de cellules entrant en phase G2/M. Ces résultats ont été comparés avec ceux d'AuPEGs, qui n'ont montré aucun changement significatif par rapport aux cellules non traitées.

Ainsi, AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab montre non seulement une augmentation de l'efficacité cytotoxique sur les cellules PANC-1, mais aussi que cet effet toxique provient du fait qu'en présence de ces nanoparticules, les cellules sont moins nombreux en phase G0/G1, ce qui n'est pas le cas pour les AuPEGs sans doxorubicine.

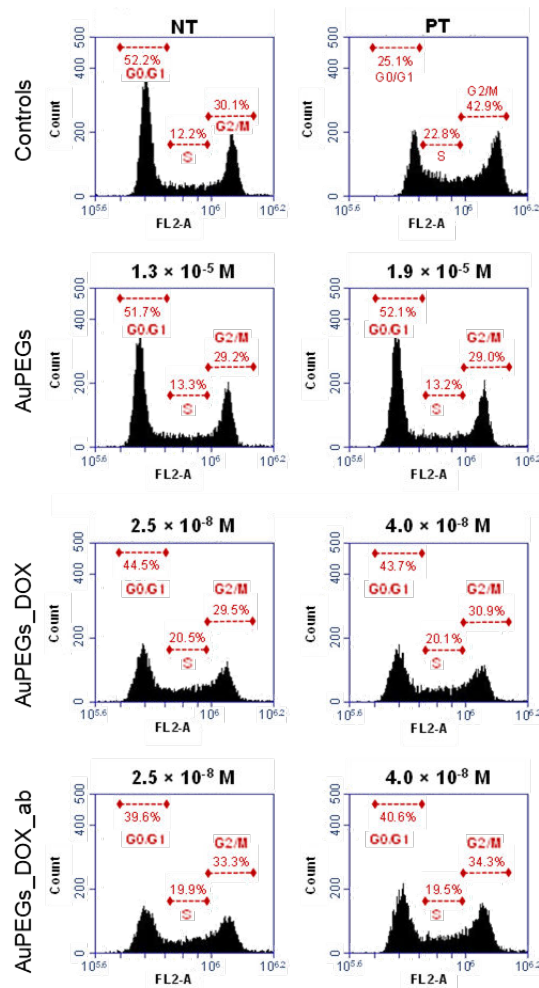


FIGURE 2.8 – Histogramme représentant la FL2-A montrant les effets d’AuPEGs, AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab sur le cycle cellulaire des cellules PANC-1 après 24h d’exposition. Des histogrammes représentant la FL2-A des cellules non traitées (contrôle négatif, NT) et des cellules traitées à la doxorubicine avec une concentration de $1,5 \mu\text{M}$ (témoin positif, PT), sont également présentés.

La microscopie confocale à balayage laser a été utilisée comme technique qualitative pour étudier l’internalisation de AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab dans les cellules PANC-1 et la libération de la doxorubicine dans la cellule. Après 24h d’incubation, les 2 nanovecteurs ont été détectés au sein des cellules (Figure 2.9). En effet, de nombreux AuPEGs ont été co-localisés avec l’expression de la protéine LAMP-1 glycosylée. Cette protéine est présente au niveau des membranes du lysosome [18]. C’est pourquoi, cette protéine a été utilisée ici comme marqueur pour identifier les lysosomes [19].

En effet, la figure 2.9 montre une co-localisation des AuPEGs et des lysosomes, cependant tous les AuPEGs n’ont pas été trouvés dans les lysosomes. De plus, on peut voir la présence de molécules de doxorubicine au sein de la cellule qui pourrait être due à leur libération par les AuPEGs. Cependant, la fluorescence provenant des molécules de doxorubicine (non détectable dans les cellules non traitées), semble être dispersée non

seulement dans le cytoplasme, mais également au niveau des noyaux des cellules.

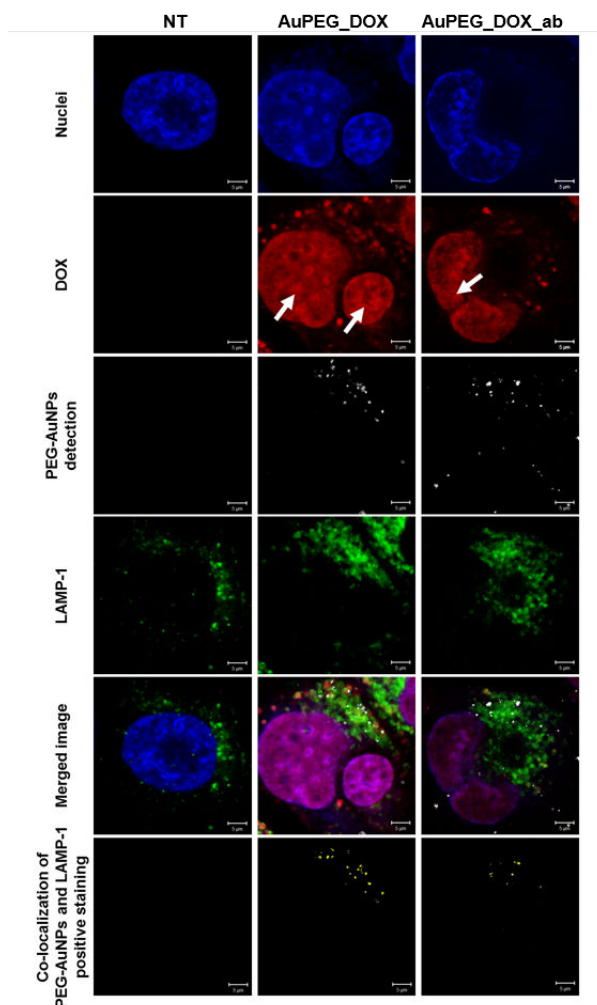


FIGURE 2.9 – Images de microscopie confocale à balayage laser de cellules PANC-1 exposées aux AuPEGs_DOX ou AuPEGs_DOX_ab pendant 24h. Un témoin négatif (NT) constitué de cellules non traitées a été inclus. Les cellules ont été colorées pour les noyaux (en bleu) et pour l’expression de la LAMP-1 glycosylée (en vert). Les nanoparticules ont été imagées en mode réflectance et représentées en blanc sur l’image. La fluorescence de la doxorubicine a également été détectée (en rouge). Les images masquées démontrent une co-localisation des nanoparticules avec l’expression de la LAMP-1 (en jaune). Barres d’échelle : 5 μm

Afin de confirmer la présence des AuPEGs au sein des lysosomes, les cellules PANC-1 ont été traitées avec des AuPEGs_DOX et des AuPEGs_DOX_ab pendant 24h puis lysées. Les lysats cellulaires ont été séparés par électrophorèse puis sondés avec l’anticorps LAMP-1 (Figure 2.10). Deux bandes de protéines ont été détectées, l’une correspondant au LAMP-1 glycosylé et l’autre au LAMP-1 non glycosylé. Ces deux bandes ont aussi été détectées dans les lysats cellulaires des cellules non traitées. Cependant, une diminution significative de l’expression de la protéine LAMP-1 non glycosylée a été observée dans les cellules traitées par AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab. La glycosylation de la

LAMP-1 permet la protection de la protéine et donc de la membrane lysosomale lors de la protéolyse intracellulaire [20].

Ainsi, cette diminution de LAMP-1 non glycosylé peut être associée à une augmentation de la fonction lysosomale dans les cellules PANC-1 après exposition aux deux nanovecteurs.

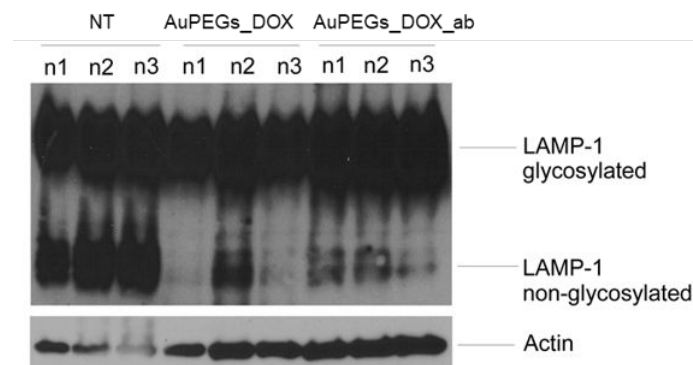


FIGURE 2.10 – Analyse de l’expression de LAMP-1 glycosylé et non glycosylé et de la protéine actine dans des lysats cellulaires de cellules PANC-1 non traitées (NT) ou exposées à AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab pendant 24h par western blot.

Du point de vue thérapeutique, l’internalisation des nanovecteurs (AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab) dans les cellules cancéreuses est très importante pour que le médicament exerce efficacement son activité thérapeutique. Les données de microscopie confocale (Figure 2.9) ont démontré non seulement que les nanovecteurs ont bien été internalisés dans les cellules PANC-1, mais également que les AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab ont bien été transloqués dans les lysosomes. De plus, la détection et la quantification des protéines LAMP-1 par Western Blot (Figure 2.10) ont démontré que l’exposition aux AuPEGs chargés de doxorubicine s’accompagnait de changements dans les taux de glycosylation de LAMP-1, connus pour protéger la protéine elle-même et les membranes lysosomales de la protéolyse intracellulaire [20]. De tels changements pourraient donc être associés à une augmentation de la fonction lysosomale dans les cellules PANC-1 après exposition aux AuPEGs_DOX et AuPEGs_DOX_ab.

Cette étude, nous montre que les AuPEGs synthétisés pouvaient être utilisés en tant que nanoplateforme pour fournir une dose efficace de doxorubicine au sein de la cellule, via une stratégie de ciblage active, puisque chargées de doxorubicine, les AuPEGs présentent un meilleur effet thérapeutique que la doxorubicine libre.

2.2 Nanovecteurs or/doxorubicine : greffage par complexation Au(III)-DOX

Il s'agit ici d'une autre manière de développer un nanovecteur, puisqu'une étape de complexation entre le métal et le médicament est créée avant de réduire le métal en nanoparticule puis une couche de polymère va venir protéger non seulement le métal, mais aussi la doxorubicine, ce qui n'était pas le cas précédemment.

La complexation métal-médicament est exploitée depuis longtemps notamment avec des métaux tels que le platine [21, 22], le titane [22], le ruthénium [21, 22], le cuivre [21] ou encore l'or [21-23]. Le développement de complexe utilisant de l'or, en tant qu'agent anticancéreux suscite un intérêt considérable, cependant en raison de leur stabilité cinétique médiocre dans des conditions physiologique, leur utilisation reste problématique [24]. Cette méthode a été utilisée pour le développement de nanovecteurs car elle présente de nombreux avantages tels que la libération contrôlée de l'agent thérapeutique par des stimuli extérieurs (plus particulièrement le pH du milieu). Ce qui n'est pas le cas des nanovecteurs chargés en médicament par adsorption électrostatique, qui en général permettent une libération massive et non contrôlée. Les nanoparticules sont beaucoup plus stables car elles sont formées après complexation avec l'or. Enfin, c'est une méthode en une étape et très rapide puisqu'elle se fait en quelques minutes. Cette synthèse par complexation a permis le développement d'autres nanovecteurs à base de complexe d'or et d'autres médicaments, notamment de docétaxel et de paclitaxel, dont les résultats ont conduit à une publication qui est placée en annexe.

2.2.1 Synthèse et caractérisations du nanovecteur

Il s'agit donc dans cette partie d'étudier de la même manière que précédemment le nanovecteur, appelé DOX IN par la suite, c'est-à-dire proposer sa caractérisation physico-chimique et évaluer sa cytotoxicité dans les cellules cancéreuses du pancréas (PANC-1).

Publication : Tunable Design of Gold(III)-Doxorubicin Complex-PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Oncological Applications.

Tunable Design of Gold(III)–Doxorubicin Complex–PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Oncological Applications

Hanane Moustaoi,^{†,¶} Dania Movia,^{§,¶} Nathalie Dupont,[†] Nadia Bouchemal,[†] Sandra Casale,[‡] Nadia Djaker,[†] Philippe Savarin,[†] Adriele Prina-Mello,^{§,||} Marc Lamy de la Chapelle,[†] and Jolanda Spadavecchia^{*,†}

[†]CNRS, UMR 7244, CSPBAT, Laboratoire de Chimie, Structures et Propriétés de Biomateriaux et d'Agents Therapeutiques Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 93000 Bobigny, France

[‡]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris VI, Laboratoire de Réactivité de Surface, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

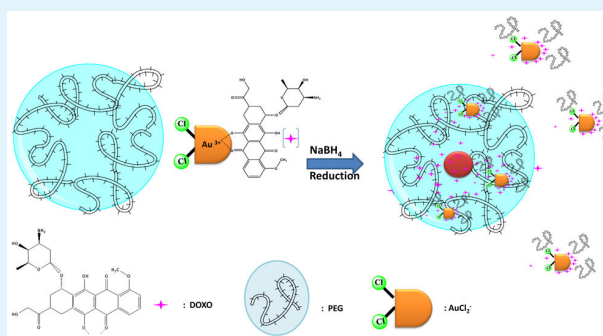
[§]Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

^{||}AMBER Centre, CRANN Institute, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

Supporting Information

ABSTRACT: To date, the translation of Au (III) complexes into chemotherapeutic agents has been hindered by their low stability under physiological conditions, a crucial parameter in drug development. In this study, we report an innovative four-step synthesis of a stable Au (III)–doxorubicin (DOX) complex, acting as a key constitutive component of doxorubicin-loaded PEG-coated nanoparticles (DOX IN–PEG–AuNPs). For therapeutic purposes, such AuNPs were then functionalized with the anti-K_v11.1 polyclonal antibody (pAb), which specifically recognizes the hERG1 channel that is overexpressed on the membrane of human pancreatic cancer cells. The nature of the interactions between DOX and Au (III) ions was probed by various analytical techniques (Raman spectroscopy, UV–vis, and ¹H NMR), which enabled studying the Au (III)–DOX interactions during AuNPs formation. The theoretical characterization of the vibrational bands and the electronic transitions of the Au (III)–DOX complex calculated through computational studies showed significant qualitative agreement with the experimental observations on AuNPs samples. Stability in physiological conditions and efficient drug loading (up to to 85 w/w %) were achieved, while drug release was strongly dependent on the structure of DOX IN–PEG–AuNPs and on the pH. Furthermore, the interactions among DOX, PEG, and Au (III) ions in DOX IN–PEG–AuNPs differed significantly from those found in polymer-modified AuNPs loaded with DOX by covalent linkage, referred to as DOX ON–PEG–AuNPs. *In vitro* experiments indeed demonstrated that such differences strongly influenced the therapeutic potential of AuNPs in pancreatic cancer treatment, with a significant increase of the DOX therapeutic index when complexed to Au (III) ions. Collectively, our study demonstrated that Au (III)–DOX complexes as building blocks of PEGylated AuNPs constitutes a promising approach to transform promising Au (III) complexes into real chemotherapeutic drugs for the treatment of pancreatic cancer.

KEYWORDS: AuNPs, Raman spectroscopy, ¹H NMR, DFT, gold–doxorubicin complex, PDAC



INTRODUCTION

In the last 5 decades, metal complexes and organometallic compounds have been gaining growing importance in cancer therapy.^{1,2} Based on their similarity to cisplatin and cisplatin-antitumor drugs,³ Au (III) species represent a promising class of potential anticancer agents. Most of these complexes include Au–N bonds (Au–O and Au–Cl bonds), even though examples of species containing Au–S or Au–C bonds have been described.¹ Although Au (III) complexes⁴ exhibit major cytotoxic effects when compared to cisplatin,^{5,6} Au (III) complexes do not find real clinical applications due to their instability in biological fluids.

In light of this limitation, the aim of this study was to produce a biologically stable Au (III)–doxorubicin complex for oncological applications. Doxorubicin hydrochloride (DOX) (Scheme S1 in the Supporting Information) is one of the drugs commonly used for cancer treatment.⁷ In cancer nanomedicine, DOX conjugation or mixing with polymers has been used to reduce its side effects and improve the solubility and bioavailability of this hydrophobic drug.^{8,9} Nevertheless, the full exploitation of DOX in translational nanomedicine

Received: June 16, 2016

Accepted: July 18, 2016

Published: July 18, 2016

development can be achieved solely if the current knowledge on the conformational variation of such molecule in different environments is considered. Such variations, which determine key changes in DOX physicochemical properties such as resonance frequency and absorption profiles, highly influence the drug release from nanotherapeutics.^{10–13}

Some of the authors have recently reported the *in vitro* proof-of-concept study of a one-step synthesis of polymer-modified AuNPs loaded with DOX by covalent linkage,^{11,14} here referred to as DOX ON–PEG–AuNPs. In the present work, we describe a novel synthesis, in which DOX is chelated with Au (III) ions from tetrachloroauric acid (HAuCl₄) to form PEGylated AuNPs (AuNPs) (DOX IN–PEG–AuNPs). We demonstrate that the DOX–Au (III) complex interacts with dicarboxylic PEG molecules, while the complex plays a key role as intermediary between the drug molecules and the nanoparticle surface after reduction. Because the DOX–Au^{III} complex dissociates under acidic conditions, this modulates the drug release from DOX IN–PEG–AuNPs in a pH-dependent manner. Thus, drug release is expected to be higher in more acidic tissues (such as the tumor environment) than in the blood and/or healthy tissues.^{15,16} A comparative study between DOX IN–PEG–AuNPs and DOX ON–PEG–AuNPs was carried out to understand the mechanism of interaction between DOX, PEG, and Au (III) ions during the synthetic process and the consequent biological activity of the AuNPs formed. Spectroscopic characterization was performed, including absorption spectroscopy, Raman spectroscopy, and ¹H NMR. It is established that the ring of DOX interacts with different molecules.¹⁷ Nevertheless, few research studies have been published on the characterization of DOX complexes by Raman spectroscopy. Similarly, this technique has not been fully exploited to observe the reactivity of the DOX with the polymeric chains of nanovectors or to characterize the behavior of gold complexes overtime.^{18–20} In our work, Raman spectroscopy and ¹H NMR analysis of DOX molecules were performed before and after complexation and incorporation into PEGylated AuNPs, in order to identify drug orientation changes. Raman vibrational frequencies and spectra of optimized structures of molecular DOX and of the dichloro–DOX–Au (III) complex in water (DOX–AuCl₂) were simulated by density functional theory (DFT). Simulation of UV absorption spectra, based upon electronic transitions, was also carried out with time-dependent density functional theory (TD-DFT) method at the same level of theory, to support the spectral shifts observed experimentally. In parallel, our experiments in an *in vitro* model of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) demonstrated that the DOX therapeutic efficiency was positively influenced by complexation into a PEGylated nanometre-sized delivery system, as compared to molecular DOX and to DOX ON–PEG–AuNPs. Active targeting of cancer cells was also possible by exploiting a strategy previously described by the authors.¹¹ The data presented herein can positively impact the application of gold complexes for the clinical treatment of PDAC, which is characterized by an extremely short overall survival of the patients.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All chemical materials were acquired from Sigma-Aldrich (Sain-Quentin Fallavier, France).

Synthesis of DOX IN–PEG–AuNPs. Synthesis of DOX IN–PEG–AuNPs colloids included three main steps, here

indicated as S1, S2, and S3 (Scheme 1). Twenty milliliters of HAuCl₄ solution (2.5×10^{-4} M) was mixed to DOX (5 mL, 1.72×10^{-4} M in water) and aged for 10 min (S1). After 10 min, 250 μ L of dicarboxylic PEG was added¹¹ (S2). Finally, 6 mL of aqueous 0.01 M NaBH₄ was added at once (S3). Products of each synthetic step were characterized by UV–vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), ¹H NMR and Raman spectroscopy. The “as-prepared” DOX IN–PEG–AuNPs solution was purified as described previously.¹¹

Anti-Kv11.1-pAb Immobilization onto DOX IN–PEG–AuNPs. The binding of anti-Kv11.1-pAb onto DOX IN–PEG–AuNPs surface was performed as previously described.¹¹

Synthesis of DOX ON–PEG–AuNPs and Anti-Kv11.1 Grafting onto Their Surface. Synthetic procedures were carried out as previously described.¹¹

Physicochemical Characterization. All the measurements were carried out as previously described.¹¹

UV–vis Absorption Spectroscopy. All experiments were performed as previously described¹¹ in water at AuNPs concentration equal to 10^{-4} M. For stability studies, DOX IN–PEG–AuNPs were dispersed in PBS (0.1 M; pH 4.0 or pH 7.0), and absorption spectra collected over 3 months.

Transmission Electron Microscopy (TEM). All microscopy analysis were carried out as previously described.¹¹

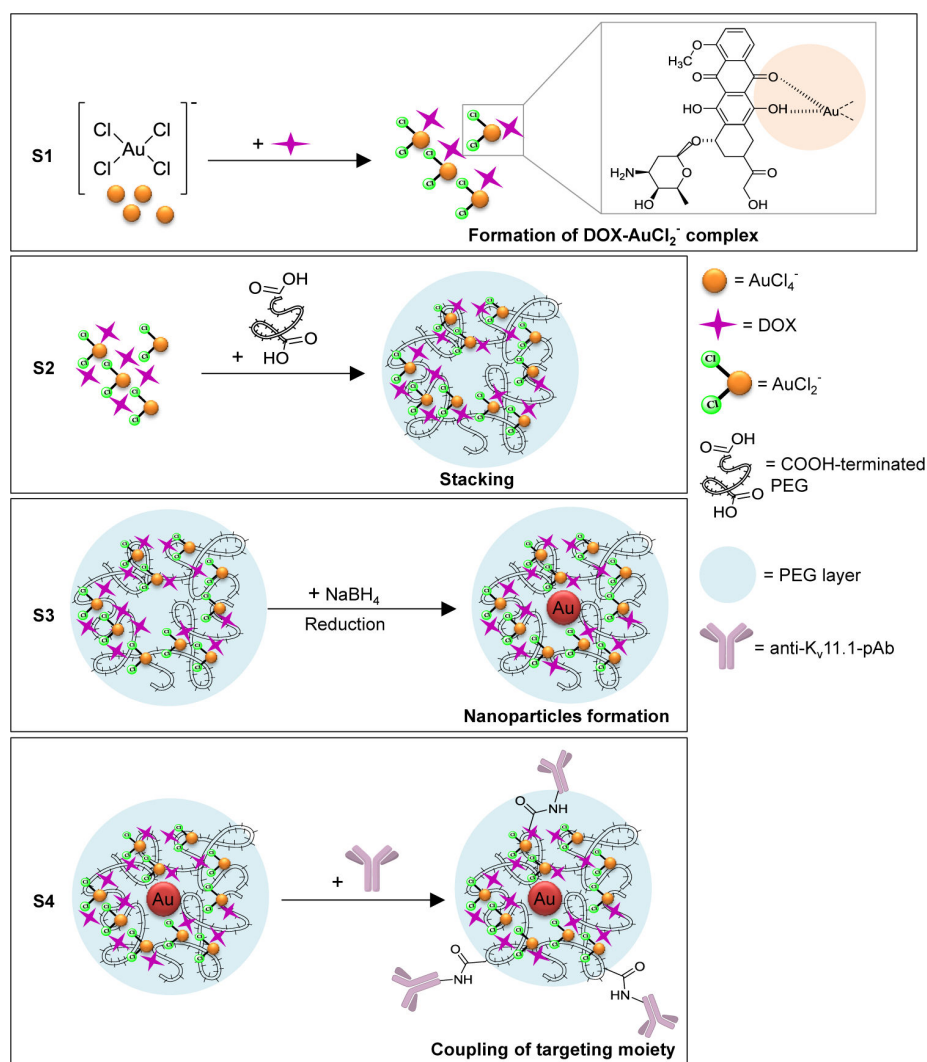
Raman Spectroscopy. The Raman experiments have been performed on an Xplora spectrometer (Horiba Scientific-France). The Raman spectra have been recorded using an excitation wavelength of 785 nm (diode laser) at room temperature. For measurements in solution, a macro-objective with a focal length of 40 mm (NA = 0.18) was used in backscattering configuration. The achieved spectral resolution is close to 2 cm^{-1} .

Polarization Modulation-Infrared Reflection-Adsorption Spectroscopy (PM-IRRAS). All spectra were acquired by a Thermo Nexus spectrometer (Les Ulis, France).¹¹

¹H NMR. Experiments were conducted on a AVANCE III spectrometer (Bruker) operating at 500 MHz with a 5 mm gradient indirect detection probe, at a probe temperature of 300 K. 64 scans were acquired to generate 1D proton spectra of DOX (5 mM), dicarboxylic PEG (1 mM), and S1/S2 products (1 mM), whereas 2048 scans were acquired for DOX IN–PEG–AuNPs (1 mM) and DOX ON–PEG–AuNPs (1 mM). The data acquisition size was 32 K and the spectral width was 5000 Hz. Typical 9.5 μ s pulse length and relaxation delay of 2 s were used. Water signal was suppressed by applying a secondary irradiation field at the water resonance frequency (presaturation sequence). For each sample, 500 μ L aliquots were directly mixed with 100 μ L of deuterium oxide (D₂O) 99.96% (Eurisotop) providing an internal field-frequency lock. Samples were placed in 5 mm diameter tubes for ¹H NMR analysis. For ¹H resonance assignment, COSY spectra were acquired for DOX with 4 K data points and 32 transients for each of the 128 increments. Moreover, 2D NMR HSQC experiments were used for ¹³C resonance assignment. Chemical shifts (δ , in ppm) were compared to the NMR solvent signal D₂O (4.73 ppm at 300 K).

Dynamic Light Scattering (DLS). The size measurements were performed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) equipped with a He–Ne laser (633 nm, fixed scattering angle of 173°) at room temperature.

Zeta Potential Measurements. All measurements were carried out as previously described.¹¹

Scheme 1. DOX IN-PEG-AuNPs via a Three-Step (S1, S2, and S3) Procedure^a

^aS4 represents the additional step needed for successfully conjugating the targeting moiety (anti-K_v,11.1 polyclonal antibody) onto the surface of DOX IN-PEG-AuNPs.

DOX Loading Efficiency. The amount of the drug incorporated into DOX IN-PEG-AuNPs was measured by UV-vis absorption spectroscopy. Absorption at 485 nm was used to extrapolate DOX concentrations based on a calibration curve (Figure S1 in the Supporting Information). Because the AuNPs spectrum could interfere with DOX detection, the DOX loading efficiency was calculated as follows (eq 1):

$$\text{DOX loading efficiency (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (1)$$

where C_1 is the initial drug content, and C_2 is the amount of free doxorubicin in the filtrate.²¹

DOX Release from DOX IN-PEG-AuNPs. DOX release was evaluated at physiological temperature (37 °C). Experimental conditions are described in a previous work of some of the authors.¹¹ pH was adjusted at 7.0 or 4.0. To measure the amount of DOX released, 1 mL was periodically removed from the dialysis bath and replaced with an equivalent volume of PBS. The amount of released DOX was determined by UV-vis absorption spectroscopy at 485 nm. DOX concentrations were

calculated on the basis of calibration curves in the relevant range of concentrations.¹¹ The concentration of DOX released from DOX IN-PEG-AuNPs was expressed as a percentage of the total DOX present in the sample (eq 2) and plotted as a function of time.

$$\% \text{DOX released} = \frac{\text{concentration of DOX released}}{\text{initial DOX concentration}} \times 100 \quad (2)$$

DFT Calculations. Initial molecular files of molecular DOX and DOX complexed with Au (III) have been constructed using GaussView 5.²² (Gaussian, Inc, Wallingford, CT). All molecular calculations have been performed in gas phase and in water. The solvent effect on energies was included using the IEFPCM continuum model²³ as implemented in the Gaussian 03 suite of program.²⁴ All the geometries were fully optimized without symmetry constraints using the density functional theory at the hybrid functional B3LYP level.^{25–27} The B3LYP method with the 6-311G (d,p) basis set is frequently used in predicting vibrational spectra of polyaromatic molecules.²⁸ The

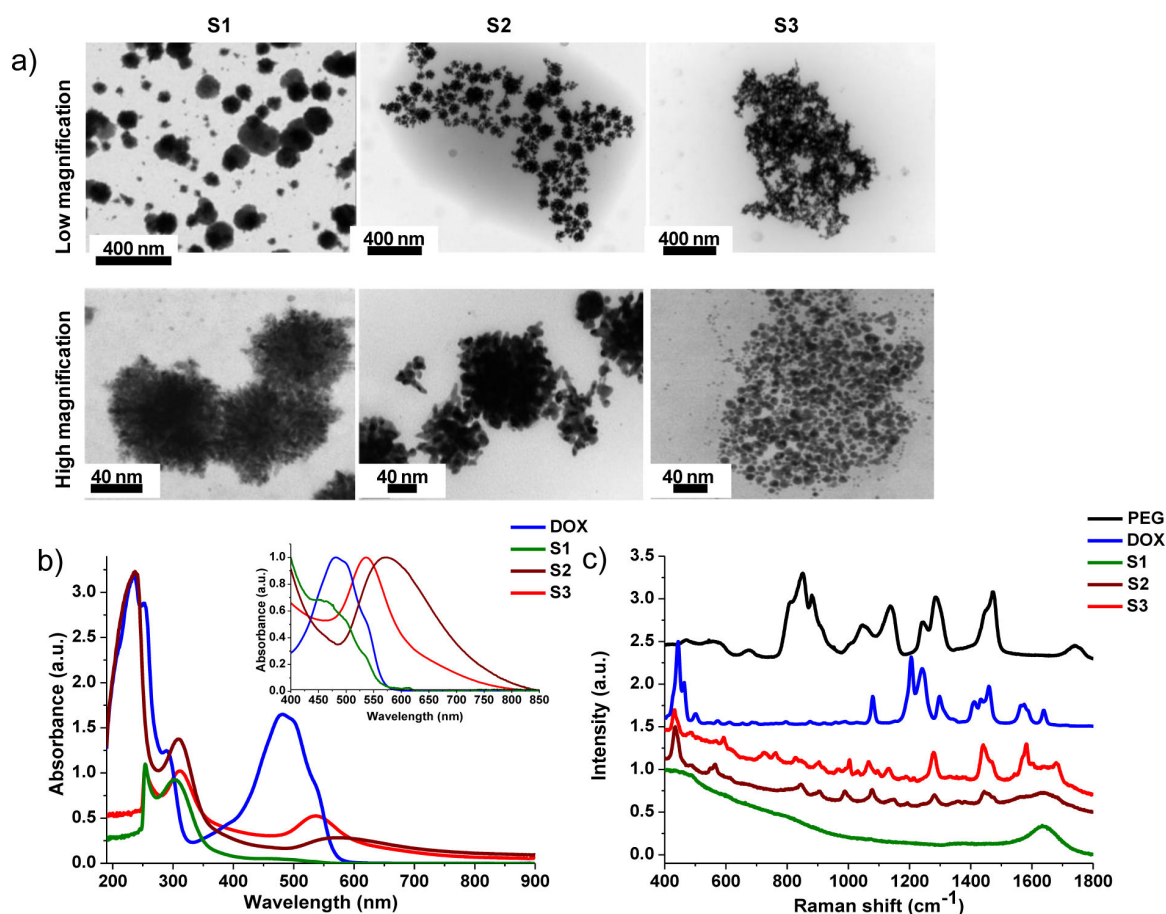


Figure 1. (a) TEM images (upper panels: low magnification; lower panels: high magnification) of S1, S2, S3 products and normalized (b) UV-vis absorption and (c) Raman spectra, respectively. (a) Scale bars: 400 and 40 nm. (b) The UV-vis absorption spectrum of DOX is also included for comparison. (c) Raman spectra of DOX and COOH-terminated PEG are also reported for comparison. The spectra were normalized on the intensity of the band at 990 cm⁻¹. Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm; laser power 20 mW; 1200 Tof 180 s.

standard split valence basis sets 6-311G(d,p) was used for all atoms, except for Au and Cl, which were treated by the relativistic effective core potential (ECP) and associated valence double- ζ basis set of Hay and Wadt (abbreviated as LANL2DZ).²⁹ After structural optimizations, vibrational frequencies and Raman scattering were computed at the same level of density functional theory. After computation of Raman activities, Gausssum³⁰ has been used to generate Raman intensities with a 785 nm excitation and full width at half-maximum parameter of 20 cm⁻¹. The calculated harmonic Raman vibrational wave numbers were scaled down uniformly.³¹ UV-vis transitions were finally evaluated in gas phase and in water with a PCM model using the time-dependent (TD) approach³² at the same level of density functional theory. Two structures have been considered (Table S1 in the Supporting Information): doxorubicin sI (named DOX) (Figure S2), and square-planar Au (III) dichloro-doxorubicin complex sII (named DOXAuCl₂) (Figure S3). Descriptors for such structures are reported in Table S2 (Supporting Information). Please note, only relevant results are mentioned in the main text, whereas most of the computed data are reported as Supporting Information.

In Vitro Biological Activity of DOX IN-PEG-AuNPs. *Cell Culture.* Human pancreatic carcinoma (PANC-1) cells (ATCC, LGC Standards, U.K.) were cultured as previously

described.¹¹ Twenty-four-well plates (Nunc, Fisher Scientific, Ireland) were used for evaluating the cells response to AuNPs (cell density = 4×10^4 cells/well).

LC₅₀ and EC₅₀ Determination. PANC-1 cells were exposed to a series of DOX IN-PEG-AuNPs, DOX ON-PEG-AuNPs, or DOX dilutions in complete media for 24 h. Concentrations ranged from 0 to 2.5×10^{-4} M for AuNPs and from 0 to 8 μ M for DOX. Negative and positive controls were included as previously described.¹¹ After 24 h of exposure, PANC-1 cells were counted as previously reported¹¹ by means of BD Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, U.K.) and dose-response curves were fitted to such data,¹¹ allowing for the extrapolation of the half-maximal lethal concentration (LC₅₀) for PEG-AuNPs and the half-maximal effective concentration (EC₅₀) of DOX.

RESULTS AND DISCUSSION

Formation Mechanism and Physicochemical Characterization of DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX IN-PEG-AuNPs. This study provides the first evidence for the formation of stable complexes of PEGylated Au (III)-DOX as building blocks of gold nanoparticles. Such protocol involved the formation of Au (III)-DOX complexes (DOX-AuCl₂⁻), followed by PEG interactions with DOX-AuCl₂⁻ clusters and formation of AuNPs. To the best of our knowledge, examples

of AuNPs formation from stable Au^{3+} ions–DOX complexes cannot be found in the scientific literature. The complexation of DOX with ferrous (Fe^{2+}) ions onto superoxide iron oxide nanoparticles (SPIONs) has however been reported,³³ suggesting that such synthetic process might be possible in principle.

The major difference with previously reported synthetic procedures of drug-loaded AuNPs is that DOX and PEG molecules both participate to the stabilization of AuNPs via electrostatic interactions between their carboxylic and amino groups. Synthesis of DOX IN–PEG–AuNPs included three main steps (Scheme 1). The first step (S1) consisted of Au (III)–DOX complexation, DOX– AuCl_2^- formation, and generation of gold clusters. In the second step (S2), COOH-terminated PEG molecules adsorb onto DOX–Au complexes. The reduction of DOX–Au complexes, the growth of AuNPs and the colloidal stabilization occur in the third step (S3). An additional step (S4) was needed to conjugate anti-K_v11.1-pAb to the surface of DOX IN–PEG–AuNPs, thus forming pAb–DOX IN–PEG–AuNPs (Scheme 1). Intermediate and final products of our synthetic procedure were extensively characterized by UV–vis absorption spectroscopy, TEM, Raman spectroscopy, and ^1H NMR. Computational modeling was also carried out in order to fully understand the reaction mechanism and the interactions occurring during gold–DOX complexation and PEG addition.

Physicochemical Characterization of S1 Product (Au (III)–DOX Complex). When DOX was added to the AuCl_2^- solution (S1), the formation of spherical metallo-micelles of about 60 nm was observed by TEM (Figure 1a). Based on this observation, we assumed that DOX molecules participate in the nucleation process with a consequent change of the final shape and size of nanoparticles. UV–vis absorption spectroscopy analysis of S1 products (Figure 1b) showed a characteristic absorption bands¹¹ (Figure 1b, inset). The band positions are very close to the ones observed with individual DOX molecules. But their relative intensities are not directly comparable and the 540 nm shoulder is more intense than with individual DOX. This means that the DOX could be present inside the solution as well as an other compound. Moreover, the individual DOX exhibits a pronounced UV–vis absorption peak at 303 nm whereas for the S1 product, this band is red-shifted to 320 nm. This latter one was associated with π – π^* electronic transitions due to interactions between the DOX ring and AuCl_2^- ions³⁴ and gives a clear evidence of the complex formation. Additionally, in agreement with our experimental data, the simulated UV–vis absorption spectrum of DOX in water showed a very intensive band at 545 nm (Figure S4 in the Supporting Information). This band is due to electronic delocalization of aromatic ring and HOMO–LUMO transition and explains the increase in intensity of the 540 nm shoulder on the absorption spectrum of the S1 product (it is important to point out that charge transfer transitions around 300 nm between two components in a solution cannot be easily simulated by quantum chemistry computation). This confirmed that DOX was effectively involved in the nucleation process and creates a complex with Au.

We have also recorded the Raman spectrum of S1 product and compared it with the calculated one. Experimentally, the Raman spectrum of S1 products is very poor since it shows one peak at 1637 cm^{-1} , assigned to water, and a broad peak at 432 cm^{-1} and a small one at 350 cm^{-1} (Figure 1c). On the contrary, the DOX Raman spectrum exhibits several intense bands that

cannot be directly correlated to the ones observed with the S1 product. Similar differences could be found between the computed Raman spectrum of molecular doxorubicin (DOX) and that of the dichloro doxorubicin Au (III) complex (DOXAuCl_2) (Figure S5). In detail, computed Raman spectrum of DOX in water showed a very intensive peak at 463 cm^{-1} , followed by several small bands between 600 and 1000 cm^{-1} as well as several intense bands from 1200 to 1700 cm^{-1} . In contrast, computed Raman spectrum of DOX AuCl_2 showed a very intense peak at 343 cm^{-1} and a doublet at 416 – 471 cm^{-1} . Many weak peaks were observed in the region of 400 – 1200 cm^{-1} , as well as an intense doublet at 1259 – 1430 cm^{-1} , surrounded by medium peaks at 1232, 1279, and 1332 cm^{-1} . Finally, a weak triplet is observed at 1538, 1587, and 1662 cm^{-1} . However, because bands are only observed on the 300 – 500 cm^{-1} range on the S1 product Raman spectrum, let us focus on this spectral range. First the Raman fingerprint of the S1 product was the presence of a peak around 350 cm^{-1} , as it not observed on the DOX spectrum (Tables S4 and S5 in the Supporting Information). This band can be assigned to the gold chloride stretches and δ (O–Au–O) in ring F (scheme S1) and is a clear evidence of the formation of DOXAuCl_2 in solution. The calculated spectrum also exhibits several small bands between 400 and 500 cm^{-1} that are assigned to with δ in Phe A, B, C, and F rings and that are close to the broad band observed experimentally. Such peak assignments were based on the fact that the O–O electronic transition are expected.³⁵

All these findings, supported by the computational data, validated our hypothesis of the formation of an Au (III)–DOX complex in stage S1. We speculate that Au^{3+} ions promoted the deprotonation of the DOX phenolic group at position C24 (for C positions numbering please refer to Scheme S1 in the Supporting Information).

Physicochemical Characterization of S2 Product (PEG–Au (III)–DOX Complex). In the second step of the synthesis (S2), dicarboxylic PEG was added to S1 mixture in order to stabilize the Au (III)–DOX complexes. The nanostructures thus obtained exhibited a snow-like shape with a diameter of 80 nm (Figure 1a) similar to the ones observed for the S1 step but with a larger diameter. These nanostructures seem to be embedded in a large shell of PEG (large-scale microscopic view on Figure 1a). Sakai et al. has reported the synthesis of similar nanostructures (snowflakes) using silver nanocube and copolymers in solution,^{36,37} whereas another group³⁸ has produced snowflake nanoparticles by incorporating protoporphyrin molecules in the growth solution of AuNPs. Such protoporphyrins interacted with AuCl_2^- ions on the surface of preformed Au seeds. A prominent peak at 570 nm on the UV–vis absorption spectrum of S2 products is visible. This band is largely red-shifted compared to the S1 spectrum that demonstrates the formation of electrostatic interactions between PEG chains and Au (III)–DOX complexes (Figure 1b). We believe that, during S2, Au (III)–DOX complexes migrate through PEG molecules. Thus, an considerable quantity of complexes diffused and is captured inside the PEG layer via a mechanism similar to the one described for DOX– Fe^{2+} complexes loaded onto SPIONs.³⁹ Based on previously reported findings,⁴⁰ we suppose that, when polymer was added to the gold-complexes, the polymer initially was bound to Au (III)-complexes in a mushroom conformation followed by a conformational change to brush mode.⁴⁰ This was evidenced by TEM images analysis (Figure 1a) as well as by DLS measurements (Table 1). Nanostructures growth stops

Table 1. z-Potential and Hydrodynamic Diameter of S1, S2, and S3 Products

synthetic product	zeta potential (mV)	hydrodynamic diameter (nm)	PdI
S1	-14 ± 4	59 ± 2	0.7
S2	-29 ± 2	78 ± 2	0.8
S3	-30 ± 1	18 ± 2	0.3

when all anchoring sites are saturated.⁴⁰ In our study, this saturation was achieved at a PEG addition concentration of 18.2 $\mu\text{g/mL}$, with a maximum achievable PEG loading of ~ 16 wt % (data not shown). This corresponds to approximately 1.20 dicarboxylic PEG molecules/AuNP.

Specific bands from 400 to 1800 cm^{-1} characterized the Raman spectrum of S2 products (Figure 1c). Such features were in agreement with computational results for the optimized DOXAuCl₂ structure (Figure S5 in the Supporting Information) with three prominent bands at 430, 1280, and 1660 cm^{-1} , assigned to δ in the A, B, C, and F rings and to the ν (C=C; C=O) in Phe A, B, C, and F rings (table S4). Previous studies have demonstrated remarkable differences between Raman spectra of doxorubicin before and after complexation with biomolecules or metal.^{41,42} The bands at 1420 and 430 cm^{-1} become more prominent upon complexation.⁴³ The resonance bands at 1275, 1420, and 1516, corresponding to the ($\nu_{\text{C-O}}$) and ($\nu_{\text{C=C}}$) vibration of ring A, are responsible of variation of steric conformation of DOX. Indeed, when C=O and hydroxyl groups of DOX interact with a metal, the conformation of the drug becomes more inclined to a perpendicular orientation rather than to a flat one.⁴² The resonance bands at 1275, 1420, and 1516, corresponding to the ($\nu_{\text{C-O}}$) and ($\nu_{\text{C=C}}$) vibration of ring A, are responsible for variation of steric conformation of DOX. Indeed, when C=O and hydroxyl groups of DOX interact with a metal, the conformation of the drug becomes more inclined to a perpendicular orientation rather than to a flat one.⁴² One should also notice an increase of the Raman signal compared to S1 spectrum. We assume that a SERS effect occurs probably due to different steric arrangement between PEG molecules and Au (III)–DOX complexes (Table S4 in the Supporting Information).

Physicochemical Characterization of S3 Product (DOX IN–PEG–AuNPs). The reduction of S2 mixture with NaBH₄ was carried out in this step to reduce gold species from Au^{III} to Au⁰ and form the final product DOX IN–PEG–AuNPs. When PEG diacid are added in the DOX–AuCl₂[−] solution, leading to the formation of DOX–AuCl₂–PEG diacid complexes, the reduction process by NaBH₄ was involved. The reduction of Au proceed via an electron transfer at the surface of electron-rich, DOX–AuCl₂–PEG molecules capped, gold particles with a decrease in nanoparticles diameter from 80 to 20 nm.⁴⁴ This phenomenon is due to a synergic reduction effect between diacid polymer and NaBH₄ during the synthetic process with a consequent strong decrease of final nanoparticles. The AuNPs thus formed were characterized by TEM and have spherical shape (Figure 1a) with a diameter close to 20 nm, confirmed by the hydrodynamic diameter measured by zetasizer (Table 1). The DOX IN–PEG–AuNPs absorption spectrum exhibits a small peak at 310 nm and a second one centered at 535 nm (Figure 1b). This latter peak is assigned to the localized surface plasmon of the nanoparticle with diameter of 20 nm embedded in PEG environment as expected.⁴⁵ Drug loading was also investigated by PM-IRRAS (Figure S6 in the Supporting

Information). The PM-IRRAS spectrum of DOX IN–PEG–AuNPs was characterized by a peak at 1096 cm^{-1} (attributed to COOH groups of PEG–diacid molecules) and peak at 1461 cm^{-1} (typical of COO stretching vibrations), proving the functionalization of the AuNPs with PEG molecules. The pronounced peak at 1730 cm^{-1} was assigned to the C=O of the ester bond linking PEG–diacid molecules to gold surface of nanoparticles. A small peak at 1640 cm^{-1} was also present, representing the characteristic band of DOX molecules. Thus, we could conclude that DOX, after complexation with AuCl₂[−], was not covalently linked to PEG: DOX was entrapped into PEG molecules (probably during the nucleation process), possibly generating a unique steric conformation of DOX within AuNPs. In parallel, the Raman spectrum of DOX IN–PEG–AuNPs was comparable to that of the S2 end-product, with exception to new bands between 700 and 900 cm^{-1} and around 1580 cm^{-1} (Figure 1c). Such bands were attributed to DOX aromatic rings vibrations and to those of C=O and hydroxyl groups in the DOX molecule. It has already been described that most of the Raman bands of molecules can be significantly enhanced by their proximity to the surface AuNPs. Thus, the increase of the relative intensity of such bands is herein reported as an evidence of the drug loading into AuNPs, as well as to their localization within the particles. The assignments for DOX IN–PEG–AuNPs Raman modes were suggested according to the scientific literature and are summarized in Table S3 of the Supporting Information. Moreover, because the Raman spectra between S3 and S2 are actually similar, we also assume that the DOX/Au interaction is still the same after the NP formation and that the DOX is grafted at the NP surface through the complex formation with Au. The steric orientation of DOX onto the AuNPs surface is known to be influenced by electrostatic interactions between amino group and phenol in the presence of diacidic PEG molecules under specific conditions of pH and ionic strength.⁴⁶ Therefore, we suggest that, during the reduction process, NaBH₄ reduced Au³⁺ to Au⁰ to form dispersed AuNPs of relatively uniform size in which DOX was entrapped between PEG chains and AuNPs. We believe that this chemical behavior is due to steric arrangement of the DOX–Au complex into PEG molecules. This phenomenon influences the drug–surface orientation with a change of electronic distribution within the DOX, Au³⁺, and PEG chains during the synthetic process with the formation of a new drug–gold nanoparticle system.

Stability of DOX IN–PEG–AuNPs and Drug Release. The stability of DOX IN–PEG–AuNPs in solution is an important property to assess for therapeutic applications^{47,48} and was analyzed by monitoring the Localized Surface Plasmon (LSP) band at 535 nm of the AuNPs (Figure 1b). Analysis was performed under different pH and ionic strength conditions over a period of time (3 months). A red shift of the LSP band confirms an increase in the size of the particle or an aggregation of nanoparticles, or both.⁴⁹ The synthesized DOX IN–PEG–AuNPs did show an almost negligible change in the LSP band position over a period of three months at both pH 7 and 4 (Figure S7 in the Supporting Information). Although the LPS band intensity slightly decreased over time, we could conclude that no major agglomeration occurred over 2 months, implying that DOX IN–PEG–AuNPs might find application as clinical drug-delivery systems.⁵⁰ Zeta potential measurements confirmed the spectroscopic results, showing that DOX IN–PEG–AuNPs were colloidal stable at physiological pH (z-potential = -30 ± 1 mV with a PdI equal to 0.3) (Table 1). We suggest

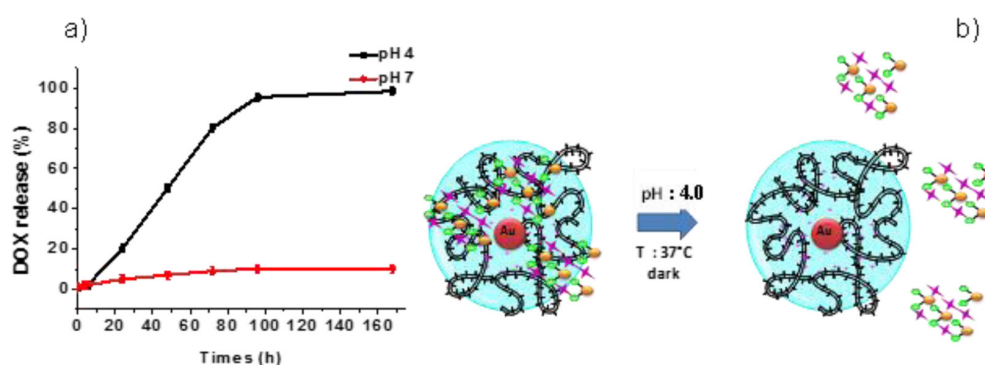


Figure 2. (a) Percentage (%) of DOX released from DOX-IN-PEG-AuNPs overtime in PBS (37 °C). Data are reported as average \pm standard deviation. (b) Schematic diagram of DOX release under acidic conditions.

that DOX IN-PEG-AuNPs-enhanced stability is due to the presence of the polymer chains. The zeta potential of S1 products in fact was found equal to -14 ± 4.0 mV, indicating an instable dispersion. The negative zeta potential suggested the presence of free negative charges in the sample, probably associated with free chloride ions (Cl^-) and/or ionizable functions, such as the phenolic groups at position C24 and C27 ($\text{p}K_a \sim 9.5$), on the DOX molecules present in the Au (III)-DOX complexes. After addition of PEG in the mixture, the zeta potential of S2 products decreased immediately to -29.0 ± 2.0 mV. This result confirmed the PEG function as stabilizer. The DOX loading efficiency was 86.5% (data not shown). DOX release was pH- and time-dependent (Figure 2). Notably, after 96 h, the DOX release at acidic pH ($\sim 98\%$) was approximately 9-fold higher than at neutral pH ($\sim 10\%$). These data were found of extreme interest for the study presented herein. Because tumor tissues are usually more acidic than normal tissues due to the abnormal vasculature architecture and function in the disease site, acid-promoted drug release is one of the potential mechanisms that can be exploited to develop stimuli-triggered cancer nanomedicine products.^{51,52} Stimuli-triggered drug release at the tumor site is one of the many potential advantages offered by nanotherapeutics over conventional chemotherapeutic agents.^{53,54} Notably, the moderate release occurring at physiological pH within the first hours should permit DOX IN-PEG-AuNPs to reach the therapeutic target following intravenous administration without causing toxicity in healthy tissues, thus limiting the side effects.⁵⁵ We supposed that the release of DOX was controlled by a dynamic equilibrium between Au (III)-DOX complexes free in the colloidal solution and trapped into AuNPs by the hydrophobic interactions between PEG and DOX. The ionic strength of the release medium (PBS) plays therefore a key role in such equilibrium. The mechanism by which acidic pH triggers drug release is probably associated with the presence of carboxylate groups in the chemical structure of PEG molecules. Such groups become protonated at acidic pH. This reduces the electrostatic interactions occurring between PEG and DOX that stabilize the DOX IN-PEG-AuNPs structure.

Concurrently, protonated DOX amine groups increase the water solubility of the drug molecules, favoring the drug release from AuNPs by the re-equilibration of the complex.⁵⁶

In order to better understand the mechanism just described, Raman spectra analysis was performed following DOX release at pH 7.0 and 4.0 (Figure S8). Previous studies have spectroscopically demonstrated differences in the chemical conformation and drug release profiles of Fe^{2+} -DOX

complexes at varying pH.⁴² Thus, DOX IN-PEG-AuNPs were characterized by Raman spectroscopy following incubation for 98 h in PBS at 37 °C in order to (1) confirm drug release and (2) evaluate variations in the chemical orientation of DOX at pH 4.0 (when DOX is protonated, positively charged, and carrying NH_3^+ on its sugar moiety) and pH 7.0 (when DOX is partially deprotonated at the amino group with $\text{p}K_a \sim 8.2$). The Raman band at 460 cm^{-1} was monitored to evaluate DOX release from AuNPs.¹⁸ The intensity of this band continuously decreased over time, until completely disappearing after 98 h (Figure S8 in the Supporting Information). These results demonstrated once again that DOX release was pH- and time-dependent. At both pH values, we observed that after 98 h (Figure S9 in the Supporting Information), the Raman spectra are dominated by the water mode at 1637 cm^{-1} and the PEG Raman spectrum (Figure 1c). The DOX spectrum observed in DOX IN-PEG-AuNPs is largely reduced. This confirms the DOX release. We conclude that, under acidic conditions, doxorubicin was released as S2 complex. However, Au NPs as S3 product plays two relevant roles: (1) favors the protection of DOX-Au-complex, keeping it stable until controlled release in PDAC cells; (2) checks the orientation of drugs and polymer by Raman spectroscopy.

Physicochemical Characterization of S4 Product (pAb-DOX IN-PEG-AuNPs). The successful covalent linkage of the targeting moiety (anti- $\text{K}_{\nu}11.1$ -pAb) to AuNPs was confirmed by UV spectroscopy (Figure 3a). After conjugation to anti- $\text{K}_{\nu}11.1$ -pAb, a blue-shift of around 40 nm of the absorption band (506 nm) and a second band at 786 nm were observed. The first band could be assigned to the individual DOX because no LSP could be found at such wavelength for Au NP in water or in PEG environment, regardless of the size differences. The second one can be due to aggregation of the Au NP after grafting of the antibody. We hypothesize that such modifications were associated with the chemical binding of the AuNPs surface with anti- $\text{K}_{\nu}11.1$ -pAb.^{11,57} However, the antibody grafting should also induce a partial release of the DOX due to change in the PEG conformation or electrostatic charges after the grafting. The morphology of DOX IN-PEG-AuNPs (Figure 3b), as revealed by TEM. Following anti- $\text{K}_{\nu}11.1$ -pAb conjugation, DOX IN-PEG-AuNPs formed highly clustered aggregates (Figure 3c). Successful immobilization of the antibody onto DOX IN-PEG-AuNPs surface was also demonstrated by Raman spectroscopy (Figure 3d). Several differences can be noticed in the spectra before and after the antibody grafting. First, some bands are no longer visible, such as the one at 595 cm^{-1} or the ones between 900 and 1200

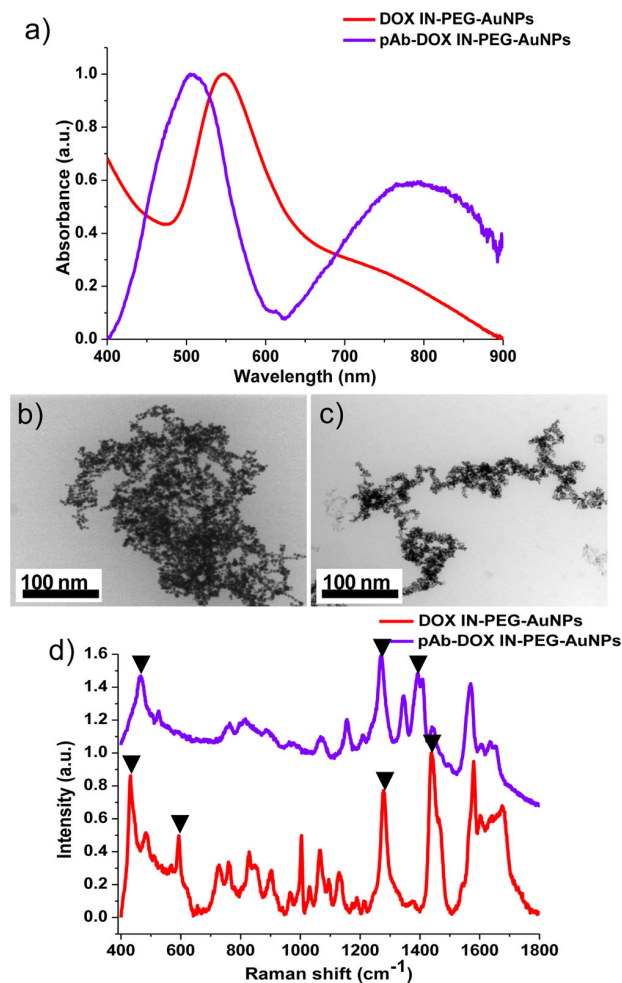


Figure 3. (a) UV-vis absorption spectra and (b,c) representative TEM images of DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX IN-PEG-AuNPs. (b,c) Scale bars: 100 nm. (d) Normalized Raman spectra of DOX IN-PEG-AuNPs before and after binding of anti-Kv11.1-pAb onto the nanoparticles surface. Arrows point out those peaks that shifted following pAb conjugation. Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm; laser power 20 mW; 1200 T of 180 s.

cm^{-1} . Second, several bands, such as those at 1280, 1437, 1466, and 1585 cm^{-1} , are shifted to lower frequencies and broadened compared to the S3 product, which can be due to a change of environment of the DOX molecule inside the PEG. Moreover, these bands are all related to the δ in the rings of the DOX molecules (Table S4) and thus to in-plane vibrations. Because the shifts are to lower frequency, it means that the DOX molecule is submitted to less constraint. This is confirmed by the broadening, which signifies a higher number of DOX conformations. With such interpretation, we assume that the DOX molecule has a greater degree of freedom inside the PEG (higher porosity or lower charges) after the antibody grafting.

Structural Comparison between DOX IN-PEG-AuNPs and DOX ON-PEG-AuNPs. As previously mentioned, the synthesis and physicochemical characterization of DOX ON-PEG-AuNPs have been recently published by some of the authors.^{12,58–60} Some differences among the two samples were immediately evident. First, DOX IN-PEG-AuNPs were characterized by a negative zeta potential in water, whereas DOX ON-PEG-AuNPs solutions demonstrated a positive

zeta potential. Second, DOX release was pH- and time-dependent in DOX IN-PEG-AuNPs samples. In contrast, DOX release was not detected for DOX ON-PEG-AuNPs in cell-free *in vitro* experiments, due to the amide bond between the DOX molecules and the PEG chains, a bond that requires the presence of lysosomal enzymes to be cleaved.^{11,61,62,63}

In order to better understand the intrinsic differences between these two nanomedicine candidates, comparative spectroscopic studies were carried out.

Comparative Spectroscopic Analysis. Our results showed that complexation between AuCl_2^- ions and DOX caused masking of characteristic UV-vis absorption peaks of the drug. Conversely, DOX ON-PEG-AuNPs showed characteristic absorption bands¹¹ (Figure 4a). This highlighted that the

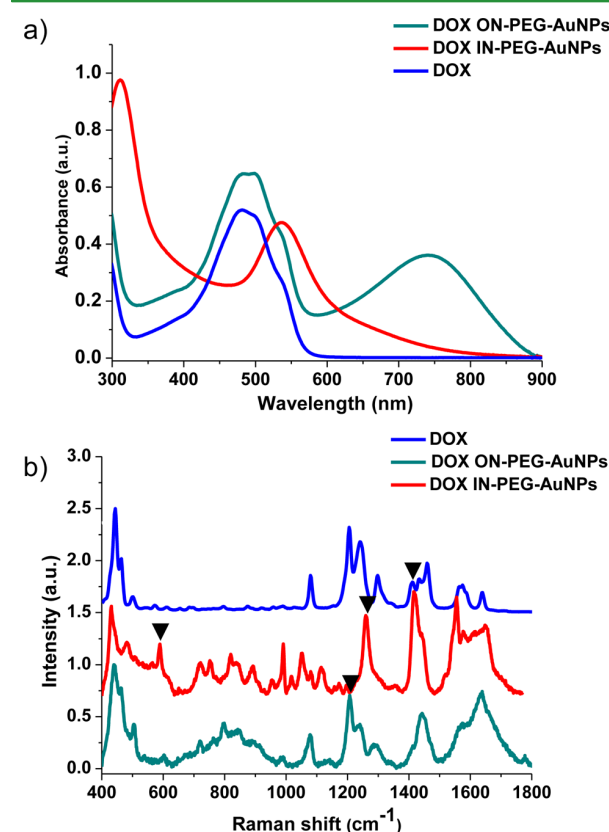


Figure 4. (a) Normalized UV-vis absorption spectra of DOX IN-PEG-AuNPs and DOX ON-PEG-AuNPs. (b) Normalized Raman spectrum of free DOX molecules, PEG, DOX into AuNPs (DOX IN-PEG-AuNPs), and DOX “onto” AuNPs (DOX ON-PEG-AuNPs). The arrows indicate differences among DOX IN-PEG-AuNPs and DOX ON-PEG-AuNPs spectra and associated with different orientation of DOX. Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm; laser power 20 mW; 1200 T of 180 s.

interactions occurring among DOX, PEG, and the gold-core of nanoparticles were substantially different in the two AuNPs samples. As already mentioned, in the case of DOX IN-PEG-AuNPs, the DOX molecules form a complex with the gold, which changes the electronic structure of the DOX and as a result its absorption spectrum. On the contrary, for the DOX ON-PEG-AuNPs, even if the DOX is linked to the gold, it remains unchanged and keep its electronic properties. Moreover, we can observe a broad band around 750 nm that can be

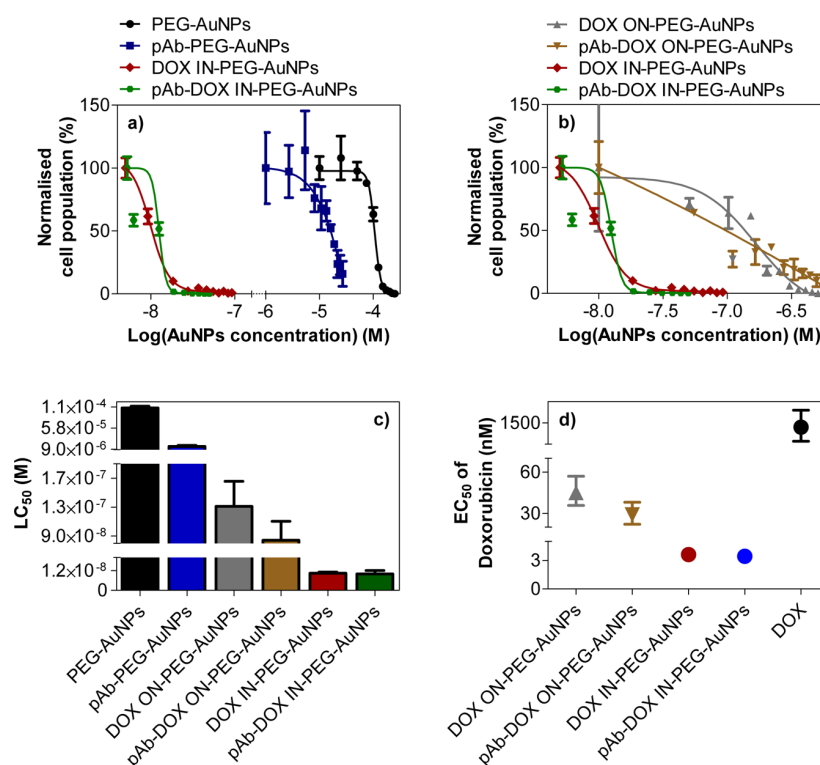


Figure 5. (a) Percentage (%) of live PANC-1 cells after exposure to various concentrations of PEG–AuNPs, pAb–PEG–AuNPs, DOX IN–PEG–AuNPs and pAb–DOX IN–PEG–AuNPs (ranging from 0 to 2.5×10^{-4} M) for 24 h. (b) Dose–response curves for DOX ON–PEG–AuNPs, pAb–DOX ON–PEG–AuNPs, DOX IN–PEG–AuNPs, and pAb–DOX IN–PEG–AuNPs, following 24 h incubation with PANC-1 cells. (c) LC_{50} values of PEG–AuNPs as extrapolated from dose–response curves. (d) EC_{50} values of doxorubicin delivered by PEG–AuNPs or in molecular form (DOX).

assigned to NP aggregates meaning that the DOX ON–PEG–AuNPs are less stable than the DOX IN–PEG–AuNPs.

The Raman spectra of DOX IN–PEG–AuNPs and DOX ON–PEG–AuNPs were also quite different (Figure 4b and Table S5 in the Supporting Information). As compared to the DOX, the DOX IN–PEG–AuNPs showed completely different Raman spectrum as explained previously. In contrast, DOX ON–PEG–AuNPs showed Raman signals very similar to those of free DOX molecules (Figure 4), except that all bands were broadened due to the presence of water and of the PEG molecules onto the gold surface of nanoparticles. Some new bands around $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ appeared, confirming a different DOX orientation onto AuNPs compared to DOX IN–PEG–AuNPs. The main difference consists in the bands located on the range $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Three bands are observable on the DOX spectrum (1420 , 1440 , and 1460 cm^{-1}), whereas the DOX ON–PEG–AuNPs exhibits only one broad band at 1439 cm^{-1} , which is responsible for the amide band between dicarboxylic PEG molecules onto AuNPs and the amino group of DOX.

Comparative ^1H NMR Study. Major differences between the ^1H NMR spectra of DOX and the S1 product were identified in the aromatic area (7.2 to 7.8 ppm) (Figures S10–S11 and Table S6 in the Supporting Information). This suggested that DOX was complexed to Au (III) ions via H-bonding of aromatic protons. The ^1H NMR spectrum of the S2 product showed characteristic peaks similar to those detected for S1 structures, suggesting that the formation of covalent bonds was not involved in the S2 synthetic step and confirming the

complex formation. The typical peaks corresponding to the PEG were also observed at 3.64 (s, 14H) and 3.66 to 3.70 ppm (m, 4H), at the same values as the spectrum of PEG alone (data not shown). This result was confirmed by a supplementary NMR experiment, carried out by DOSY (diffusion-ordered spectroscopy),⁶⁴ a technique that allows the virtual separation of mixture compounds based on the difference among the diffusion coefficients of each component of the mixed sample. In our case, the S2 product showed two NMR signals of PEG and DOX–Au, respectively, meaning different diffusion coefficients and, therefore, the presence of two separate molecules instead of a single one (Figure S12 in the Supporting Information). This suggests that the DOX–Au complex is effectively embedded inside the PEG matrix but that there is no bond formation between both compounds. The same result can be obtained for the DOX IN–PEG–AuNPs, an important unmodified signal of PEG. For DOX IN–PEG–AuNPs, the NP formation does not influence the PEG structure, and we assume that the NPs covered by the DOX molecules are inside a PEG shell without direct interaction. Clear differences could be detected between intensities and chemical shifts of DOX ON–PEG–AuNPs and DOX IN–PEG–AuNPs ^1H NMR spectra (Figure S10 in the Supporting Information), demonstrating that the chemical structure of the two nanotherapeutics under examination is indeed very different. This confirms the observations completed by Raman spectroscopy and UV–visible absorption.

Differences in the Anti- $K_v11.1$ -pAb Grafting onto AuNPs. Raman spectroscopy was used in order to evaluate potential

differences in the steric arrangement of the targeting moiety, a phenomenon that could deeply influence the ability of the antibody to actively target PDAC cells.

Raman spectra of DOX ON-PEG-AuNPs showed (Figure S13 in the Supporting Information) no change in the band position. This implies that there is not interaction between the DOX molecules and the grafted pAb. However, one can notice a decrease in the intensity of the peaks in the entire spectrum, which can be explained by a replacement of DOX by pAb grafted onto the PEG chain¹¹ or the Au surface. The Raman cross-section of pAb was very low, and we were not able to observe the pAb Raman band on the spectrum. Under the same conditions, the Raman spectra of DOX IN-PEG-AuNPs showed clear differences, as discussed previously. These results indicated that the chemical nature of AuNPs deeply influenced not only the Ab grafting and its orientation relative to the gold core but also the orientation of the DOX molecule at the Au surface.

Differences in the Therapeutic Efficacy of DOX IN-PEG-AuNPs and DOX ON-PEG-AuNPs. The results obtained and described previously confirmed the formation of a new drug-particle system in which DOX and PEG play a synergic role, providing a unique orientation to the DOX molecules that could deeply influence the therapeutic efficiency of our nanostructure. The percentage (%) of live PDAC cells (PANC-1 cell line) following 24 h exposure to PEG-AuNPs was evaluated by flow cytometry. The dose-response curves obtained (Figure 5a) clearly show that the half-maximal lethal concentration (LC₅₀) values decreased when doxorubicin was encapsulated into PEG-AuNPs structure (DOX IN-PEG-AuNPs), as compared to PEG-AuNPs. Furthermore, the LC₅₀ decreased significantly when DOX IN-PEG-AuNPs were decorated with the polyclonal antibody (Figure 5a,c). Nevertheless, no significant differences between DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX IN-PEG-AuNPs could be detected. It is established that PEG, as the organic component of PEG-AuNPs, has been known to have no impact on the toxicity of the nanocarrier itself, as reported in a previously published work of the authors.^{11,12} Although targeting of PEG-AuNPs with anti-K_v11.1-pAb did trigger an increase in cytotoxicity as compared to PEG-AuNPs (Figure 5c), such increase was negligible as compared to the effect detected for DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX IN-PEG-AuNPs. Interestingly, comparison with previously published data on the LC₅₀ for DOX ON-PEG-AuNPs and pAb-DOX ON-PEG-AuNPs showed that when DOX was encapsulated within the PEG-AuNPs structure (DOX IN-PEG-AuNPs), the cytotoxic effect of PEG-AuNPs was higher (Figure 5b,c). Drug-loading efficacy studies showed that 2×10^{-8} mol of DOX IN-PEG-AuNPs contained 8.7 μg of DOX, whereas 9.3 μg of DOX was present in 2×10^{-8} mol of pAb-DOX IN-PEG-AuNPs. On the basis of these loading efficacy studies, it was extrapolated that the EC₅₀ for DOX delivered by DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX IN-PEG-AuNPs was equal to ~3.62 nM and 3.44 nM, respectively. As a proof-of-principle, molecular DOX was also tested (Figure 5d), and its EC₅₀ (equal to 1.4 ± 0.7 μM) was compared to that of DOX delivered by the DOX IN-PEG-AuNPs under study. Such comparative study (Figure 5d) showed that the cytotoxic effect of the drug improved more than 385 times when DOX was delivered by DOX IN-PEG-AuNPs and 400 times by the active targeting. For comparison, previously published¹¹ EC₅₀ data on DOX ON-PEG-AuNPs and pAb-DOX ON-PEG-AuNPs are also reported in Figure

5d, demonstrating once again that DOX was more effective when encapsulated within PEG-AuNPs.

CONCLUSIONS

In this study, we provided comprehensive evidence on the successful synthesis and characterization of a new oncological nanotherapeutic based on the stable Au(III)-DOX complex. Characterization studies were conducted extensively and fully elucidated the formation mechanism of the nanostructure and the DOX conformational changes associated with such processes. We demonstrated that DOX-AuCl₂⁻ complexes self-assembled “into” stable AuNPs in the presence of low-molecular-weight PEG with a high efficiency (87 wt %). The delivery system thus obtained featured many advantages as nanotherapeutic for cancer therapy, including (i) optimal drug loading; (ii) small particle size with narrow size distribution; (iii) over 2-months stability in aqueous solution; (iv) triggered drug release at acidic pH; (v) add-on targeted therapy capability; and (vi) an improved EC₅₀ for the delivered drug (DOX) in an *in vitro* PDAC model. We believe that this study can open a novel chemical strategy, to modulate a well-defined nanocomplex-platform to originate a reproducibility of results between computational design and combinatorial chemistry for drug-specific nanocarrier development. For these reasons, the drug delivery system based on doxorubicin constitutes an additional therapeutic key in cancer treatment. Further studies are still envisaged, focused on assessing the *in vivo* assessment toxicity, pharmacokinetics, and dynamics on the relevant PDAC model.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.6b07250.

Additional data as mentioned in the text; supplementary figures, schemes, and tables (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jolanda.spadavecchia@univ-paris13.fr.

Author Contributions

[†]These authors contributed equally (H.M. and D.M.). The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was partially supported by the High-Performance Computing Centre of Upper Normandy (CRIHAN), the IRC Government of Ireland Fellowship to DM, QualityNano project Transnational Access (TCD-TAF-456), and Science Foundation Ireland (SFI/12/RC/2278).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Raymond Gillibert (Univ-Paris13) for technical assistance and discussion about Raman analysis.

REFERENCES

(1) Ott, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253 (11–12), 1670–1681.

- (2) Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (16), 1813–1825.
- (3) Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584.
- (4) Mahdaviifar, Z.; Samiee, S. Theoretical investigation of inclusion complex formation of Gold (III) – Dimethyldithiocarbamate anticancer agents with cucurbit[n = 5,6]urils. *Arabian J. Chem.* **2014**, *7* (4), 425–435.
- (5) Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanello, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Maccà, C.; Trevisan, A.; Fregona, D. Gold(III) Dithiocarbamate Derivatives for the Treatment of Cancer: Solution Chemistry, DNA Binding, and Hemolytic Properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (5), 1648–1657.
- (6) Giovagnini, L.; Ronconi, L.; Aldinucci, D.; Lorenzon, D.; Sitran, S.; Fregona, D. Synthesis, Characterization, and Comparative in Vitro Cytotoxicity Studies of Platinum(II), Palladium(II), and Gold(III) Methylsarcosinedithiocarbamate Complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (5), 1588–1595.
- (7) Capranico, G.; Kohn, K. W.; Pommier, Y. Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (22), 6611–6619.
- (8) Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5* (5), 442–453.
- (9) Schott, M.-A.; Domurado, M.; Leclercq, L.; Barbaud, C.; Domurado, D. Solubilization of Water-Insoluble Drugs Due to Random Amphiphilic and Degradable Poly(dimethylmalic acid) Derivatives. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (6), 1936–1944.
- (10) Urban, C.; Urban, A. S.; Charron, H.; Joshi, A. Externally modulated theranostic nanoparticles. *Translational Cancer Research* **2013**, *2* (4), 292–308.
- (11) Spadavecchia, J.; Movia, D.; Moore, C.; Maguire, M. M.; Moustou, H.; Casale, S.; Volkov, Y.; Prina-Mello, A. Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 791–822.
- (12) Spadavecchia, J.; Perumal, R.; Barras, A.; Lyskawa, J.; Woisel, P.; Laure, W.; Pradier, C. M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Amplified plasmonic detection of DNA hybridization using doxorubicin-capped gold particles. *Analyst* **2014**, *139* (1), 157–64.
- (13) Etrych, T.; Jelínková, M.; Řhová, B.; Ulbrich, K. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J. Controlled Release* **2001**, *73* (1), 89–102.
- (14) Lastraioli, E.; Lottini, T.; Bencini, L.; Bernini, M.; Arcangeli, A. hERG1 Potassium Channels: Novel Biomarkers in Human Solid Cancers. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, Article No. 896432.
- (15) Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (9), 2097–2116.
- (16) Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornell, H. H.; Ibrahim-Hashim, A.; Bailey, K.; Balagurunathan, Y.; Rothberg, J. M.; Sloane, B. F.; Johnson, J.; Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* **2013**, *73* (5), 1524–1535.
- (17) Das, G.; Nicastrì, A.; Coluccio, M. L.; Gentile, F.; Candeloro, P.; Cojoc, G.; Liberale, C.; De Angelis, F.; Di Fabrizio, E. FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microsc. Res. Tech.* **2010**, *73* (10), 991–995.
- (18) Kang, B.; Affi, M. M.; Austin, L. A.; El-Sayed, M. A. Exploiting the Nanoparticle Plasmon Effect: Observing Drug Delivery Dynamics in Single Cells via Raman/Fluorescence Imaging Spectroscopy. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 7420–7427.
- (19) Yang, X.; Zhang, X.; Liu, Z.; Ma, Y.; Huang, Y.; Chen, Y. High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (45), 17554–17558.
- (20) Heywang, C.; Saint-Pierre Chazalet, M.; Masson, M.; Bolard, J. Orientation of Anthracyclines in Lipid Monolayers and Planar Asymmetrical Bilayers: A Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Study. *Biophys. J.* **1998**, *75* (5), 2368–2381.
- (21) Wohlfart, S.; Khalansky, A. S.; Gelperina, S.; Maksimenko, O.; Bernreuther, C.; Glatzel, M.; Kreuter, J. Efficient Chemotherapy of Rat Glioblastoma Using Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles with Different Stabilizers. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e19121.
- (22) Inagi, S.; Hayashi, S.; Fuchigami, T. Electrochemical polymer reaction: selective fluorination of a poly(fluorene) derivative. *Chem. Commun.* **2009**, No. 13, 1718–1720.
- (23) Furche, F.; Ahlrichs, R. Erratum: “Time-dependent density functional methods for excited state properties” [J. Chem. Phys. 117, 7433 (2002)]. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121* (24), 12772–12773.
- (24) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A.; *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian, Inc: Wallingford, CT, 2004.
- (25) Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A: At, Mol, Opt. Phys.* **1988**, *38* (6), 3098–3100.
- (26) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (27) Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104* (3), 1040–1046.
- (28) Shakila, G.; Periandy, S.; Ramalingam, S. Molecular Structure and Vibrational Analysis of 1-Bromo-2-Chlorobenzene Using ab initio HF and Density Functional Theory (B3LYP) Calculations. *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *2011*, Article No. 512841.
- (29) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82* (1), 270–283.
- (30) O’Boyle, N. M.; Tenderholt, A. L.; Langner, K. M. cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (5), 839–845.
- (31) Scott, A. P.; Radom, L. Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree–Fock, Møller–Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (41), 16502–16513.
- (32) Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; Frisch, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109* (19), 8218–8224.
- (33) 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* **2013**, *169* (1–2), 48–61.
- (34) Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (40), 8410–8426.
- (35) Freeman, D. W.; Baglin, F. G. A Raman study of gold oxygen bonds from several tetra-coordinate complexes in aqueous solution. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1981**, *17* (5), 161–167.

- (36) Sakai, T.; Alexandridis, P. Mechanism of Gold Metal Ion Reduction, Nanoparticle Growth and Size Control in Aqueous Amphiphilic Block Copolymer Solutions at Ambient Conditions. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (16), 7766–7777.
- (37) Yuan, H.; Ma, W.; Chen, C.; Zhao, J.; Liu, J.; Zhu, H.; Gao, X. Shape and SPR Evolution of Thorny Gold Nanoparticles Promoted by Silver Ions. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (7), 1592–1600.
- (38) Spadavecchia, J.; Casale, S.; Landoulsi, J.; Pradier, C.-M. Tuning the shape and size of hybrid gold nanoparticles by porphyrins using seed-mediated synthesis. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *609*, 134–141.
- (39) Munnier, E.; Cohen-Jonathan, S.; Linassier, C.; Douziech-Eyrolles, L.; Marchais, H.; Soucé, M.; Hervé, K.; Dubois, P.; Chourpa, I. Novel method of doxorubicin–SPION reversible association for magnetic drug targeting. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363* (1–2), 170–176.
- (40) Lee, K. Y. J.; Wang, Y.; Nie, S. In vitro study of a pH-sensitive multifunctional doxorubicin-gold nanoparticle system: therapeutic effect and surface enhanced Raman scattering. *RSC Adv.* **2015**, *5* (81), 65651–65659.
- (41) Abraham, S. A.; Edwards, K.; Karlsson, G.; MacIntosh, S.; Mayer, L. D.; McKenzie, C.; Bally, M. B. Formation of transition metal–doxorubicin complexes inside liposomes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2002**, *1565* (1), 41–54.
- (42) Gautier, J.; Munnier, E.; Douziech-Eyrolles, L.; Paillard, A.; Dubois, P.; Chourpa, I. SERS spectroscopic approach to study doxorubicin complexes with Fe²⁺ ions and drug release from SPION-based nanocarriers. *Analyst* **2013**, *138* (24), 7354–7361.
- (43) Airoidi, M.; Barone, G.; Gennaro, G.; Giuliani, A. M.; Giustini, M. Interaction of Doxorubicin with Polynucleotides. A Spectroscopic Study. *Biochemistry* **2014**, *53* (13), 2197–2207.
- (44) Politi, J.; Spadavecchia, J.; Iodice, M.; de Stefano, L. Oligopeptide-heavy metal interaction monitoring by hybrid gold nanoparticle based assay. *Analyst* **2015**, *140* (1), 149–155.
- (45) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (14), 7238–7248.
- (46) Spadavecchia, J.; Perumal, R.; Barras, A.; Lyskawa, J.; Woisel, P.; Laure, W.; Pradier, C.-M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Amplified plasmonic detection of DNA hybridization using doxorubicin-capped gold particles. *Analyst* **2014**, *139* (1), 157–164.
- (47) Liu, S. H.; Han, M. Y. Synthesis, Functionalization, and Bioconjugation of Monodisperse, Silica-Coated Gold Nanoparticles: Robust Bioprobes. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15* (6), 961–967.
- (48) Gautier, J.; Allard-Vannier, E.; Munnier, E.; Souce, M.; Chourpa, I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J. Controlled Release* **2013**, *169* (1–2), 48–61.
- (49) Toma, H. E.; Zamarion, V. M.; Toma, S. H.; Araki, K. The coordination chemistry at gold nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1158–1176.
- (50) Dreaden, E. C.; Austin, L. A.; Mackey, M. A.; El-Sayed, M. A. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther. Delivery* **2012**, *3* (4), 457–478.
- (51) Markman, J. L.; Rekechenetskiy, A.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65* (13–14), 1866–1879.
- (52) De Jong, W. H.; Borm, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3* (2), 133–149.
- (53) Wei, T.; Chen, C.; Liu, J.; Liu, C.; Posocco, P.; Liu, X.; Cheng, Q.; Huo, S.; Liang, Z.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Liang, X.-J.; Rocchi, P.; Peng, L. Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (10), 2978–2983.
- (54) Liu, Y.; Wang, W.; Yang, J.; Zhou, C.; Sun, J. pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8* (3), 159–167.
- (55) Yang, J.; Benyamin, B.; McEvoy, B. P.; Gordon, S.; Henders, A. K.; Nyholt, D. R.; Madden, P. A.; Heath, A. C.; Martin, N. G.; Montgomery, G. W.; Goddard, M. E.; Visscher, P. M. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat. Genet.* **2010**, *42* (7), 565–569.
- (56) Wang, J.; Wang, B. M.; Schwendeman, S. P. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release* **2002**, *82* (2–3), 289–307.
- (57) Orendorff, C. J.; Hankins, P. L.; Murphy, C. J. pH-triggered assembly of gold nanorods. *Langmuir* **2005**, *21* (5), 2022–6.
- (58) Boisselier, E.; Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
- (59) Pippa, N.; Pispas, S.; Demetzos, C.; Sivolapenko, G. Advanced nanocarriers for an antitumor peptide. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15* (2062), 1–13.
- (60) Boisselier, E.; Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759.
- (61) Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Masure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (4), 855–869.
- (62) Veronese, F. M.; Schiavon, O.; Pasut, G.; Mendichi, R.; Andersson, L.; Tsirk, A.; Ford, J.; Wu, G.; Kneller, S.; Davies, J.; Duncan, R. PEG–Doxorubicin Conjugates: Influence of Polymer Structure on Drug Release, In Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (4), 775–784.
- (63) Aryal, S.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S. Doxorubicin conjugated gold nanoparticles as water-soluble and pH-responsive anticancer drug nanocarriers. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (42), 7879–7884.
- (64) Johnson, C. S., Jr Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34* (3–4), 203–256.

- Supporting Information -

Tunable design of gold (III)-Doxorubicin complex – PEGylated nanocarrier. The golden doxorubicin for oncological applications

Hanane Moustouai^{1‡}, Dania Movia^{3‡}, Nathalie Dupont¹, Nadia Bouchemal¹, Sandra Casale², Nadia Djaker¹, Philippe Savarin¹, Adriele Prina-Mello^{3,4}, Marc Lamy de la Chapelle¹, Jolanda Spadavecchia^{1*}

¹ *CNRS, UMR 7244, CSPBAT, Laboratoire de Chimie, Structures et Propriétés de Biomateriaux et d'Agents Therapeutiques Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France*

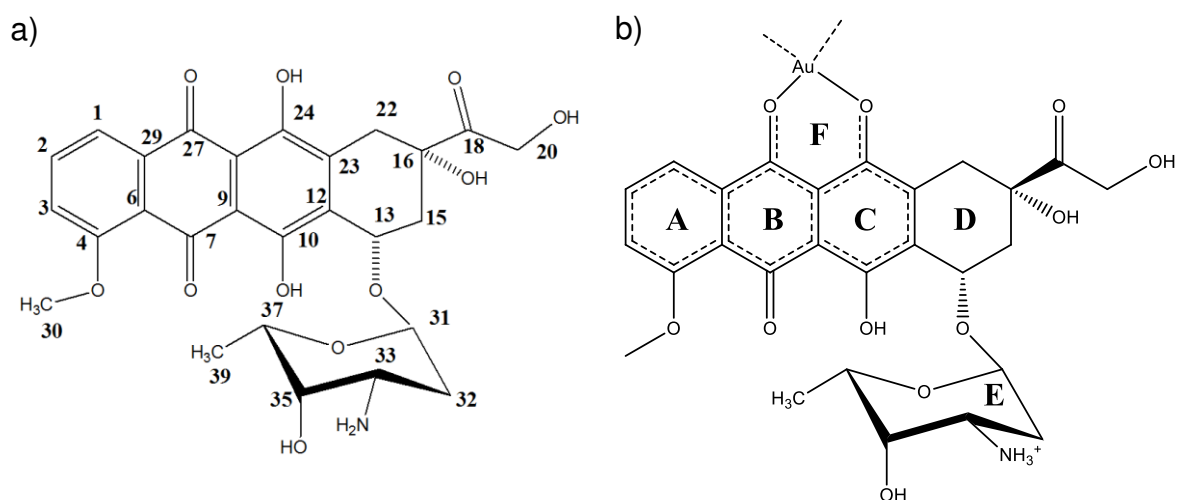
² *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris VI, Laboratoire de Réactivité de Surface, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.*

³ *Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Trinity College Dublin, Ireland*

⁴ *AMBER Centre, CRANN Institute, Trinity College Dublin, Ireland*

Corresponding author: jolanda.spadavecchia@univ-paris13.fr

ADDITIONAL SCHEMES



Scheme S1. Chemical structure of (a) doxorubicin (DOX) and (b) the simulated DOX-AuCl₂⁻ complex. (a) Annotations are used for the description of Raman spectra assignments in the manuscript. (b) Rings in the simulated DOX-AuCl₂⁻ complex are identified with letters from A to F; this nomenclature is used for Raman band assignments.

ADDITIONAL FIGURES

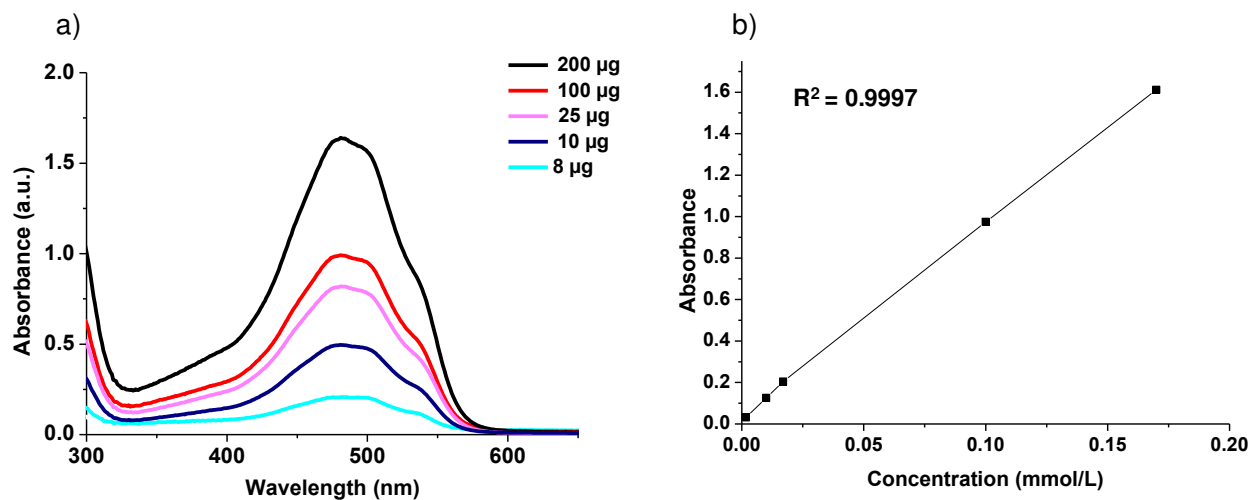


Figure S1. (a) UV-Vis absorption spectra of DOX at increasing known concentrations. (b) A calibration curve ($R^2 = 0.9997$) was extrapolated from such measurements. The amount of DOX molecules contained into DOX IN-PEG-AuNPs was estimated based on this curve.

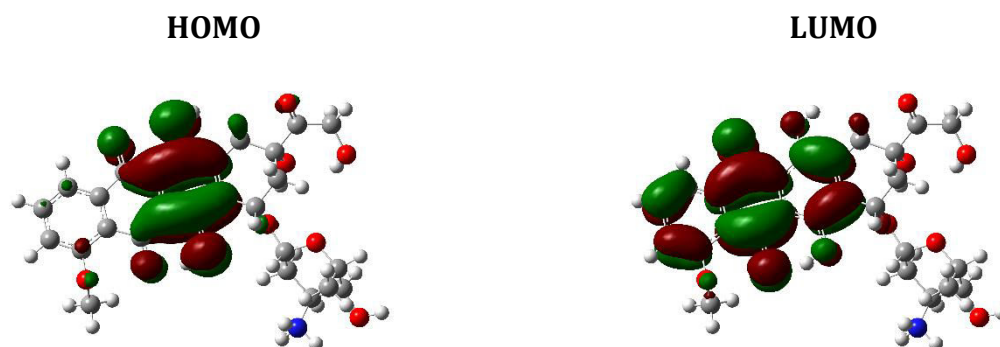


Figure S2. Graphical representation of molecular orbitals involved in the more intensive UV-Vis electronic transition for sI (DOX).

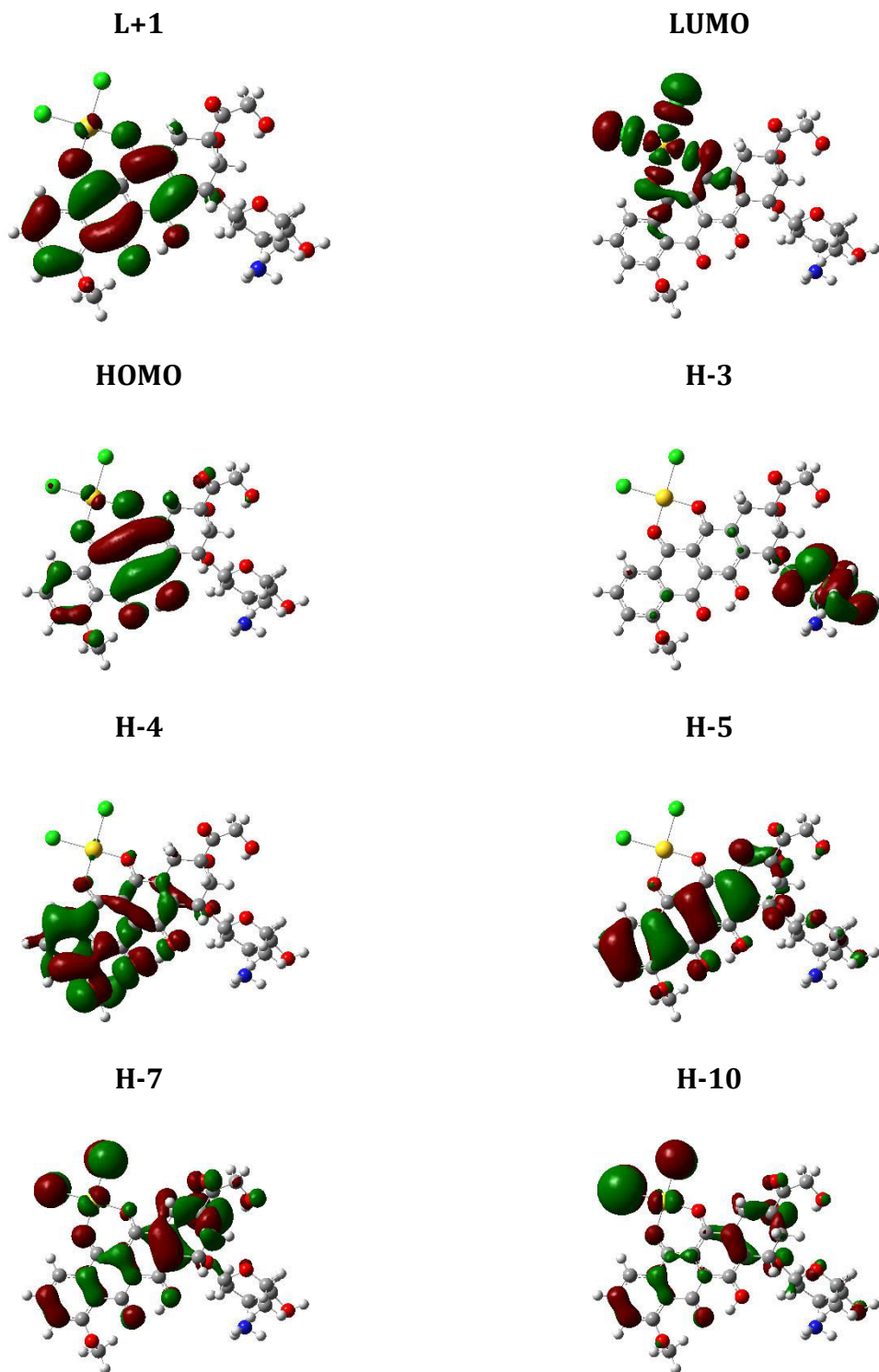


Figure S3. Graphical representation of molecular orbitals involved in UV-Vis electronic transitions for sII (DOXAuCl₂).

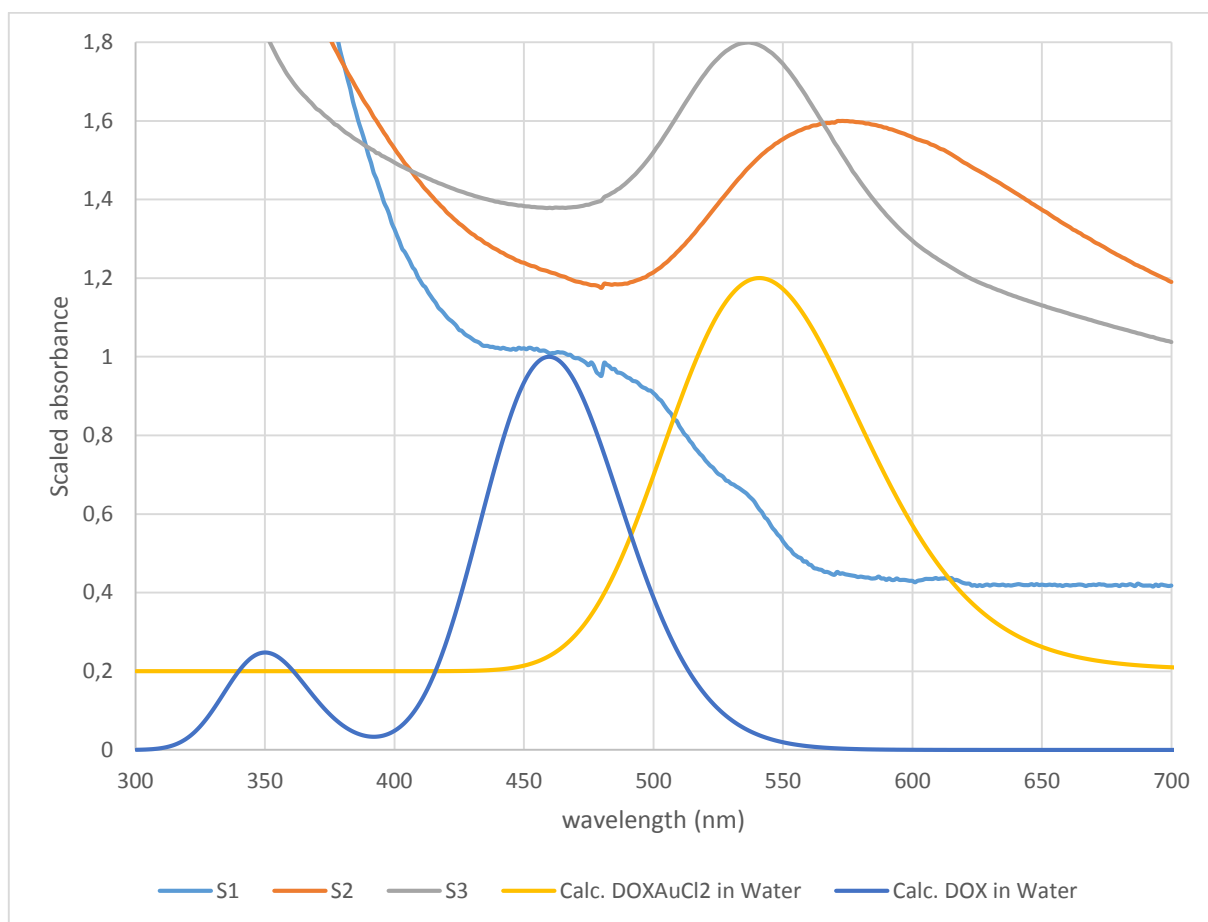


Figure S4. Comparison of scaled computed (**sI** DOX and **sII** DOXAuCl₂) and experimental (S1, S2 and S3) UV-visible spectra.

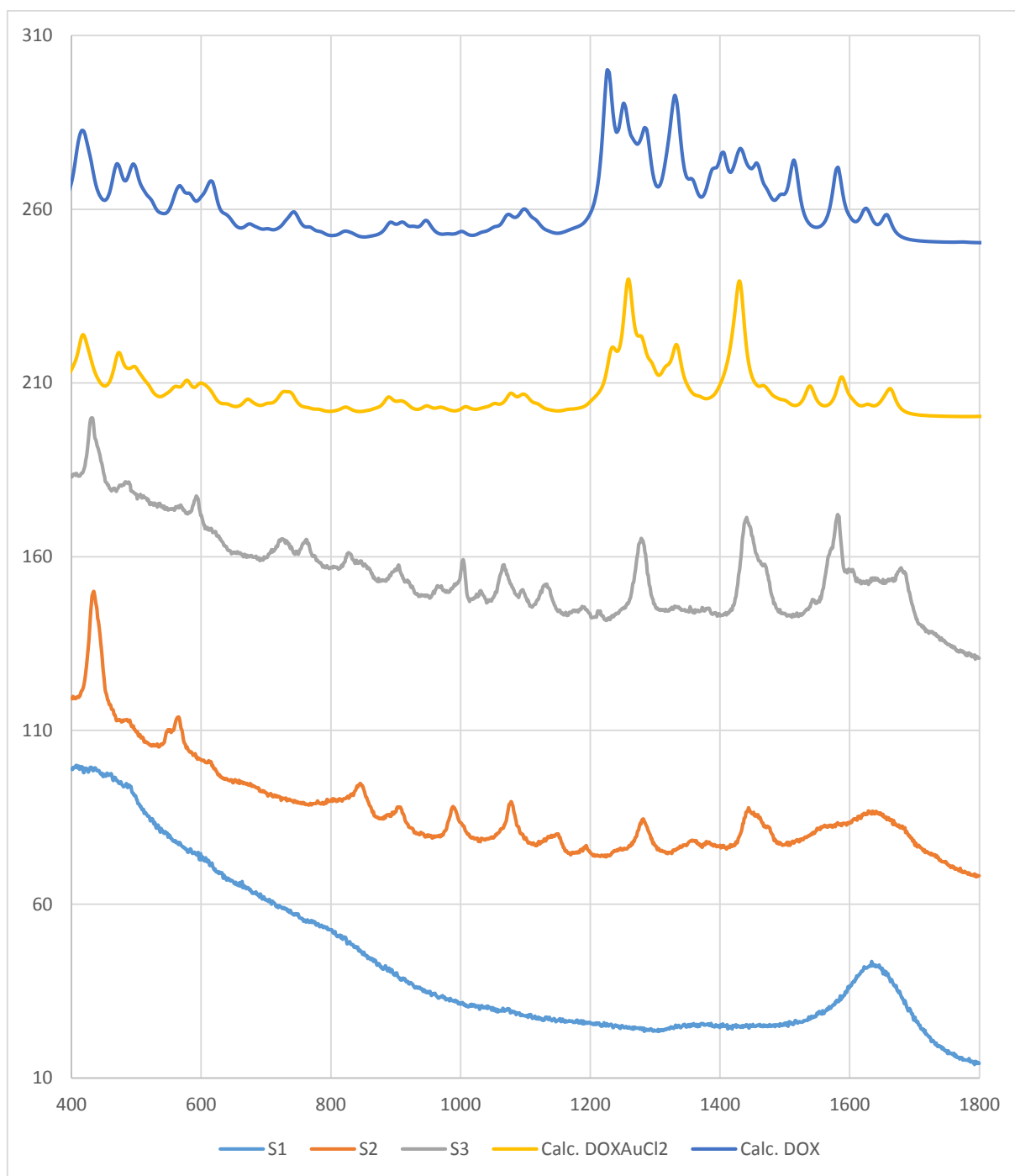


Figure S5. Graphical superimposition of Raman spectra of S1, S2 and S3 products and calculated sI (DOX) and sII (DOXAuCl₂).

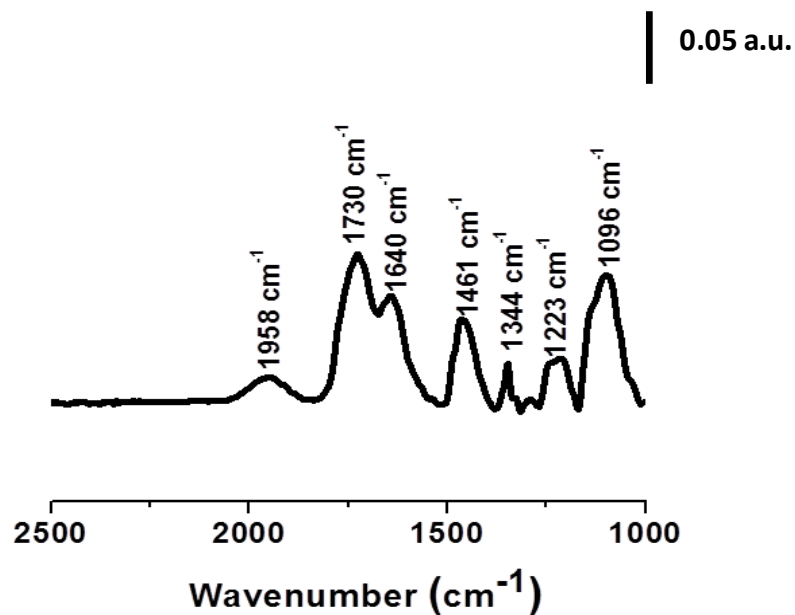


Figure S6. PM-IRRAS spectra of DOX-IN PEG AuNPs deposited onto gold surface.

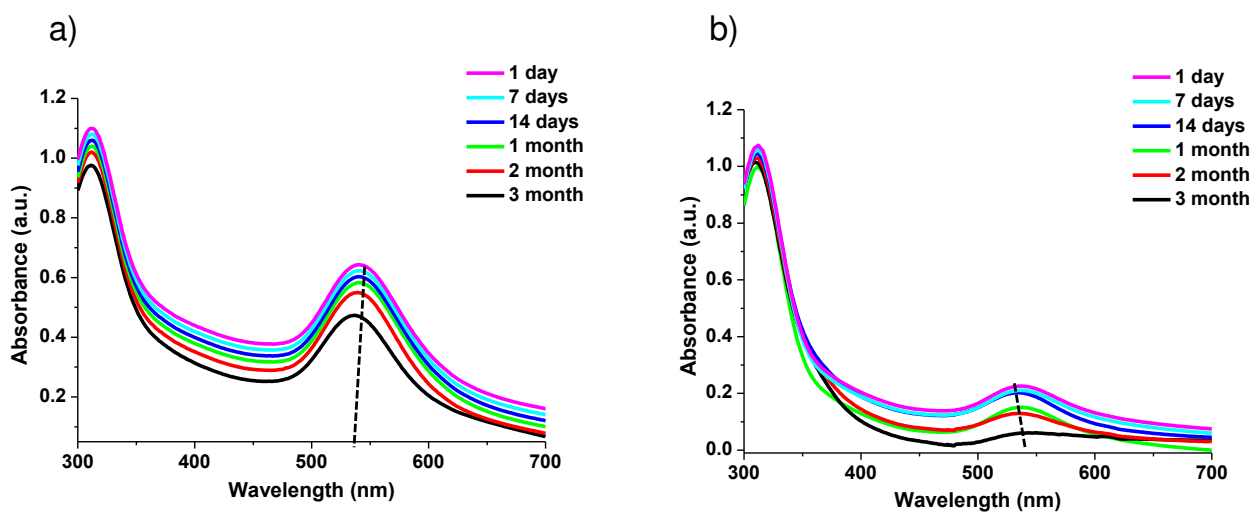


Figure S7. Changes in the UV-Vis absorption spectra of DOX IN-PEG-AuNPs when incubated in buffer solution at pH 7.0 (a) and pH 4.0 (b) up to three months.

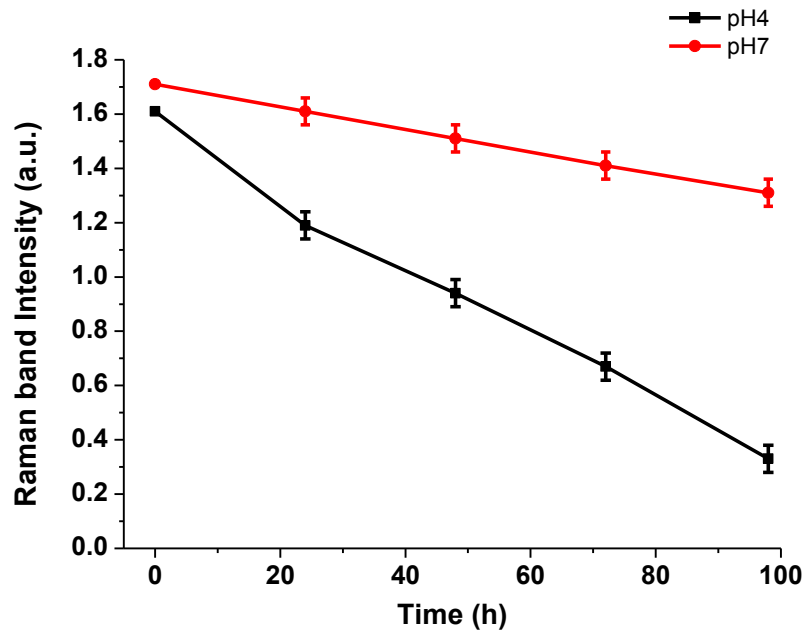


Figure S8. Changes in the Raman band intensity at 460 cm^{-1} overtime. DOX IN-PEG-AuNPs were incubated in PBS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) at pH 4.0 and pH 7.0

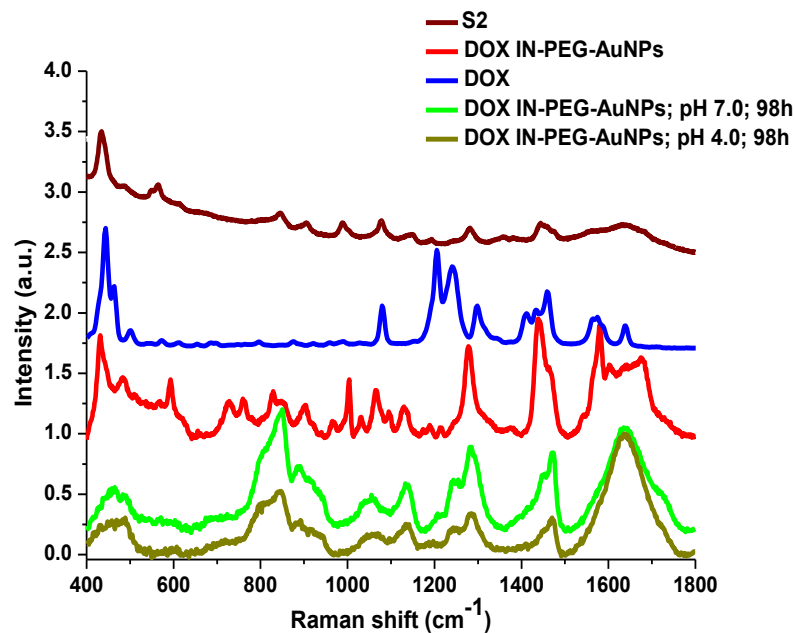


Figure S9. Normalized Raman Spectra of DOX release as S2 complex by DOXO-IN-PEG-AuNPs at pH 4.0 and pH 7.0 (time: 98 h). Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$; laser power 20 mW; 1200 ToF 180 s.

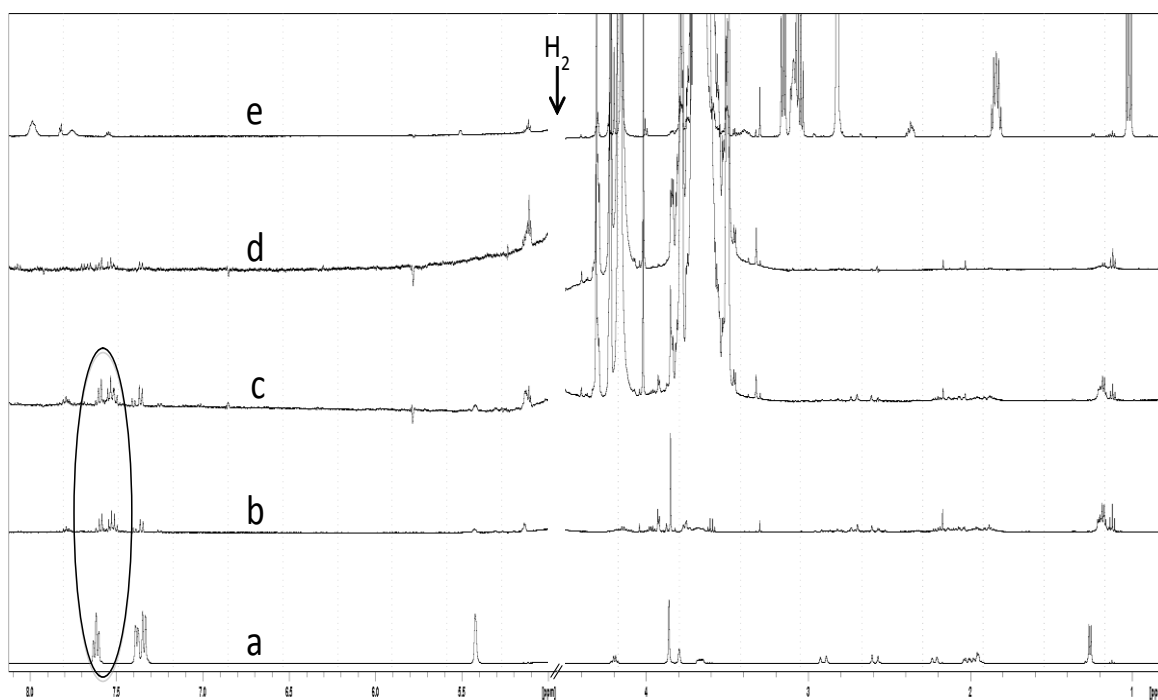


Figure S10. ^1H NMR spectra (in D_2O , at 500MHz) of (a) DOX, (b) S1 product, (c) S2 product, d) S3 product (DOX IN-PEG-AuNPs), and (e) DOX ON-PEG-AuNPs.

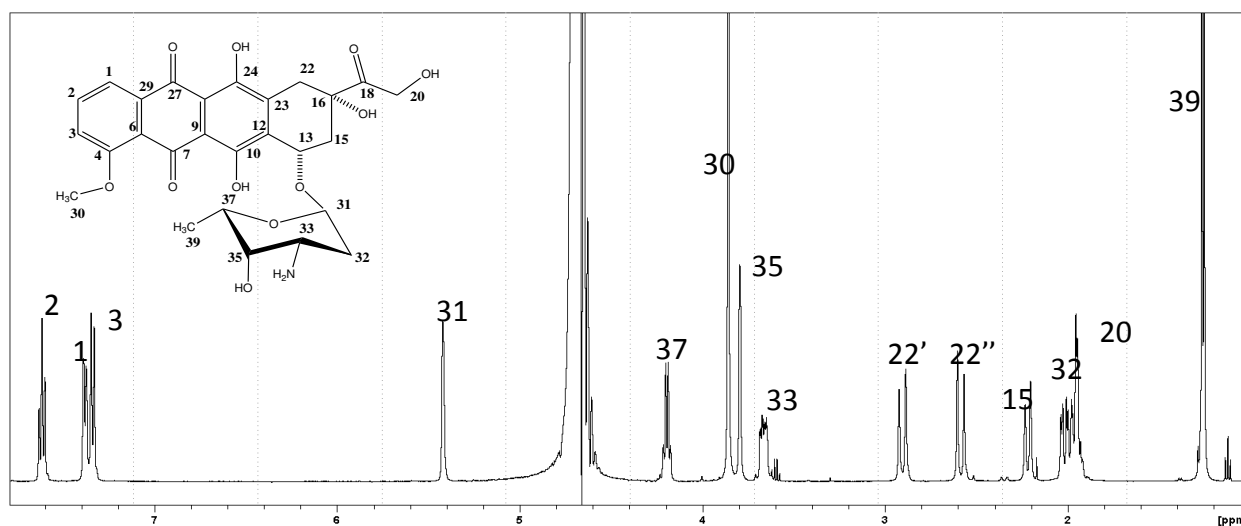


Figure S11. ^1H NMR spectrum for doxorubicin in D_2O at 300K and 500MHz. the corresponding chemical shifts are in the table S6.

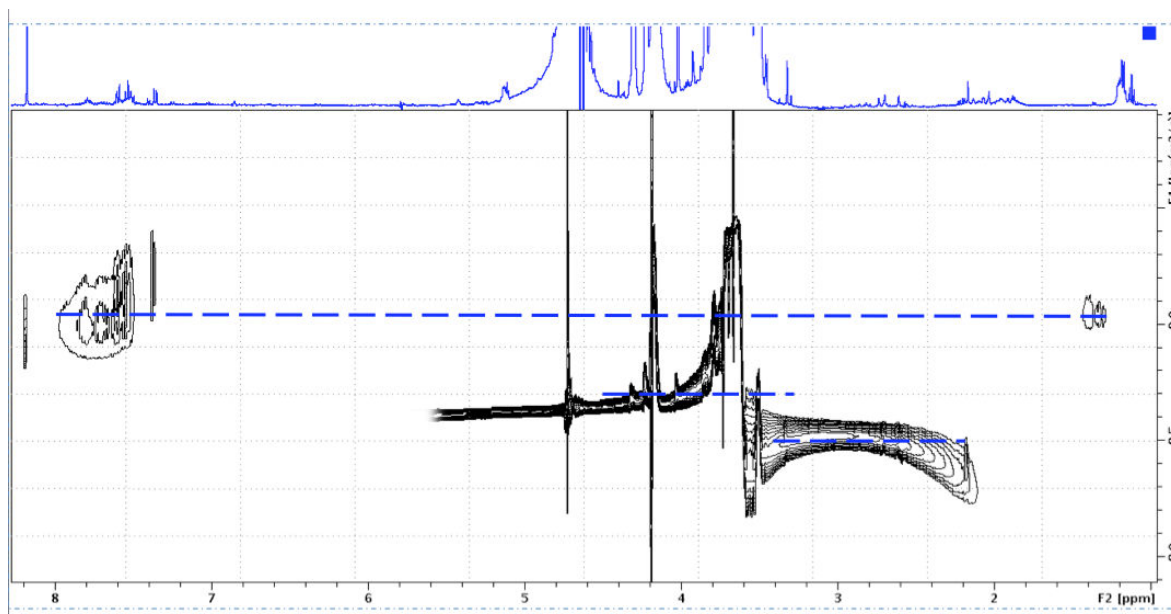


Figure S12: DOSY display for S2. The unlabelled lines represent the two NMR signals of PEG and DOX-Au respectively, meaning different diffusion coefficients

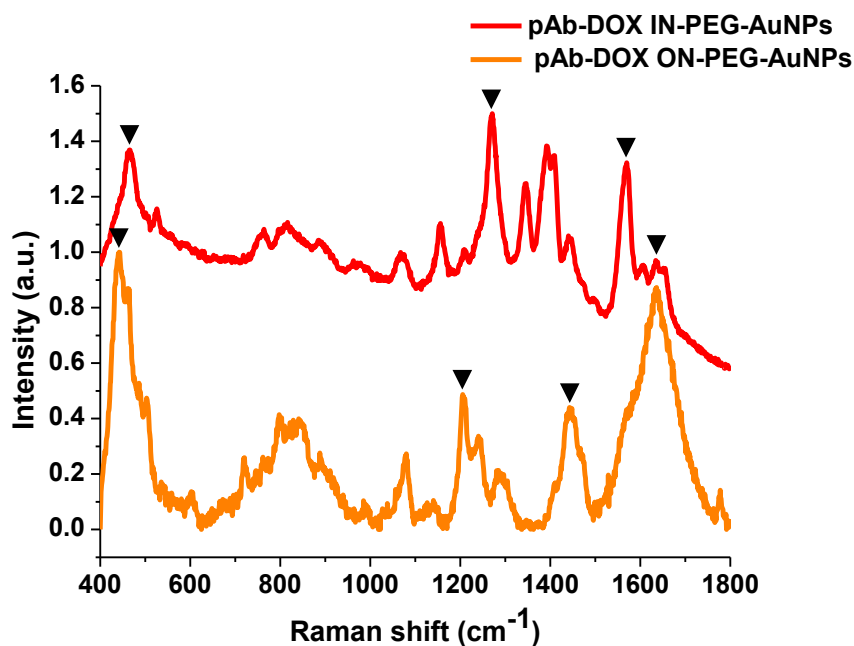


Figure S13. Comparison of normalized Raman spectra of pAb-DOX IN-PEG-AuNPs and pAb-DOX ON-PEG-AuNPs. The arrows indicate the difference of principal peaks of DOX IN PEG-AuNPs and DOX ON PEG-AuNPs after pAb conjugation. Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{nm}$; laser power 20 mW; 1200 ToF 180 s.

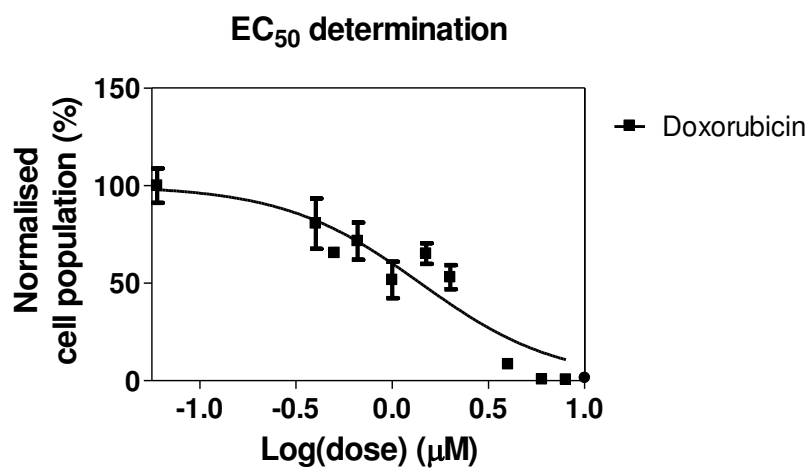


Figure S14. Percentage (%) of live cells as quantified by flow cytometry after exposing PANC-1 cells to various concentrations of DOX (ranging from 0 to 8 μM) for 24 h. The dose-response curve is fitted to extrapolate the EC₅₀ value of DOX.

ADDITIONAL TABLES

Table S1. Structures **sI** (DOX) and **sII** (DOXAuCl₂) analysed for the computation study included in this work.

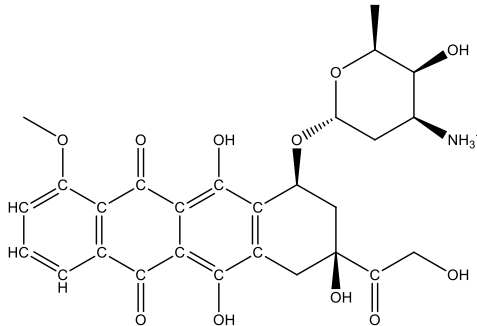
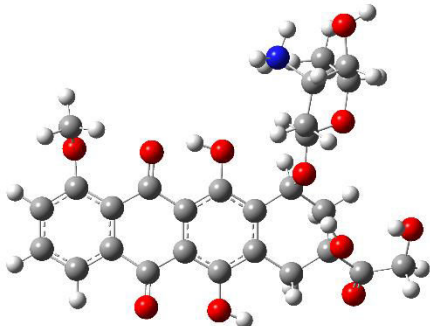
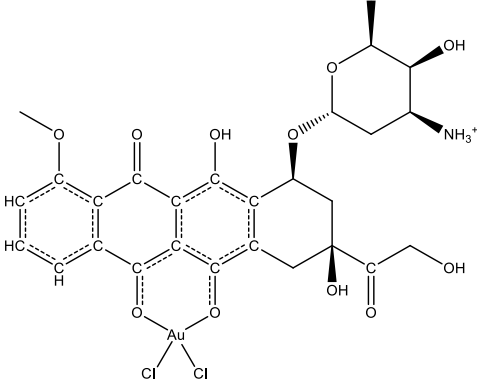
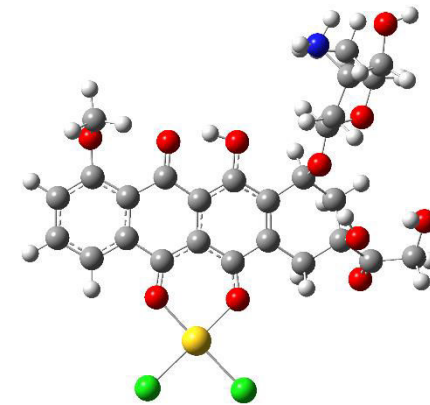
Structure name	Chemical structure	Optimized 3D structure
<p>sI (DOX)</p> <p>Charge : +1</p>		
<p>sII (DOXAuCl₂)</p> <p>Charge : +1</p>		

Table S2. Calculated chemical descriptors for **sI** and **sII** structures optimized by DFT/ B3LYP/ IEFPCM in water.

Descriptors	sI (DOX)	sII (DOXAuCl ₂)
Atoms	69	71
Charge	+1	+1
Electrons	286	398
Spin	Singlet	
H, C, O, N basis set	6-311G**	
Au, Cl basis set	Not applicable	ECP LANL2DZ
Total energy (in a.u.)	-1929.53956996	-2094.30061404
Dipole (in Debye)	29.8142	45.9910

Table S3. Calculated UV-Vis electronic transitions and assignments for sI and sII structures at the B3LYP/6-311G(d,p)/LANL2DZ TD-DFT level of theory. When doxorubicin complexes with Au (III), modelling studies indicate that the most intensive UV-Vis absorption band red shifts from approximately 460 nm for sI (DOX) to c.a. 550 nm in sII (DOXAuCl₂).

Structure	λ (nm)	Oscillator strength	Major contributions
sI (DOX)	342	0.0090	H-4 \rightarrow LUMO
	350	0.0615	H-3 \rightarrow LUMO
	368	0.0031	H-1 \rightarrow LUMO
	372	0.0011	H-6 \rightarrow LUMO
	431	0.0018	H-2 \rightarrow LUMO
	459	0.2882	HOMO \rightarrow LUMO
sII (DOXAuCl ₂)	538	0.0840	HOMO \rightarrow L+1
	542	0.0296	H-3; H-5; H-7; H-10 \rightarrow LUMO HOMO \rightarrow L+1
	550	0.0130	H-4 \rightarrow LUMO
	611	0.0016	H-2 \rightarrow LUMO
	760	0.0004	H-1 \rightarrow LUMO
	1443	0.0003	HOMO \rightarrow LUMO

Table S4. Experimental Raman frequencies (in cm⁻¹) for step 2 and 3 in comparison with calculated unscaled raman frequencies (in cm⁻¹) of sII DOXAuCl₂ at DFT-B3LYP/6-311G** level of theory. We have only kept calculated frequencies between 300 and 1800 cm⁻¹ with a relative calculated intensity superior to 15 (in comparison with the peak at 1225 cm⁻¹ taken as 100 reference). Rings A, B, C, D, E and F as represented on Figure S.

Calculated Raman spectra		Experimental spectra		Bands assignments (major components only)
sII (DoxoAuCl ₂)		S2 product	S3 product (DOX IN-PEG-AuNPs)	
Freq.	Rel. Int.	Freq. (Int)	Freq. (Int)	
339	83	---	350 (H)	v(Au-Cl) δ (OAUO) in ring F δ (OH...O)
343	194	---		
416	41	436 (vH)	430 (H)	δ in rings A, B, C, F δ (OH...O)
428	13			
471	21	464 (w)	484 (w)	δ in rings A, B, C, D, E, F δ (OH...O)
473	16			
497	19			

576	13	562 (m)	595 (m)	δ in rings A, B, C, E, F $\delta(\text{OH}\dots\text{O})$
725	10	---	729 (w)	δ in ring E
738	11	---	763 (w)	$\nu(\text{Au-O})$ δ in rings A, B, C, D, F
888	12	905 (w)	901 (w)	δ in ring E
1232	35	1248 (vw)	1253 (vw)	$\nu(\text{C=C})$ in rings A, B, C $\omega(\text{CH}_2)$ in ring D
1258	100	1282 (m)	1280 (vH)	$\nu(\text{C=C}; \text{C=O})$ and δ in rings A, B, C, F $\nu(\text{C-O ester}); \delta(\text{OH}\dots\text{O});$ $\omega(\text{CH}_2)$
1279	35			
1294	18			
1314	15	1362(vw)	1323 (vw)	$\nu(\text{C=C}; \text{C=O})$ and δ in rings A, B, C, F $\delta(\text{OAUO})$ in ring F
1333	47			
1420	18	1443 (w)	1437 (vH)	$\nu(\text{C=C}; \text{C=O})$ and δ in rings A, B, C, F $\delta(\text{OAUO})$ in ring F
1430	99			
1467	11	1465 (w)	1466 (H)	δ in rings A, B, C, F $\delta(\text{OH}\dots\text{O}); \omega(\text{CH}_2)$
1538	22	1563 (vw)	1582 (H)	$\nu(\text{C=C}; \text{C=O})$ and δ in rings A, B, C, F $\delta(\text{OH}\dots\text{O}); \omega(\text{CH}_2)$
1587	30			
1662	20	1660 (m)	1646 (m)	$\nu(\text{C=C}; \text{C=O})$ and δ in rings A, B, C $\delta(\text{OH}\dots\text{O})$
Abbreviations “vH, H, m, w, vw” indicate “very high, high, medium, weak and very weak” band intensities.				

Table S5. Assignment of experimental resonance Raman peaks of DOX IN-PEG-AuNPs and DOX ON-PEG-AuNPs and their attribution to possible vibrational bands.

DOX Raman (cm^{-1})	COOH-terminated PEG Raman (cm^{-1})	Calc. DOXAu Complex (cm^{-1})	DOX IN-PEG-AuNPs (cm^{-1})	DOX ON-PEG-AuNPs (cm^{-1})	Bands assignment (cm^{-1})
---	---	339, 343	350	---	$\nu(\text{AuCl}), \delta(\text{OAUO})$
---	---	416, 428	430, 484	430	$\delta(\text{OH}\dots\text{O}),$ $\delta\text{Ring (Phe)}, \delta\text{Ring F}$
460	460-562	---	---	---	$\delta(\text{OH}\dots\text{O}),$ $\nu(\text{OH}\dots\text{O})$ (PEG), $\delta\text{Ring (Phe)},$ $\omega\text{C-H. } \nu\text{C-H (PEG)},$
---	---	576	595	---	$\delta(\text{OH}\dots\text{O}),$ $\delta\text{Ring (Phe, D, E, F)}$

760	678	---	729, 763	719, 798	ω N-H ² , δ (Ring E)
990	850, 882	888	901	985	δ (Ring E)
1083	---	---		1078	δ (CC=O), δ (COC),
1205-1234 (double peak)	1049-1137	---	---	1205-1242	δ (COC) ester, ν (CO)(PEG)
1290	1242-1283	---	---	1290	ν (C=C), ν (CO) ester(PEG and DOX), ν (C=O) (PEG and DOX), δ (OH...O) (PEG and DOX), δ Ring (Phe)(DOX)
---	---	1280	1280 (single peak)	---	ν (C=C), ν (CO) ester , ν (C=O), δ (OH...O), δ Ring (Phe, F)
1400	1447-1474	---	---	---	δ (CH ₂), ν (C=O, C-H, O-H)
1422-1461 (double peak)	---	1420, 1430	1437 (single peak)	1437 (single peak)	δ Ring (Phe, F), ν (C=C), ν (C=O), δ (OAuO)
---	---	1467	1466	---	δ Ring (Phe, F), δ (OH...O), ω (CH ₂)
1582	---	1538, 1587	1582	1571	ν (C=C), ν (C=O), δ Ring (Phe, F), δ (OH...O), ω (CH ₂)
1650	---	1660	1646	1640	ν (C=C), ν (C=O), δ Ring (Phe), δ (OH...O)

Table S6. ¹H and ¹³C chemical shifts (ppm) for DOX in D2O at 300K

H1 /C1	H2/ C2	H3/ C3	H15'- H15'' /C15	H20/ C20	H22' - H22' ' /C22	H30/ C30	H31/ C31	H32/ C32	H33/ C33	H35/ C35	H37/ C37	H39/ C39
7.3 4	7.6 2	7.3 8	2.001/ 2.23	1.95 27.5	2.58/ 2.92	3.86 56.2	5.44 98.7	1.93 27.6	3.66 46.8	3.8 66.0	4.20 66.7	1.25 15.5
119 .46	136 .6	119 .35	35.27	5	31.9 4	8	3	5	4	9	8	1

2.2.2 Etude de la stabilité de la DOX IN dans des milieux biologiques

Une étude de la stabilité de la DOX IN a été réalisée dans différents milieux biologiques. Dans une première expérience, différentes quantités de solution de NaCl ont été ajoutées à une solution colloïdale de DOX IN, afin d'obtenir des concentrations finales au sein de la solution colloïdale allant de 5 *mM* à 500 *mM*. Puis ces échantillons ont été analysés en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis dont les résultats sont présentés sur la figure 2.11.

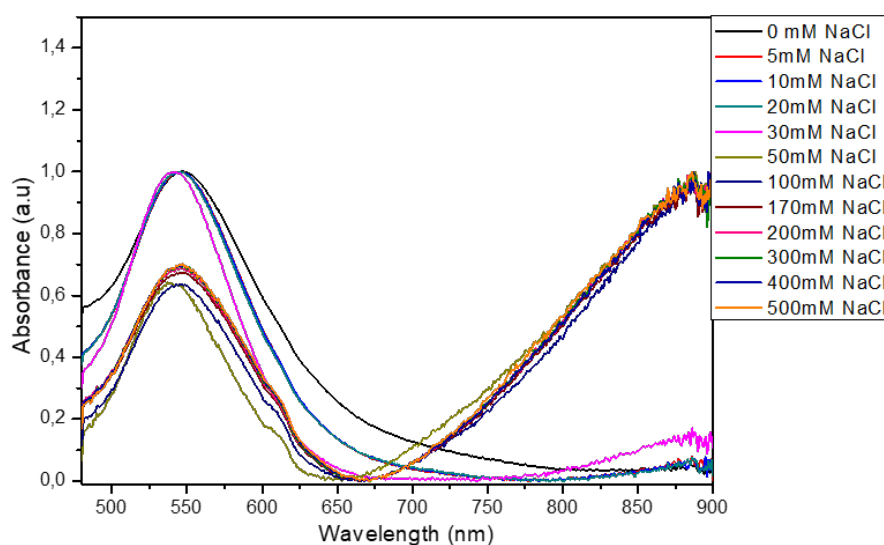


FIGURE 2.11 – Spectres d'absorption UV-Vis de la DOX IN dispersée dans une solution de NaCl à différentes concentrations (allant de 0 à 500 *mM*).

Tout d'abord, une diminution de l'absorption à la résonance plasmon (à partir de 50 *mM* de NaCl) accompagnée d'un léger déplacement de la bande plasmon vers de plus faibles longueurs d'onde est à noter. De plus, il y a apparition d'une nouvelle bande d'absorption dans la région des grandes longueurs d'onde, qui apparaît à partir de 50 *mM* et dont l'intensité semble rester constante, cette nouvelle bande est caractéristique de la présence d'agrégats.

Ce phénomène peut être expliqué par l'effet de la force ionique sur l'état d'agrégation des nanoparticules. En effet l'augmentation de la force ionique peut conduire à la diminution du nombre de charges autour des nanoparticules et diminuer ainsi leur stabilité. Cette diminution induit l'agrégation des particules et par conséquent la concentration en nanoparticules isolées diminue.

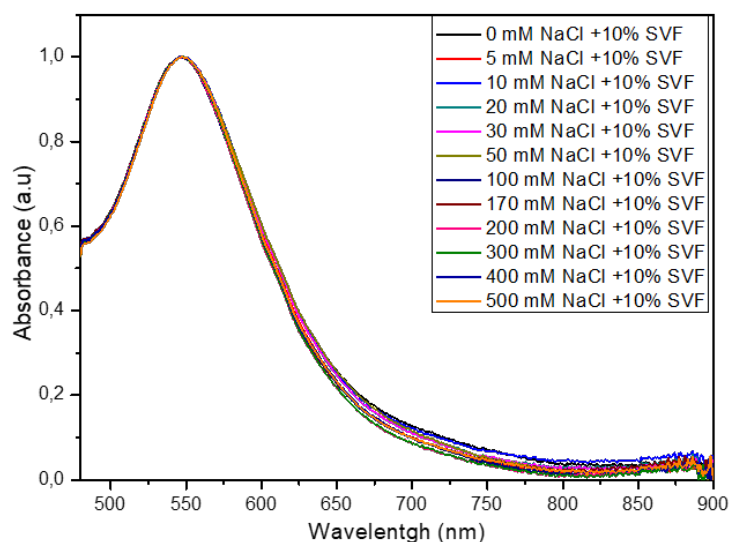


FIGURE 2.12 – Spectres d’absorption UV-Vis de la DOX IN dispersée dans une solution de NaCl à différentes concentrations (allant de 0 à 500 *mM*) en présence de 10% de SVF.

Cette même expérience de stabilité des nanoparticules a été réalisée en ajoutant cette fois ci 10% de SVF à chaque concentration en NaCl avant d’être ajouté à la solution colloïdale.

Contrairement au cas précédent (c’est-à-dire avec du NaCl seul), aucun changement significatif n’a été détecté mis à part un léger élargissement de la résonance plasmon (Figure 2.12). Il semblerait donc qu’en présence de SVF, une couche protectrice de protéines, protège les nanoparticules de toute agrégation.

Une étude complémentaire a été réalisée en incubant la DOX IN dans un milieu cellulaire (RPMI) complété avec 10% de SVF. Tout d’abord comme on peut le voir sur les spectres d’extinction (figure 2.13), la bande plasmon reste à la même position que ce soit en incubant à 37°C et à une pression de CO_2 de 5%, dans l’eau (Figure 2.13A) ou dans le milieu cellulaire (Figure 2.13B). Cependant, un léger élargissement de la bande plasmon est visible lorsque la DOX-IN est incubée dans le milieu cellulaire. Ceci se traduit en DLS, par une augmentation du diamètre hydrodynamique d’environ 20 *nm* de la DOX IN comme le montre l’histogramme de la figure 2.14. Cette augmentation du diamètre se fait instantanément et évolue légèrement pendant le temps d’incubation. Le diamètre hydrodynamique passe de 86 *nm* à 109 *nm* après ajout du milieu, puis à 120 *nm* après 6h d’incubation à 37°C et à pression de CO_2 de 5%.

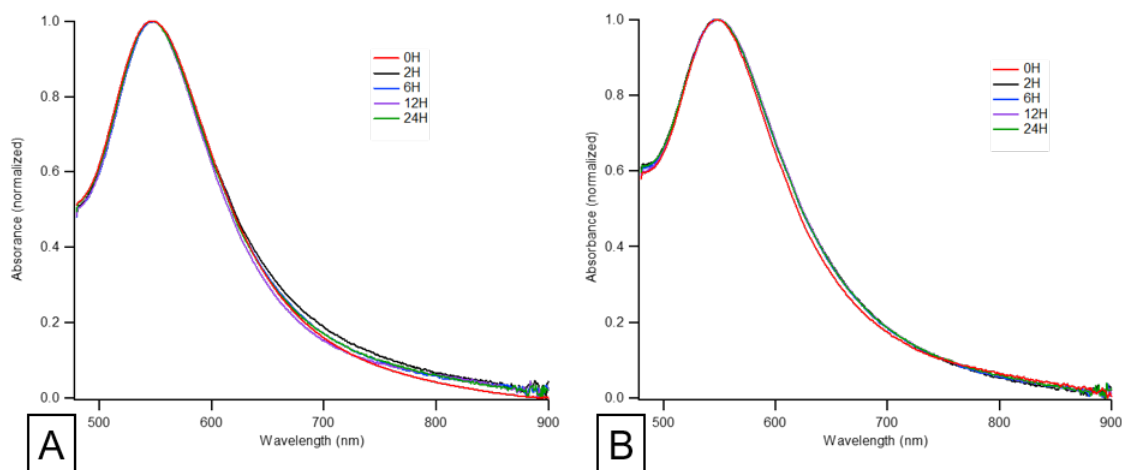


FIGURE 2.13 – Spectres d’absorption UV-Vis de la DOX IN dans l’eau (A) et dans un milieu complet (RPMI complété de 10% de SVF),(B) à différents temps d’incubation (0h, 2h, 6h et 24h) à 37°C et à une pression en CO_2 de 5%.

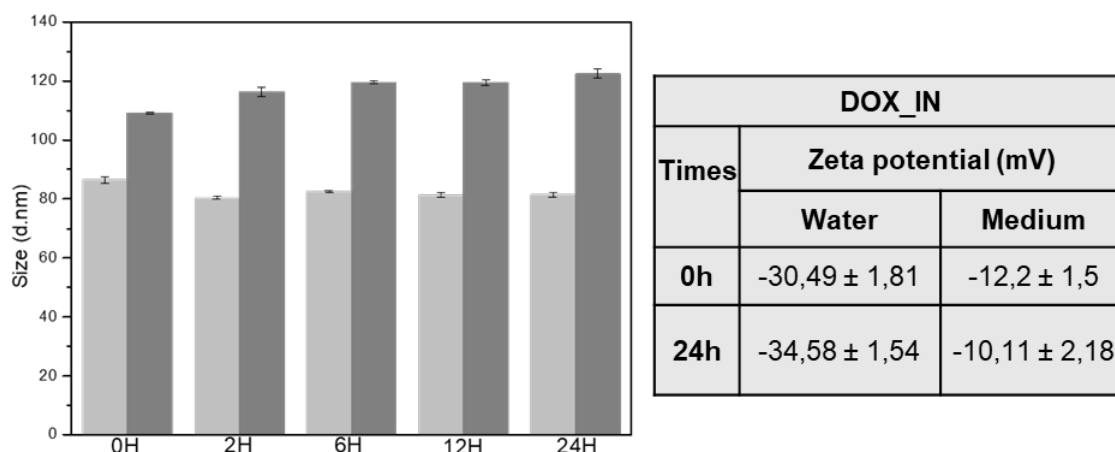


FIGURE 2.14 – Histogramme représentant le diamètre hydrodynamique (à gauche) de la DOX IN dans l’eau (en gris clair) et dans un milieu complet (RPMI supplémenté de 10% de SVF, en gris foncé) à différents temps d’incubation (0h, 2h, 6h et 24h) à 37°C et à une pression en CO_2 de 5%. A droite, tableau de valeur des potentiels zêta de la DOX IN dans les mêmes conditions à 0h et 24h.

De plus, une mesure du potentiel zêta a été réalisée afin de comprendre la stabilité de la DOX IN dans le milieu cellulaire. Tout d’abord lorsque l’on compare le potentiel zêta de la DOX IN dans l’eau et dans le milieu on voit qu’instantanément la charge augmente puisque l’on passe de -30 mV à -12 mV (Figure 2.14). Puis lorsque la DOX IN est incubée, la charge globale de la DOX IN reste stable à environ -12 mV .

Ainsi, il semblerait que la taille et la charge globale de la DOX IN n’évoluent pas avec le temps d’incubation, et restent plutôt stable après 24h, avec un diamètre hydrodynamique d’environ 120 nm et un potentiel zêta d’environ -12 mV .

Ce changement de taille et de charge globale de la DOX IN en présence du milieu, peut

être expliqué par la présence de protéines qui vont interagir avec la DOX IN.

Dans cette étude nous avons caractérisé et observé un léger élargissement de la bande plasmon dès contact des nanoparticules avec les protéines présentes dans le milieu cellulaire. Ceci s'est traduit par une augmentation de la taille hydrodynamique de la DOX IN. De plus les protéines adsorbées ont diminué la charge absolue de la DOX IN, mais les solutions sont restées stables comme en témoignent l'histogramme des tailles hydrodynamiques mesurées par DLS et l'absorbance UV-Vis après incubation. Cette stabilité des solutions colloïdales est due à la répulsion coulombienne entre les particules chargées et/ou à l'encombrement stérique des protéines adsorbées sur les nanoparticules [25].

Les premières interactions qui peuvent exister entre la nanoparticule et la couronne protéique et qui se forment très naturellement sont très importantes puisqu'elles vont pouvoir complètement influencer l'absorption cellulaire des nanoparticules, mais aussi leur efficacité et leur toxicité. Il est donc d'une importance primordiale de comprendre l'interaction délicate des protéines individuelles avec les nanoparticules.

2.3 Références bibliographique

1. Brown, J.R., 3 Adriamycin and Related Anthracycline Antibiotics, in Progress in Medicinal Chemistry, G.P. Ellis and G.B. West, Editors. 1978, Elsevier. p. 125-164.
2. Gallois, L., M. Fiallo, and A. Garnier-Suillerot, Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles : Circular dichroism study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1998. 1370(1) : p. 31-40.
3. Cutts, S.M., et al., The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life*, 2008. 57(2) : p. 73-81.
4. Hande, K.R., Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1998. 1400(1) : p. 173-184.
5. Potter, A.J. and P.S. Rabinovitch, The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res*, 2005. 572(1-2) : p. 27-44.
6. Volkova, M. and R. Russell, Anthracycline Cardiotoxicity : Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Current Cardiology Reviews*, 2011. 7(4) : p. 214-220.
7. Pardo, L.A. and W. Stühmer, The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2013. 14 : p. 39.
8. Hole, P., et al., Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). *J Nanopart Res*, 2013. 15 : p. 2101.
9. Spadavecchia, J., et al., Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer : from synthesis to proof-of-concept *in vitro* studies. *Int J Nanomedicine*, 2016. 11 : p. 791-822.
10. Boisselier, E. and D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine : preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*, 2009. 38(6) : p. 1759-82.
11. Li, C., et al., Au⁺-cetyltrimethylammonium bromide solution : A novel precursor for seed-mediated growth of gold nanoparticles in aqueous solution. *Nano Research*, 2013. 6(1) : p. 29-37.
12. Doane, T. and C. Burda, Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. 65(5) : p. 607-21.
13. Yamini, D., et al., Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014. 117 : p. 299-303.

14. Koenig, J.L. and A.C. Angood, Raman spectra of poly(ethylene glycols) in solution. *Journal of Polymer Science Part A-2 : Polymer Physics*, 1970. 8(10) : p. 1787-1796.
15. Das, G., et al., FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(10) : p. 991-5.
16. Szafraniec, E., et al., Spectroscopic studies of anthracyclines : Structural characterization and *in vitro* tracking. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2016. 169 : p. 152-60.
17. Ling, Y.H., et al., Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol Pharmacol*, 1996. 49(5) : p. 832-41.
18. Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig, At the acidic edge : emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(3) : p. 137-45.
19. Fukuda, M., Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, 1991. 266(32) : p. 21327-30.
20. Kundra, R. and S. Kornfeld, Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem*, 1999. 274(43) : p. 31039-46.
21. M B, B., et al., Metal Ion Complex -Potential Anticancer Drug- A Review. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2015. 4(8) : p. 59-66.
22. Muhammad, N. and Z. Guo, Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014. 19 : p. 144-153.
23. Nardon, C., G. Boscutti, and D. Fregona, Beyond platinum : gold complexes as anticancer agents. *Anticancer Res*, 2014. 34(1) : p. 487-92.
24. Ronconi, L., et al., Gold Dithiocarbamate Derivatives as Potential Antineoplastic Agents : Design, Spectroscopic Properties, and *in vitro* Antitumor Activity. *Inorganic Chemistry*, 2005. 44(6) : p. 1867-1881.
25. Treuel, L., et al., Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015. 6 : p. 857-873.

Chapitre 3

Etude de la couronne protéique par spectroscopie de corrélation

L'étude de l'interaction des nanoparticules d'or avec des protéines, formant la couronne protéique, attire une attention considérable depuis quelques années. En effet la compréhension de ces interactions permettrait d'appréhender le devenir des nanoparticules au sein d'une cellule ou encore d'un organisme. Actuellement, il existe plusieurs techniques permettant d'étudier ces interactions que ce soit de manière directe ou indirecte. Les méthodes directes analysent les protéines qui sont adsorbées à la surface des nanoparticules. Ces techniques demandent donc une étape de purification afin d'éliminer les protéines qui ne sont pas ou sont faiblement liées aux nanoparticules. Ces différentes techniques sont la spectrométrie de masse [1], le dichroïsme circulaire [2, 3], la RMN [4], l'électrophorèse SDS-page [5] etc. . .

Les techniques très utilisées pour la caractérisation des nanoparticules peuvent également être utilisées pour l'étude indirecte de la couronne protéique via les changements de propriétés des nanoparticules telles que la taille, la charge, l'absorbance, la fluorescence. Ces techniques sont la spectroscopie UV-visible [3, 5], la DLS [2, 5], la QCM [6, 7], ou encore la spectroscopie de corrélation [3, 8].

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'étude et la caractérisation de nanoparticules d'or avant et après l'adsorption de différentes molécules (PEG, thiophénol et enfin les protéines) par spectroscopie de corrélation de diffusion (ou Scattering Correlation Spectroscopy, SCS). En effet après une partie sur la théorie de la spectroscopie de corrélation, nous allons voir comment on peut appliquer la SCS sur des nanoparticules sphériques d'or citratées, qui sont très simples à synthétiser. Elles représenteront une référence, et seront comparées à des nanoparticules PEGylées. Le PEG est utilisé car il permet une meilleure stabilisation et une meilleure furtivité (comme nous l'avons vu dans le chapitre 1) des nanoparticules [9], mais aussi car les nanoparticules PEGy-

lées présente une plus faible toxicité comparées aux nanoparticules citratées [10]. Dans cette même partie, l'étude se fera non seulement pour ces deux chimies de surface, mais aussi pour deux formes de nanoparticules : des nanoparticules sphériques, qui sont très utilisées, notamment pour des applications thérapeutiques ou encore d'imageries cellulaires [11-13], et des nanofleurs, nanoparticules présentant des branches sur leur surface. La présence de telles branches permet une amélioration des propriétés optiques pour la thérapie photothermique ou encore l'imagerie cellulaire. Cependant, la présence de ces branches provoque une plus grande toxicité comparée à celle des nanosphères [10]. Par la suite une étude sur l'adsorption du thiophénol sur des nanoparticules sphériques et des nanoparticules présentant des ramifications sera décrite, afin de sonder la surface des nanoparticules, mais aussi l'interaction entre le thiophénol et l'or pour ces deux formes différentes. Enfin, une dernière étude sera consacrée à la couronne protéique qui se forme naturellement lorsque les nanoparticules interagissent avec des milieux biologiques. Pour cela, nous avons décidé d'étudier trois types de protéines (l'albumine, la glycoprotéine et la lysozyme) présentes dans le sang humain et qui sont amenées à modifier le devenir des nanoparticules.

Grâce à l'utilisation de la SCS, il sera possible d'obtenir d'une part le coefficient de diffusion des nanoparticules (D), avant et après l'adsorption des molécules sur les nanoparticules. D'autre part grâce à l'équation Stokes-Einstein, nous en déduirons le rayon hydrodynamique (R_h) qui va nous permettre via l'équation de Hill d'obtenir la constante de dissociation (K'), le nombre de molécules adsorbées à la surface des nanoparticules (N) et enfin, ce que l'on appelle la coopérativité de la liaison (n).

3.1 La spectroscopie de corrélation

La spectroscopie de corrélation est une technique très utilisée pour analyser les fluctuations temporelles de différents types de signaux optiques ou spectroscopiques tels que la fluorescence [14] (FCS¹), la luminescence [15] ou encore la diffusion [16] (dans le cas de la DLS² ou de la SCS). La DLS est une méthode très connue et très utilisée pour déterminer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, cependant cette technique ne permet pas de caractériser les nanoparticules à très faible concentration et ne donne aucune indication sur la concentration des nanoparticules. La SCS est une méthode qui a été utilisée récemment pour caractériser les nanoparticules. Son principe est similaire à celle de la technique FCS [17]. L'idée principale de la technique est d'analyser les fluctuations temporelles d'un signal optique émis par des molécules ou des particules individuelles diffusant dans un volume de détection très faible (de l'ordre du femtolitre (fL)) appelé

1. FCS : acronyme anglais de « Fluorescence Correlation Spectroscopy »
 2. DLS : acronyme anglais de « Dynamic Light Scattering »

le volume confocal. Ce volume effectif est essentiellement donné par la forte focalisation d'un laser générée par un objectif à immersion.

Si la concentration en particules est suffisamment faible (nM - pM), les particules n'interagissent pas les unes avec les autres, et le temps entre l'entrée de la particule et sa sortie respectent la distribution de Poisson, c'est-à-dire que chaque particule passant dans le volume confocal contribue au signal mesuré de façon significative ; ceci permet d'effectuer une analyse statistique de corrélation (voir le paragraphe ci-dessous) afin d'obtenir le nombre et le temps de diffusion des particules dans le volume confocal.

a. Aspect théorique de la spectroscopie de corrélation

La SCS est une excellente technique qui utilise un microscope pour extraire des informations dans la limite de la résolution optique classique. Cette technique utilise une méthode statistique qui analyse les fluctuations des signaux de diffusion. Ces fluctuations proviennent typiquement des mouvements browniens des particules traversant le volume confocal. La taille de ces particules détermine le temps moyen qu'elles passent dans le volume confocal. Un détecteur très sensible (en général des photodiodes à avalanche ou APD³) enregistre les photons émis par les particules dans le volume confocal. Les informations pertinentes sur la dynamique du système telles que le temps de diffusion, la taille des particules, le nombre de particules et la concentration peuvent être extraites en utilisant une fonction de corrélation. Cette dernière convertit le signal de fluctuation d'intensité en courbe de corrélation dont le principe général est exposé sur la Figure 3.1.

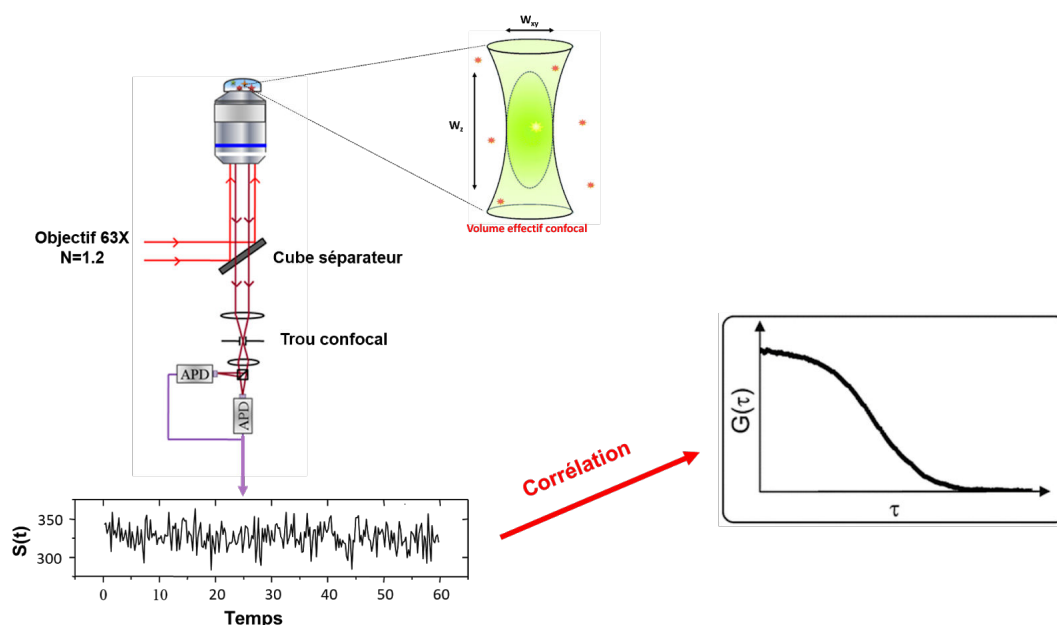


FIGURE 3.1 – Principe général de la spectroscopie de corrélation.

3. APD : acronyme anglais de « Avalanche Photo-Diode »

L'intensité en fonction du temps peut s'écrire de la manière suivante :

$$S(t) = \langle S(t) \rangle + \delta S(t) \quad (\text{Equation 3.1})$$

Où $\langle S(t) \rangle$ est l'intensité moyenne dans le temps et $\delta S(t)$ est la fluctuation de l'intensité par rapport à l'intensité moyenne au temps t . La fonction de corrélation est une mesure de la similarité d'un signal $S(t)$ avec le signal $S(t + \tau)$ qui est émis par les particules après un temps très court τ . En d'autres termes, l'intensité enregistrée à l'instant t est corrélée avec celle enregistrée à l'instant $t + \tau$. Si l'intensité du signal n'a pas changé considérablement au cours de cette période (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de décalage dans le temps), la corrélation est élevée. A l'inverse, si le signal est complètement différent (c'est-à-dire un décalage temporel important), la corrélation est faible.

On peut donc supposer que la fonction de corrélation est une fonction « mémoire » qui mesure la durée pendant laquelle un signal reste le même sur un intervalle de temps spécifique.

La fonction de corrélation $G(\tau)$ est définie comme [14] :

$$G(\tau) = \frac{\langle S(t) \cdot S(t + \tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta S(t) \cdot \delta S(t + \tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} \quad (\text{Equation 3.2})$$

Sachant que l'intensité du signal, $S(t)$, est proportionnelle à des paramètres physiques tels que :

- L'efficacité quantique : q ,
- La section efficace d'excitation des particules : σ_{ABS} ,
- La fonction d'efficacité de collection : CEF (\vec{r}), c'est-à-dire la fraction de lumière émise par une particule au point \vec{r} et collectée par le détecteur,
- L'intensité d'excitation à la position \vec{r} : $I(\vec{r})$,
- La concentration des particules à la position \vec{r} et au temps t : $C(\vec{r}, t)$

Il est possible d'injecter ces paramètres dans l'équation 3.2 [18, 19] et de réécrire la fonction de corrélation ($G(\tau)$) comme suit :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (\text{Equation 3.3})$$

Essentiellement trois informations importantes peuvent être extraites de la fonction de corrélation :

- Le nombre moyen de particules dans le volume de détection (N) à partir de l'amplitude de la courbe de corrélation au délai $\tau = 0s$, sachant que $G(0) = 1 + 1/N$ (figure 3.2).

- La taille du volume confocal (W_{xy} (distance radiale) et W_z (distance axiale)), que l'on peut trouver par exemple en effectuant des mesures de référence avec une molécule fluorescente ayant une constante de diffusion connue (Rhodamine, Alexa). Il existe un paramètre, que l'on appelle paramètre de structure, s ($s = \frac{W_{xy}}{W_z}$), qui permet de caractériser la forme du volume confocal.
- Le temps moyen nécessaire pour qu'une particule se déplace à travers le volume confocal (τ_D) qui permet de calculer son coefficient de diffusion (D) (figure 3.2).

En utilisant la relation $N = C \cdot V_{eff}$, la concentration locale C des molécules peut être déterminée. Les paramètres N , τ_D et s sont calculés en ajustant les mesures expérimentales des courbes de corrélation avec l'équation 3.3.

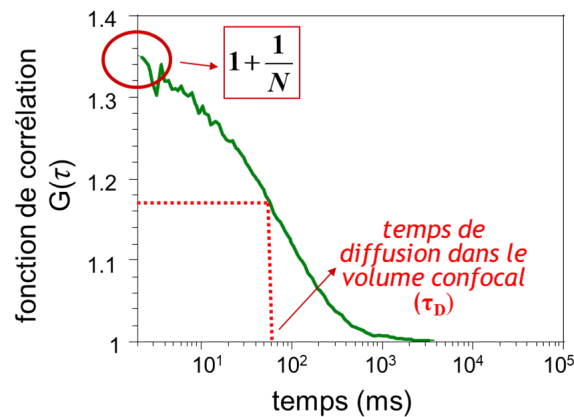


FIGURE 3.2 – Courbe de corrélation dont l'amplitude à $G(0)$ est inversement proportionnelle au nombre moyen de particules présent dans le volume effectif et la largeur à mi-hauteur correspond au temps de diffusion, τ_D .

La figure 3.3 montre que plus la concentration est élevée, plus le nombre de particules présentes au sein du volume confocal est grand, ce qui induit des fluctuations de signal très faibles et ainsi une réduction de la corrélation. C'est pourquoi la SCS est plutôt sensible aux faibles concentrations, il faut savoir que cette technique permet une détection allant jusqu'au picomolaire pour le cas des nanoparticules d'or [20].

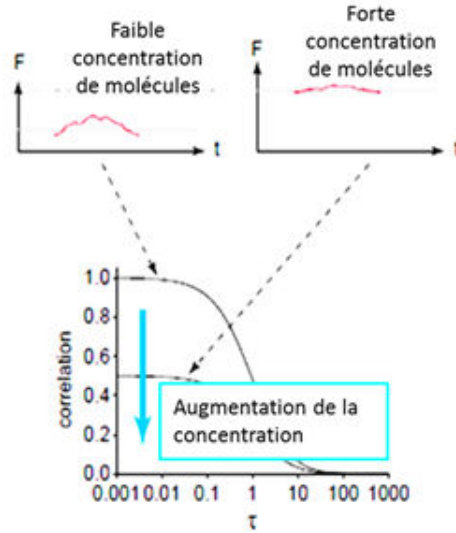


FIGURE 3.3 – Effet de la concentration sur les fluctuations d’intensité du signal et de la courbe de corrélation, d’après [21].

Le temps de diffusion est lié au coefficient de diffusion (D) d’une particule par l’équation suivante :

$$\tau_D = \frac{W_{xy}^2}{4D} \quad (\text{Equation 3.4})$$

La valeur du rayon hydrodynamique (R_h) peut alors être déduite de D en utilisant l’équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Equation 3.5})$$

où η est la viscosité du milieu environnant, T est la température et k est la constante de Boltzmann.

Sur la figure 3.4, on peut voir que le temps de diffusion τ_D est inversement proportionnel au coefficient de diffusion D . Le coefficient de diffusion étant inversement proportionnel à la taille de la particule, plus le rayon R_h augmente, plus le temps de diffusion τ_D de la particule augmente.

De plus, si le coefficient de diffusion est connu, la dimension transversale du volume effectif peut être extraite à partir de l’équation 3.4. Ainsi, le volume effectif peut être calculé en utilisant l’équation [19] :

$$V_{eff} = \pi^{3/2} W_{xy}^2 W_z \quad (\text{Equation 3.6})$$

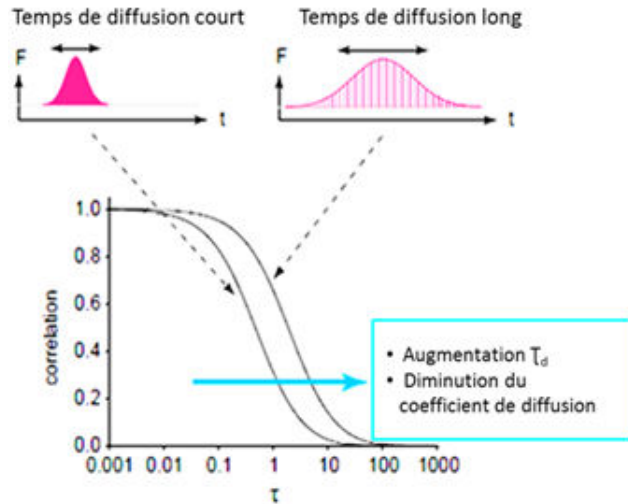


FIGURE 3.4 – Effet de la taille des particules traversant le volume effectif sur les fluctuations de signal et sur la courbe de corrélation, d’après [21].

Le volume confocal est un paramètre important de la spectroscopie de corrélation, puisqu’il permet d’obtenir le temps de diffusion (et donc indirectement le rayon hydrodynamique) d’un analyte. C’est pourquoi ce paramètre doit être convenablement calibré, en utilisant un échantillon de référence de taille connue ou de constante de diffusion connue. Pour ce faire, il existe deux méthodes permettant de mesurer les dimensions axiales et transversale du volume confocal effectif : (i) une mesure directe par la mesure de la PSF⁴, qui est l’image de la distribution d’intensité du point laser ou (ii) une mesure indirecte par mesure de la corrélation d’une solution fluorescente de concentration et de constante de diffusion connues [22, 23].

Dans le deuxième cas, les coefficients de diffusion de l’Alexa Fluor 532 ou l’Alexa Fluor 647 (suivant la longueur d’onde du laser utilisé) sont respectivement de $3,96$ et de $3,3 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ à température ambiante. En mesurant la fonction de corrélation correspondant à la diffusion de ces fluorophores, il est possible d’accéder aux valeurs de W_{xy} et W_z , grâce aux équations (3.3) et (3.4) et au paramètre de structure $s = W_z/W_{xy}$. Une fois que W_{xy} et W_z sont connues, le volume effectif, V_{eff} , peut être calculé avec l’équation 3.6. Dans le cas de la mesure de la PSF, des profils latéral et axial de billes fluorescentes de diamètre d’environ 170 nm sont enregistrés, puis déconvolués en prenant en compte la taille de la bille afin de remonter au profil gaussien du volume confocal et la détermination des valeurs W_{xy} et W_z [9, 24].

La figure ci-dessous montre les résultats permettant de mesurer le volume confocal, en utilisant les deux méthodes citées précédemment. On voit bien, que ces deux résultats sont en très bon accord dans la taille du volume confocal, puisque on obtient un volume

4. PSF : acronyme anglais de « Point Spread Function »

effectif d'environ $1fL$. Ces résultats ont été obtenus en utilisant le laser à 532 nm , mais le principe reste le même avec d'autres lasers, cependant le fluorophore utilisé doit avoir une bande d'absorption autour de la longueur d'onde du laser utilisé.

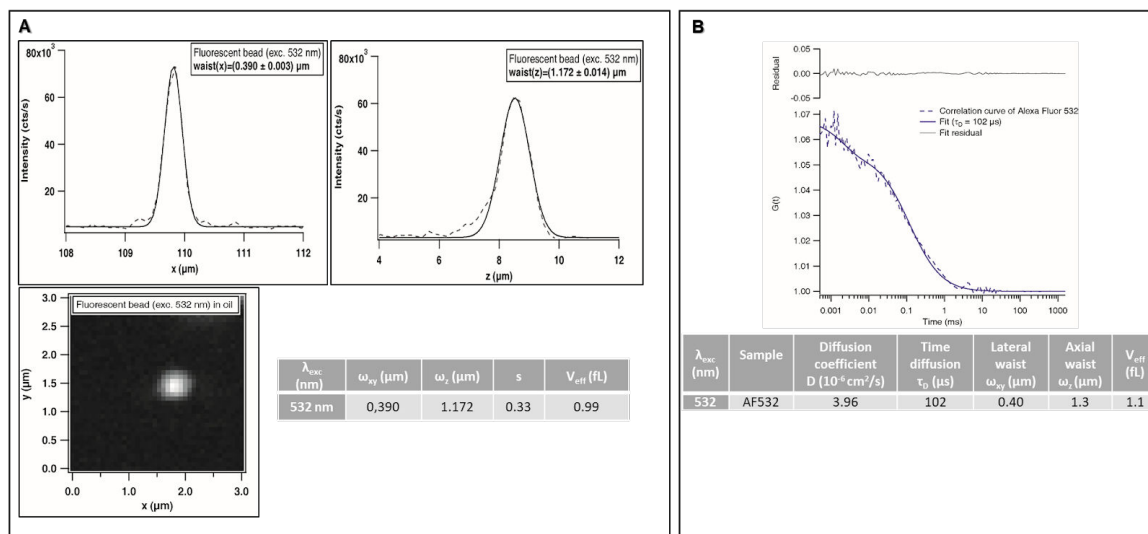


FIGURE 3.5 – (A) : Profils latéraux et axiaux d'une bille fluorescente avec un diamètre de 170 nm (en haut), image de la bille fluorescente et paramètres obtenus dans le volume confocal (en bas). (B) : Courbe de corrélation croisée de fluorescence des molécules d'AF532 libres. La courbe d'ajustement (réalisée à l'aide de l'équation 3.3) donne un temps de diffusion de $102\ \mu\text{s}$ (en haut). Paramètres utilisées et obtenus dans le volume confocal (en bas).

b. Montage optique de la spectroscopie de corrélation

Le montage expérimental de spectroscopie de corrélation utilisé a été assemblé et mis en place par le Dr Nadia Djaker [9, 25]. Ce système est illustré sur la figure 3.6. La source d'excitation provient de différents lasers continus de différentes longueurs d'onde allant du visible au proche IR : un laser à 488 nm (Cobolt MLDTM lasers), un laser à 532 nm (Optoélectronique, Royaume-Uni), un laser à 633 nm (Thorlabs, France) et un laser saphir-titane accordable de 750 à 950 nm (Coherent, USA). Le système est basé sur un microscope inversé (Nikon, Japon) combiné à un objectif à immersion à eau (x60) avec une ouverture numérique de 1,2. Le faisceau laser est élargi (de 2 à 8 mm) via un télescope afin de couvrir complètement la pupille d'entrée de l'objectif pour garantir une meilleure focalisation. Un miroir dichroïque (dans le cas de la FCS) ou un cube séparateur 50/50 (dans le cas de la SCS) est utilisé afin de réfléchir le faisceau d'excitation directement dans l'objectif de microscope qui permet sa focalisation dans la solution à analyser. La lumière émise (ou diffusée) par les molécules (ou particules) présentes dans la solution est collectée par le même objectif, transmise à travers le miroir dichroïque ou le cube séparateur et focalisée sur un trou confocal de taille allant de 30 à $50\ \mu\text{m}$ (selon le laser utilisé) et placé dans le plan image de l'objectif permettant de rejeter la lumière

émise en dehors du plan focal. Par la suite, le signal est enregistré par deux photodiodes à avalanche. Les détecteurs sont reliés à un corrélateur multicanal (ALV-Laser GmbH, Langen, Germany) qui est connecté à un ordinateur pour analyser les données via le logiciel LabView (National Instruments, Etats-Unis).

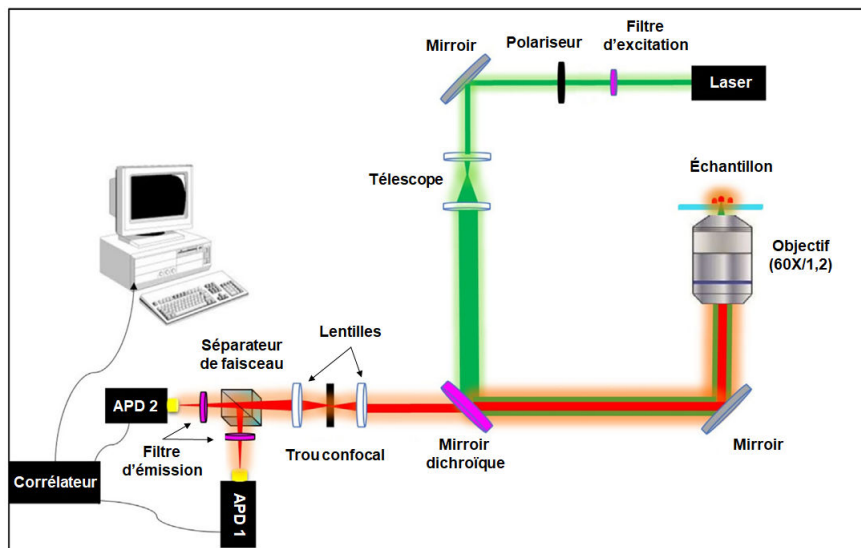


FIGURE 3.6 – Montage de la spectroscopie de corrélation utilisée.

3.2 Caractérisation de nanoparticules d'or par SCS

La technique SCS a été utilisée au sein du laboratoire, dans un premier temps, afin de caractériser des nanoparticules d'or de taille (diamètres de 20, 30 et 50 nm), de chimie de surface (citrate et mPEG-SH) et de forme (sphère et fleur) différentes. Les protocoles de synthèse des différentes nanoparticules d'or sont détaillés dans l'article [9]. Par la suite, ces différentes nanoparticules vont être nommées 20-a-GNS pour les nanoparticules sphériques citratés de 20 nm de diamètre, 30-a-GNS pour les 30 nm de diamètre, 50-a-GNS pour les 50 nm de diamètre et a-GNF pour les nanoparticules en forme de fleur. Pour le cas des nanoparticules PEGylées, le « a » sera remplacé par « PEG ». Nous avons utilisé un mPEG-SH de 5 kDa , la présence du thiol, qui a une plus forte affinité avec l'or, va permettre l'échange entre le citrate et le PEG. De plus, ce PEG va permettre une meilleure stabilisation des nanoparticules comparée au citratés [9].

Ces nanoparticules ont été caractérisées par SCS, mais aussi par MET, DLS, potentiel zêta et spectroscopie UV-Vis dont les paramètres utilisés sont détaillés dans une étude qui a été préalablement publiée [9].

Tout d'abord les nanoparticules ont toutes montré une bande de résonance du plasmon de surface localisé (ou Localised Surface Plasmon Resonance, LSPR) sur les spectres

d'extinction. En effet la position de cette bande se situe à 522, 526 et 535 nm pour les 20-a-GNS, les 30-a-GNS et les 50-a-GNS respectivement comme illustrées sur la figure 3.7(e). Pour le cas des a-GNF, la bande LSPR est décalée vers de plus grandes longueurs d'onde à 605 nm et est plus large que les bandes LSPR des GNS. Cette position et cet élargissement de la bande est la conséquence de l'anisotropie des particules qui présentent plusieurs pointes à leur surface [26]. L'échange de ligand (le citrate par le PEG) a aussi été confirmé par spectroscopie UV-Vis, puisqu'un léger décalage de la bande LSPR est observé (figure 3.7(e)). En effet pour les 50-PEG-GNS la bande se décale à 537 nm et à 620 nm pour les a-GNFs.

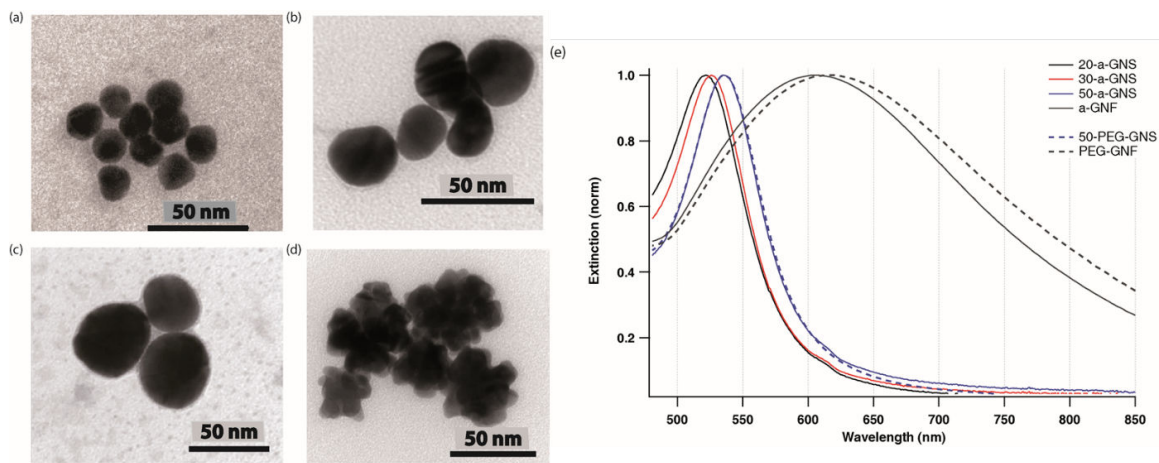


FIGURE 3.7 – Images MET des nanoparticules d'or : (a) 20-a-GNS, (b) 30-a-GNS, (c) 50-a-GNS, (d) a-GNF (e) Spectres d'extinction des nanoparticules d'or avec (traits en pointillés) et sans (trait plein) PEG.

Les images MET montrent que les nanoparticules sphériques ont une forme plutôt ronde et une surface lisse avec une distribution en taille assez étroite (Figures 3.7 (a), (b), (c)), alors que les GNFs montrent bien la présence de branches à la surface des particules (Figure 3.7 (d)). Une analyse des images des GNFs a été réalisée avec le logiciel Image J afin de déterminer les tailles des GNFs. Cette analyse a donné un diamètre moyen de $42 \pm 6 \text{ nm}$ avec un noyau de diamètre de $36 \pm 5 \text{ nm}$ et des branches d'environ $7 \pm 2 \text{ nm}$. Les diamètres des nanoparticules ont été confirmés par des mesures de DLS résumées dans le tableau 3.1. Ces valeurs montrent une plus grande taille des nanoparticules PEGylées en raison de l'épaisseur du PEG autour des particules, confirmant les résultats obtenus en spectroscopie UV-Vis (Figure 3.7 e). Cela confirme bien l'échange de chimie de surface et indique une épaisseur de PEG autour des 50-PEG-GNS d'environ $5 \pm 3 \text{ nm}$ (tableau 3.1).

L'échange de ligands autour des particules a aussi été confirmé par potentiel zêta puisque un déplacement du potentiel de -14 à -5 mV pour les GNS de 50 nm et de -10 à -5 mV pour les GNFs. L'échange par du PEG semble donc diminuer la charge de surface.

La SCS a été utilisée pour caractériser le rayon hydrodynamique des nanoparticules d'or. Cette caractérisation a été réalisée pour une longueur d'onde d'excitation proche de celle de la LSPR des nanoparticules, c'est-à-dire 532 nm pour les GNS et 633 nm pour les GNF. La figure 3.8 montre la moyenne de 5 courbes de corrélation mesurées pour les nanoparticules, (le temps d'acquisition de chaque courbe a été fixé à 60 secondes).

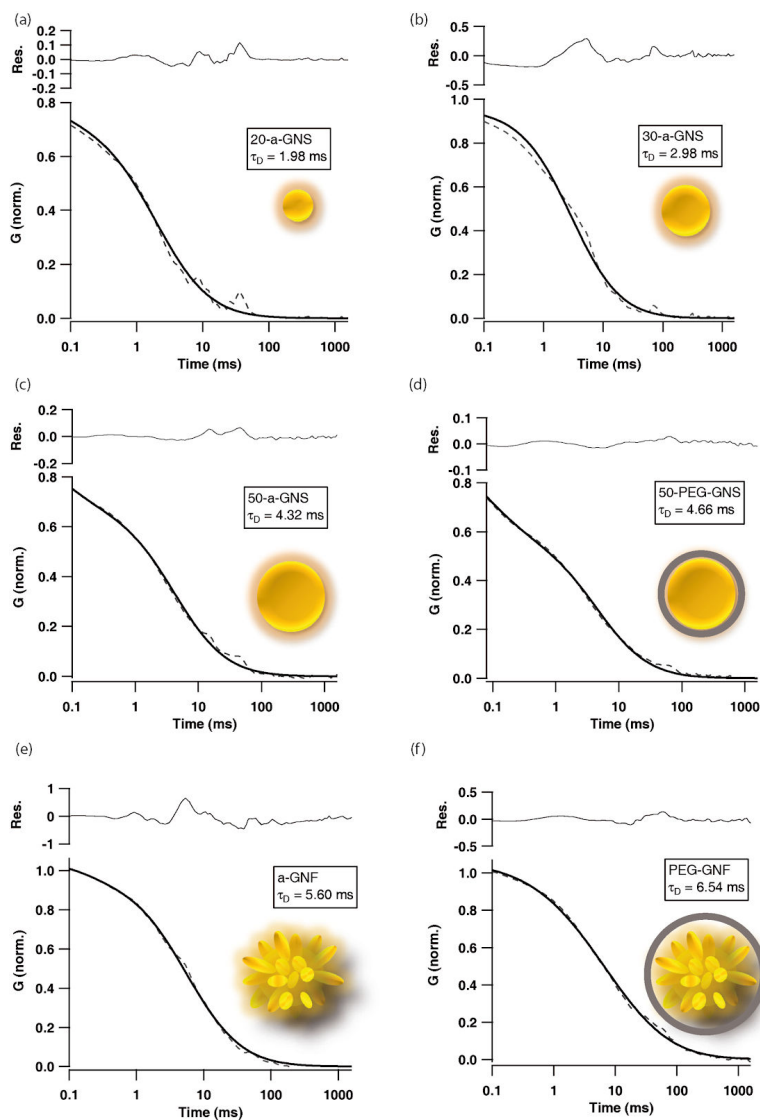


FIGURE 3.8 – Courbes de corrélation normalisées (traits en pointillés) et leurs ajustements suivant l'équation 3.3 de la lumière diffusée par les GNS excitées à 532 nm (a, b, c et d) et les GNF excitées à 633 nm (e et f).

Chaque courbe a été ajustée en utilisant l'équation 3.3 afin d'en déduire le τ_D pour chaque nanoparticule. Le rayon hydrodynamique qui dépend directement du τ_D a été calculé pour toutes les nanoparticules en utilisant les équations 3.4 et 3.5, et les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 3.1.

Ainsi, dans le cas des 20-a-GNS, un R_h de $10,8 \pm 0,2\text{ nm}$ a été trouvé. L'incertitude sur

la taille est due à l'hétérogénéité de l'échantillon puisque l'analyse par corrélation est très sensible à l'homogénéité des nanoparticules [15, 20]. Lorsque la taille de la nanoparticule augmente, le temps de diffusion augmente ce qui conduit à un rayon hydrodynamique de $16,3 \pm 0,2 \text{ nm}$ pour 30-a-GNS et $23,5 \pm 0,2 \text{ nm}$ pour 50-a-GNS. Après l'échange des ligands de surface, le R_h est passé de $23,5$ à $25,5 \text{ nm}$, cette augmentation du R_h de 2 nm correspond à l'épaisseur de la couche de PEG présente autour des 50-GNS.

De la même manière que pour les GNS, le R_h des GNF a été déterminé avant et après changement de ligand de surface. Les a-GNF présentaient un R_h de $23,0 \pm 0,2 \text{ nm}$ puis après addition du PEG, le R_h est passé à $26,8 \pm 0,2 \text{ nm}$ soit une augmentation de $3,8 \text{ nm}$ correspondant à la couche du PEG.

Ainsi, les R_h obtenus par SCS sont en excellent accord avec ceux mesurés en DLS, mais avec une précision supérieure puisque les incertitudes sont très faibles par rapport à celle de la DLS.

Particules	Forme	Chimie de surface	LSPR (nm)	Potentiel ζ mV (\pm SD)	Diamètre par DLS nm (\pm SD)	Diamètre par SCS nm (\pm SD)
20-a-GNS	Sphère	Citrate	522	-40.3 ± 1.7	21.1 ± 2.1	21.6 ± 0.4
30-a-GNS	Sphère	Citrate	526	-25.1 ± 1.9	32.1 ± 3.3	32.6 ± 0.4
50-a-GNS	Sphère	Ascorbate	535	-14 ± 0	47.9 ± 5.2	47.0 ± 0.4
50-PEG-GNS	Sphère	PEG	537	-5 ± 0	57.8 ± 5.2	51.0 ± 0.4
a-GNF	Fleur	Ascorbate	605	-9.08 ± 0.8	46.7 ± 6.5	46.0 ± 0.4
PEG-GNF	Fleur	PEG	620	-4.65 ± 0	58.1 ± 6.5	53.6 ± 0.4

TABLE 3.1 – Caractérisation des nanoparticules d'or par spectroscopie UV-Vis, Potentiel zêta, DLS et SCS.

Il est très important de noter qu'il existe ce que l'on appelle l'effet de piégeage optique qui est due à la focalisation du laser sur les particules et qui permet de maintenir ou déplacer les particules et donc qui pourrait modifier les constantes de diffusion des particules [27]. Cependant, dans notre cas, l'effet de piégeage optique est négligeable sur les mesures des R_h puisque la puissance laser est de seulement $10 \mu W$ et ne permet pas la création d'un piège optique.

De plus, la puissance laser pourrait induire un échauffement des nanoparticules modifiant alors la viscosité de la solution colloïdale et donc la constante de diffusion (puisque d'après la relation de Stokes-Einstein, la constante de diffusion est dépendante de la viscosité du milieu). Cependant, en considérant les valeurs estimées pour l'augmentation de tempéra-

ture à la surface des nanoparticules pour une puissance laser de $10 \mu W$, le changement de la viscosité du milieu, qui est dans notre cas l'eau, est insignifiant et ne permet pas une modification significative du temps de diffusion des particules (Voir l'annexe de l'article [9]).

Ainsi, nous avons pu montrer qu'en analysant le signal de la diffusion des nanoparticules par SCS, il est possible de remonter aux rayons hydrodynamiques des particules avec une plus grande précision que la DLS. Ce qui en fait une technique très performante pour l'analyse de la taille des particules (avec une grande précision). C'est pourquoi cette technique sera utilisée par la suite pour étudier l'adsorption de molécule simple, le thiophénol, puis de molécules plus complexe, des protéines.

3.3 Etude de l'adsorption d'une molécule simple, le thiophénol, sur des nanoparticules d'or

L'objectif de cette étude est d'appréhender le mécanisme d'interaction biophysique entre une molécule d'intérêt et les nanoparticules d'or selon leur forme et d'estimer le gain en surface de fonctionnalisation sur une forme plus complexe de nanoparticule.

Le thiophénol a été choisi comme molécule modèle en raison de la forte affinité des thiols à former des liaisons covalentes avec la surface des nanoparticules d'or, mais aussi car les thiols aromatiques produisent de très bons spectres Raman [28].

Dans cette étude nous avons combiné plusieurs techniques spectroscopiques pour apporter une vision complète de l'interaction du thiophénol avec la surface des nanoparticules d'or ayant une surface simple, sphérique (GNS) et une surface plus complexe, oursin (GNU).

3.3.1 Matériels et méthodes

En raison de la faible solubilité du thiophénol dans l'eau, des solutions mères ont été préparées dans l'éthanol puis mélangé à de l'eau pour avoir un ratio final éthanol/eau de 20%/80%. Les deux types de nanoparticules (GNS et GNU) ont été utilisés à la même concentration puis incubés dans différentes concentrations de thiophénol allant de 100 nM à 1 M pendant 24h. Par la suite, les nanoparticules ont été centrifugées et lavées 3 fois avec de l'eau ultra pure ($10\,000 \text{ rpm}$ pendant 10 minutes) afin d'éliminer l'excès de thiophénol. Une concentration de 10^{13} GNPs/L a été mesurée pour les deux types de nanoparticules, par spectroscopie UV-Vis.

Les nanoparticules d'or sphérique et oursin ont été obtenues chez Sigma-Aldrich avec un diamètre nominal de 50 nm et 80 nm respectivement.

Les concentrations en nanoparticules ont été obtenues en analysant les spectres d'extinction optiques donnés par un spectromètre UV-visible (Kontron Instr. France) sur une gamme spectrale allant de 400 à 800 nm . Les mesures de potentiel zêta des nanoparticules ont été réalisées en utilisant un Zetasizer Nano-ZS de chez Malvern. Les spectres Raman ont été obtenus en utilisant un spectromètre Xplora de chez Horiba Scientific, sur une gamme spectrale allant de 400 à 1800 cm^{-1} . La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 660 nm pour une puissance de 20 mW . Les spectres Raman ont été enregistrés avec une résolution spectrale de 3 cm^{-1} , un temps d'acquisition de 60 secondes et la ligne de base a été corrigée en utilisant le logiciel LabSpec.

Les expériences SCS ont été réalisées sur le montage décrit précédemment. Le faisceau excitateur est fourni par un laser He-Ne à 633 nm avec une puissance d'excitation de 10 μW afin d'éviter l'effet du piégeage optique [27]. Ce faisceau est par la suite polarisé circulairement à l'aide d'une lame quart d'onde, puis traverse un objectif d'immersion à eau de grossissement X60 et d'ouverture numérique de 1,2. La lumière diffusée est collectée par le même objectif et redirigée vers un trou confocal de 50 μm de diamètre. Des densités optiques ont été placées devant les détecteurs pour enregistrer suffisamment de signal sans saturer les détecteurs. Le signal a ensuite été enregistré par deux photo-détecteurs à avalanche et la corrélation croisée du signal a été réalisée par un corrélateur ALV7004. Chaque mesure SCS individuelle a été obtenue en faisant la moyenne de 5 mesures d'une durée de 60 secondes. Chaque échantillon a été mesuré au moins cinq fois pour obtenir les valeurs moyennes et les erreurs correspondantes.

3.3.2 Résultats et discussion

Les GNS et GNU ont été caractérisées par spectroscopie UV-Vis (figure 3.9) et montrent respectivement une bande LSPR à 534 et 624 nm . Ces résultats sont en bon accord avec les diamètres des nanoparticules et les spécifications technique du produit. Lorsque les nanoparticules sont incubées avec une solution de thiophénol, on observe un léger décalage vers le rouge de la position de la LSPR (Figure 3.9). Ce décalage confirme bien l'adsorption du thiophénol sur les nanoparticules. Pour une concentration de 1 mM en thiophénol, les GNS montrent un décalage de 2 nm alors que les GNU présentent un décalage de 6 nm . Lorsque l'on augmente la concentration en thiophénol à 1 M , les GNS ne montrent aucun changement de la bande LSPR alors que les GNU montrent un décalage vers le rouge de 8 nm .

L'adsorption du thiophénol a également été suivie en mesurant la charge de surface des nanoparticules par Zetasizer dont les valeurs sont présentées dans le tableau de la figure 3.9. Un changement du potentiel zêta a été observé lorsque les nanoparticules ont été incubées avec différentes concentrations de thiophénol. Dans le cas des GNS, le potentiel zêta augmente de 25% puisqu'il passe de -40 à -30 mV . Dans le cas des GNU, le potentiel

zêta augmente de 18 %, puisqu'il passe de -44 à -36 mV pour une concentration de 1 mM en thiophénol alors qu'à une concentration de 1 M en thiophénol, le potentiel zêta augmente de 70% puisqu'il atteint -13 mV .

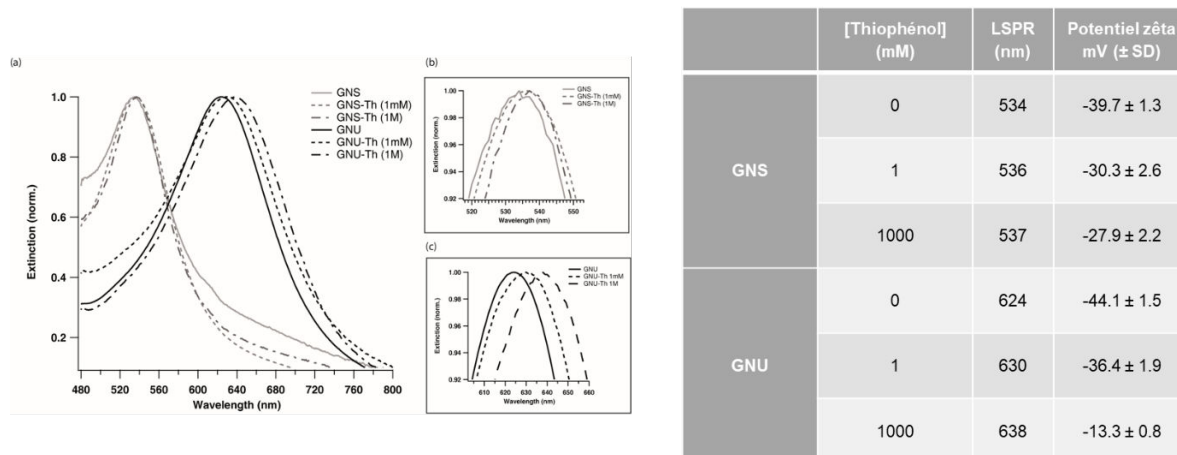


FIGURE 3.9 – A gauche : Spectres d’extinction des GNS (en gris) et des GNU (en noir) avant (lignes pleines) et après incubation dans une solution de thiophénol à 1 mM (lignes en pointillées) et 1 M (lignes en traits discontinus) (a). Zoom des bandes d’extinction des GNS (b) et des GNU (c). A droite : Caractérisation des nanoparticules d’or par spectroscopie UV-visible et Zetasizer.

Ainsi, comme on peut le voir sur la figure 3.9, à une concentration en thiophénol de 1 mM , on observe un décalage de la position de la LSPR et du potentiel zêta pour les deux cas, GNS et GNU. A 1 M en thiophénol, aucun autre déplacement n’a été observé pour le cas des GNS indiquant que la surface des GNS est saturée. En ce qui concerne les GNU, on observe encore un déplacement de la bande LSPR, mais aussi du potentiel zêta qui est non négligeable. Ceci est dû à une augmentation du nombre de molécules de thiophénol à la surface des GNU. En effet l’adsorption du thiophénol sur les GNU se poursuit même à plus haute concentration. Cette deuxième phase que l’on observe à 1 M pourrait être due à la présence de rugosités qui demandent donc plus de molécules de thiophénol que pour les sphères, et qui provoquent donc un déplacement de la bande LSPR et une augmentation du potentiel zêta.

Ces nanoparticules d’or ont été caractérisées par spectroscopie Raman dont les spectres Raman et SERS du thiophénol sont présentés sur la figure 3.10. En absence des nanoparticules, le signal Raman du thiophénol n’est pas observable même à plus forte concentration [29]. En effet, le spectre Raman de la solution n’est autre que l’addition des spectres de l’éthanol et de l’eau (Figure 3.10). Les spectres SERS du thiophénol adsorbé sur les deux types de nanoparticules (GNS et GNU) présentés sur la figure 3.10 montrent les bandes spécifiques du thiophénol notamment à 685 , 992 , 1015 , 1066 , et 1559 cm^{-1} , qui sont absents dans le spectre des nanoparticules nues (spectre en rouge). Il est à noter que sur

cette figure, seul le spectre des GNS est présenté, mais il est totalement similaire à celui des GNU.

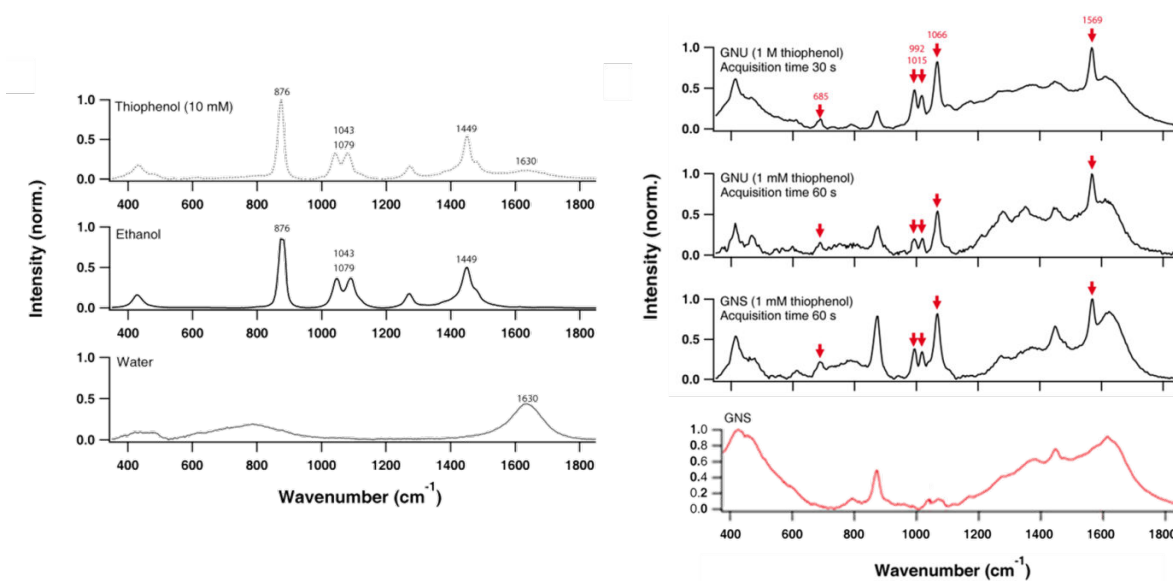


FIGURE 3.10 – Spectres Raman d’une solution de thiophénol à 10 *mM* dans un mélange d’éthanol et d’eau (80%/20%), de l’éthanol et de l’eau pure (à gauche). Spectres SERS du thiophénol à 1 *mM* incubé avec du GNS et du GNU et du thiophénol à 1 *M* incubé avec du GNU, et en rouge le spectre Raman des nanoparticules (à droite).

L’attribution de ces différentes bandes est donnée dans le tableau 3.2 et comparée à la littérature [30]. L’intensité des bandes SERS du thiophénol augmente avec la concentration en thiophénol dans les deux cas GNS et GNU.

Mode	Expérimental (cm ⁻¹)	Rapporté dans [16] (cm ⁻¹)
Déformation hors du plan du benzene	685	689
Déformation hors du plan du benzene et du groupement C-H	992	991
Déformation dans le plan du benzène et Elongation asymétrique du groupement C-C	1015	1018
Elongation asymétrique du groupement C-C	1066	1070
Elongation asymétrique du groupement C-C	1569	1568

TABLE 3.2 – Attribution expérimentale des bandes principales SERS du thiophénol en comparaison avec la bibliographie.

Afin de comparer les signaux SERS pour le cas des GNS et des GNU, les bandes spécifiques du thiophénol ont été intégrées en utilisant le logiciel LabSpec pour chaque concentration et les résultats sont présentés sur la figure 3.11 (a).

Dans le cas du GNS, la saturation ($I_{SERS-max}$) en thiophénol est atteinte à une concentration de 1 mM , alors que pour le cas des GNU, l'adsorption du thiophénol se fait en deux étapes. Une première saturation est observée à 1 mM comme pour le cas des GNS puis une seconde étape de saturation commence à 100 mM jusqu'à au moins 1 M en thiophénol. La dépendance de l'intensité SERS à la concentration en thiophénol a été modélisée par l'équation de Hill. Pour cela, les courbes d'intensité Raman ont été ajustées en utilisant l'équation de Hill :

$$I_{SERS} = \frac{I_{SERS-max} - I_{min}}{1 + \left(\frac{C_T}{C}\right)^n} \quad (\text{Equation 3.7})$$

où $I_{SERS-max}$ et I_{min} sont respectivement les intensités SERS maximale et minimale obtenues pour chaque étape de fonctionnalisation. C_T correspond à la concentration de transition au point médian, soit la concentration en thiophénol qui permet de couvrir la moitié de la surface des nanoparticules. Le coefficient de Hill (n), contrôle la raideur de la courbe et caractérise la coopérativité de la liaison thiophénol-or. Les paramètres présentés dans le tableau de la figure 3.11 montrent que la coopérativité de liaison est légèrement supérieure dans le cas des GNU par rapport aux GNS. L'interaction entre le thiophénol et les nanoparticules d'or semble être favorisée pour le cas des nanoparticules de formes complexes. Ceci peut être expliqué par la présence de rayons de courbures locaux à la surface des GNU qui augmenteraient la réactivité des atomes d'or [31]. La concentration de transition au point médian est similaire pour le cas des GNS et des GNU pour une concentration en thiophénol inférieure à 1 mM . Lorsque la concentration en thiophénol est supérieure à 1 mM , la seconde étape de saturation présente une concentration de transition au point médian proche de la mole.

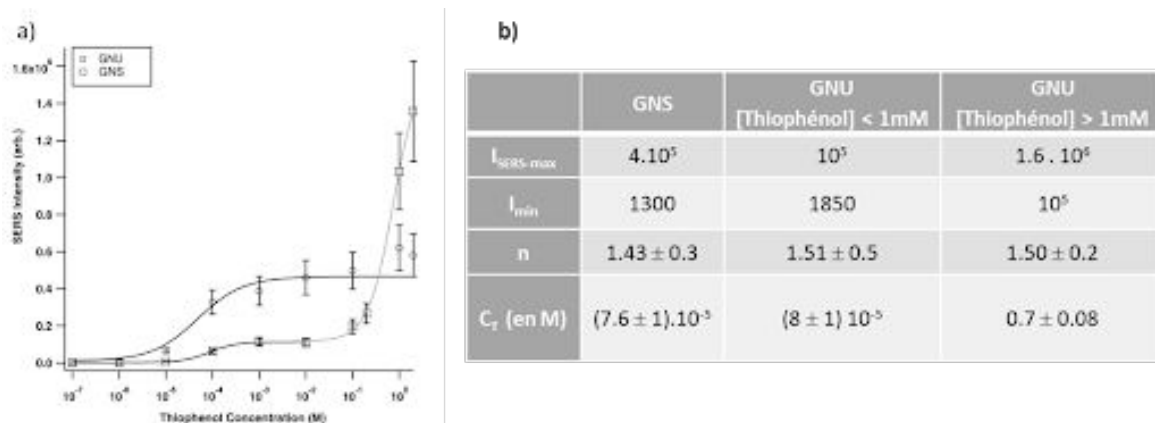


FIGURE 3.11 – Intensités SERS intégrées à partir des spectres Raman expérimentaux pour les bandes spécifiques du thiophénol (685, 992, 1015, 1066 et 1569 cm^{-1}) dans le cas des GNS et des GNU et ajustées à partir de l'équation 3.7 (a). Paramètres de l'équation de Hill obtenus à partir des courbes d'intensité Raman ci-contre (b).

Il est important de noter que lorsque les nanoparticules d'or ont été incubées à 1 mM ,

le signal SERS des GNS est quatre fois supérieur à celui des GNU, alors qu'on pourrait supposer que les branches des GNU devraient fournir un signal SERS largement supérieur du fait de l'effet de pointe [32]. Ainsi, le signal SERS fournit par les GNU, à une concentration de 1 *mM* de thiophénol, proviendrait du cœur des GNU et non des branches. La première phase de saturation proviendrait donc de l'adsorption du thiophénol au niveau du cœur des GNU, et cette phase de saturation se fait à 1 *mM*.

A 1 *M* en thiophénol, les GNU montrent un signal SERS largement plus fort que les GNS (près d'un ordre de grandeur). Cette augmentation du signal SERS peut être due à l'adsorption du thiophénol sur les branches des GNU, les branches fournissent donc une amélioration Raman de près de dix fois plus élevée que le cœur des GNU.

Le greffage du thiophénol ne se fait donc pas de manière homogène sur toute la surface, mais en deux temps distincts. Dans une première étape, le thiophénol est greffé au cœur de la surface des GNU, c'est-à-dire entre les branches, puis dans un deuxième temps, le greffage se produit sur les branches des GNU.

Pour comprendre ces deux étapes de greffage, un calcul théorique de la densité en thiophénol présent à la surface des nanoparticules a été réalisé pour trois tailles de GNS différentes (figure 3.12). La densité en thiophénol est calculée en prenant en compte la taille des nanoparticules et les différentes concentrations en thiophénol à partir de l'équation suivante :

$$Densit\ du\ thiophnol\ (thiophnol/nm^2) = \frac{[thiophnol] \cdot N_A}{[GNS] \cdot Surface(GNS)} \quad (\text{Equation 3.8})$$

où N_A est la constante d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), la concentration en GNS, $[GNS]$, est d'environ 10^{13} GNS/L et la surface des GNS est de $4\pi r^2$ (avec r : rayon des GNS). Les calculs ont été faits pour trois tailles de GNS : 50 *nm*, 80 *nm* et 1,6 μm de diamètre. La figure 3.12 montre que la densité en thiophénol calculée pour une concentration de 1 *mM* (ligne verticale en pointillée) est d'environ $2 \cdot 10^3 \text{ molcules/nm}^2$ pour une GNS de 50 *nm* et de $8 \cdot 10^2 \text{ molcules/nm}^2$ pour une GNS de 80 *nm*. La densité en thiophénol est alors plus faible à la surface des GNU qu'à la surface des GNS, ce qui pourrait expliquer le signal Raman plus bas pour les GNU à une concentration de 1 *mM*. Si l'on suppose que la saturation en surface est atteinte pour une densité de $2 \cdot 10^3 \text{ molcules/nm}^2$ comme pour le cas des GNS, on peut estimer la surface équivalente des GNU pour une concentration en thiophénol de 1 *M*. La figure 3.12 montre que la saturation de la surface correspondant à une densité de thiophénol de $2 \cdot 10^3 \text{ molcules/nm}^2$ (ligne horizontale en pointillée) est atteinte à 1 *M* de concentration en thiophénol pour un GNS de 1,6 μm de diamètre. Dans ce cas, on peut dire que la surface des GNU est comparable à la surface d'une GNS de 1,6 μm de diamètre lorsque l'on tient compte des branches.

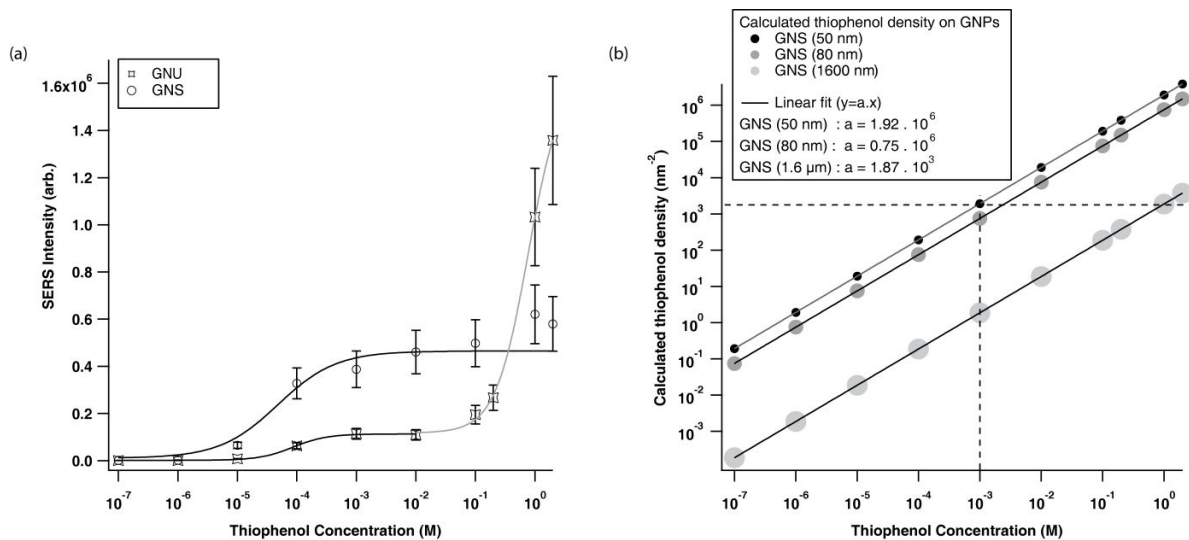


FIGURE 3.12 – Densité en thiophénol calculée sur la surface des GNS de 50, 80 et 1600 nm, à partir de l'équation 3.8.

En utilisant la SCS, nous avons analysé la variation du rayon hydrodynamique des nanoparticules d'or avant et après adsorption du thiophénol. Pour cela, des courbes de corrélation croisée ont été enregistrées pour les GNS et les GNU, incubées dans 0, 1 et 1000 mM de thiophénol pendant 24h. Les courbes de corrélation ont été normalisées à 1 (Figure 3.13) pour faciliter la comparaison du temps de diffusion dans les trois conditions.

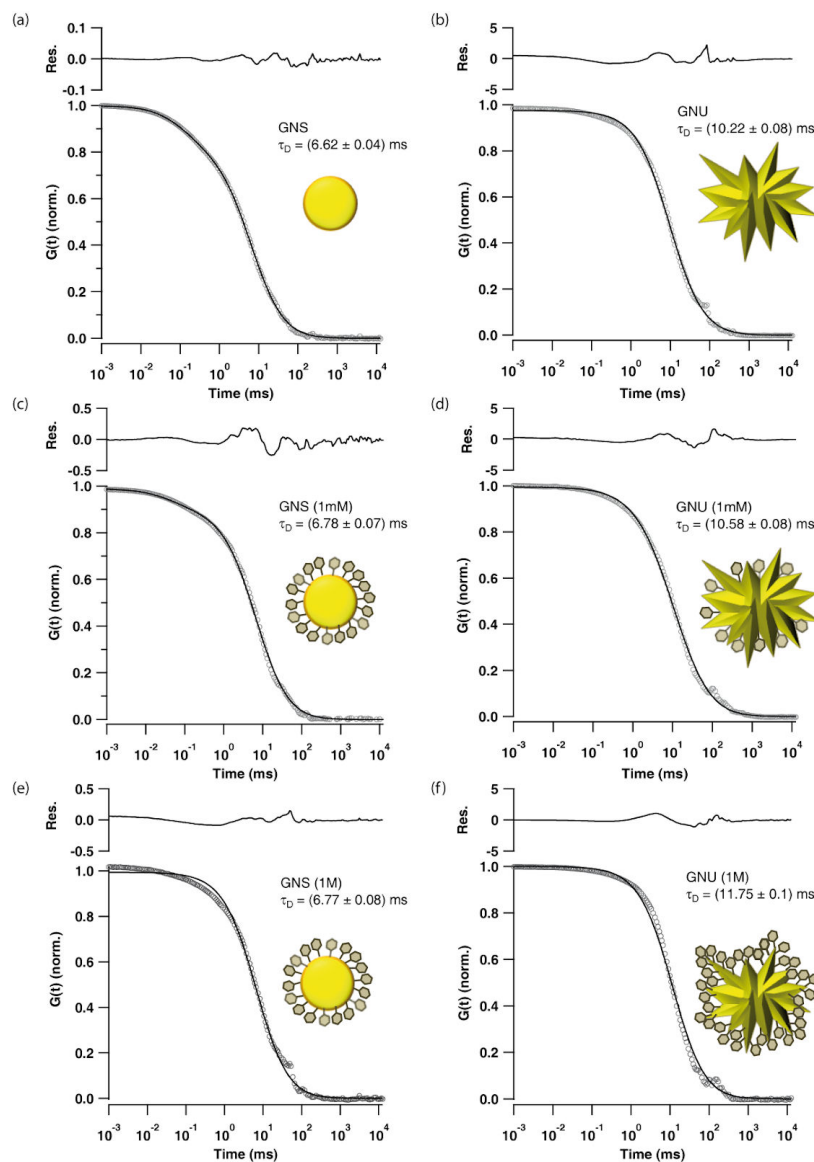


FIGURE 3.13 – Courbes SCS normalisées (cercle) et leurs ajustements avec l'équation 3.3 (lignes) des nanoparticules nues (a, b), incubées dans 1 *mM* de solution de thiophénol (c, d), et incubées dans 1 *M* de solution de thiophénol (e, f).

Le temps de diffusion (τ_D) a été déterminé pour chaque nanoparticule en ajustant la courbe avec l'équation 3.3, puis le R_h des nanoparticules a été calculé pour chaque cas en utilisant les équations 3.4 et 3.5. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3.3 ci-dessous.

	[Thiophenol] (mM)	τ_D (ms)	R_h by SCS nm (± 0.2)
GNS	0	6.63 ± 0.04	25.6
	1	6.78 ± 0.07	26.2
	1000	6.77 ± 0.08	26.1
GNU	0	10.22 ± 0.08	39.4
	1	10.58 ± 0.08	40.9
	1000	11.75 ± 0.1	45.3

TABLE 3.3 – Caractérisation des nanoparticules d'or par SCS.

Sans thiophénol, les GNS montrent un R_h de $25,6 \pm 0,2$ nm, alors que les GNU ont un R_h de $39,4 \pm 0,2$ nm. Il faut savoir que le rayon hydrodynamique mesuré pour des nanoparticules d'or complexes telles que les GNU est le rayon d'une sphère hypothétique qui diffuse à la même vitesse que la nanoparticule avec une forme complexe [9].

Après addition de 1 mM de thiophénol, le R_h augmente à $26,2 \pm 0,2$ nm pour les GNS et à $40,9 \pm 0,2$ nm pour les GNU. En augmentant la concentration jusqu'à 1 M de thiophénol, les GNS montrent un R_h approximativement identique puisqu'il est de $26,1 \pm 0,2$ nm, ce qui confirme la saturation du greffage en thiophénol à la surface des GNS, alors que le R_h des GNU augmente jusqu'à $45,3 \pm 0,2$ nm.

Ces résultats confirment donc que la saturation du greffage du thiophénol est atteinte à 1 mM pour les GNS alors que pour les GNU, il faut atteindre 1 M avant de pouvoir saturer la surface.

A partir du R_h à chaque étape du greffage en thiophénol sur les nanoparticules, la différence de R_h (ΔR_h) a été déterminée pour chaque concentration en thiophénol et pour les deux types de nanoparticules. Dans le cas des GNS incubées avec 1 mM de thiophénol, ΔR_h est d'environ $0,6 \pm 0,2$ nm, ce qui correspond à l'épaisseur d'une monocouche de thiophénol. Dans le cas des GNU incubées à la même concentration, un ΔR_h de $1,5 \pm 0,2$ nm a été mesuré alors qu'il est de $5,9 \pm 0,2$ nm pour une concentration de 1 M en

thiophénol. Pour les particules non sphériques, le R_h calculé à partir du coefficient de diffusion de la particule (équation 3.5) est indicatif de la taille, elle prend en compte à la fois de la forme de la particule et de la dynamique, mais aussi de sa couche d'hydratation. On peut voir que les GNU montrent un ΔR_h plus grand que les GNS, cela peut s'expliquer par le fait que ces deux particules ont des dynamiques différentes après interaction avec le thiophénol, du fait de leurs formes (surface) différentes et de leur affinité de surface spécifique pour le thiophénol.

En raison de la présence de branches dans le cas des GNU et de leur forme spécifique, le thiophénol ne formera pas une monocouche exacte. Dans un premier temps le thiophénol va remplir le vide qu'il existe entre les branches induisant une première augmentation du R_h qui est plus importante que celle pour les GNS. Ce processus se poursuit lorsque le thiophénol s'adsorbe sur les branches et que l'espace entre elles est complètement rempli en thiophénol.

On peut supposer que les ΔR_h mesurés correspondent au remplissage de l'espace entre les branches et donc à la taille des branches qui est proche de 6 nm.

Comme dans le cas du SERS, les courbes des rayons hydrodynamiques des nanoparticules en fonction de la concentration ont été ajustées en utilisant l'équation de Hill suivante :

$$R_H = \frac{R_{H-max} - R_{H-min}}{1 + \left(\frac{C_T}{C}\right)^n} \quad (\text{Equation 3.9})$$

où R_{H-max} et R_{H-min} sont respectivement les R_h maximum et minimum obtenus pour chaque étape de fonctionnalisation. C_T correspond à la concentration de transition au point médian, soit la concentration en thiophénol qui permet de couvrir la moitié de la surface des nanoparticules et n , le coefficient de Hill. Les paramètres obtenus sont présentés dans le tableau de la figure 3.14 et montrent une concordance avec les résultats obtenus en SERS.

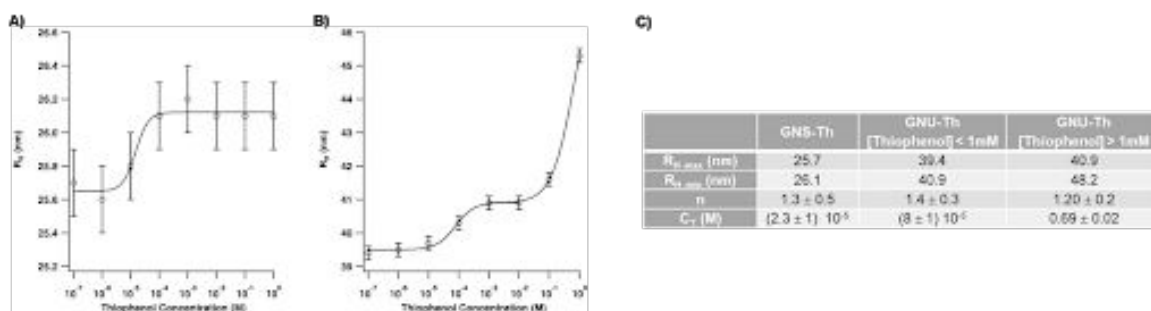


FIGURE 3.14 – Courbes des rayons hydrodynamiques calculés pour les GNS (A) et les GNU (B), incubées à différentes concentrations de thiophénol. (C) Paramètres de l'équation de Hill obtenus à partir des courbes de R_h .

Ceci démontre la complémentarité entre le SERS et la SCS, le premier donnant accès à une identification moléculaire et la deuxième permettant d'observer et de suivre les modifications de surface avec une grande sensibilité. La figure 3.15 résume schématiquement le processus de greffage du thiophénol sur les GNS et les GNU. Dans le cas des GNS, le thiophénol sature la surface en formant une monocouche avec un R_h correspondant au rayon de la sphère à laquelle est additionné la taille du thiophénol ($R_h = 25,6 + 0,6 \text{ nm}$) pour une surface calculée à 8000 nm^2 . Dans le cas des GNU, une première phase de saturation se produit au niveau du noyau et le rayon mesuré est de $R_h = 39,4 + 1,5 \text{ nm}$. Elle est suivie par une deuxième phase de greffage qui se produit sur les branches avec un rayon mesuré de $R_h = 39,4 + 5,9 \text{ nm}$. Lorsque la surface des GNU est totalement saturée (en considérant les branches) la surface a été estimée à 8.10^6 nm^2 soit une surface 400 fois supérieure à celle d'une sphère de diamètre équivalent.

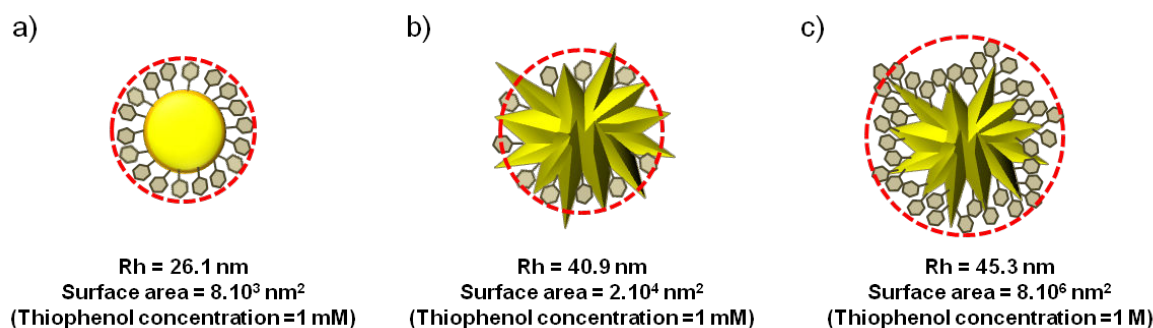


FIGURE 3.15 – Schéma de l'adsorption du thiophénol : saturation de la surface des GNS (a), adsorption au niveau du cœur des GNU (b), saturation totale des GNU (c).

Ainsi, comme on a pu le voir tout au long de cette étude, la SCS couplée au SERS permet la compréhension des interactions entre une molécule modèle et des nanoparticules d'or de formes et de tailles différentes. Cette technique a permis entre autre d'estimer la surface active permettant l'adsorption de la molécule modèle. En d'autre terme, la surface des GNU a été estimée comme étant 400 fois plus élevée que les GNS lorsque les surfaces étaient saturées en thiophénol. Ce qui rend les nanoparticules de forme complexe plus appropriées pour les applications de nanovecteurs ou de nanomarqueurs.

De plus, cette méthodologie d'étude de l'adsorption de molécules en utilisant ce type de techniques spectroscopiques ouvre la voie à l'amélioration des mécanismes d'interaction entre des biomolécules et des nanoparticules d'or dans le domaine de la nanomédecine.

3.4 Etude de la couronne protéique sur des nanoparticules d'or

Publication : Spherical und urchin-shaped gold nanoparticles interaction with proteins :
In situ protein corona study by scattering correlation spectroscopy.

Spherical und urchin-shaped gold nanoparticles interaction with proteins: *In situ* protein corona study by scattering correlation spectroscopy

Hanane Moustou, ¹ Justine Saber, ¹ Ines Djeddi, ¹ Qiqian Liu, ^{1,2} Dania Movia, ³ Adrielle Prina-Mello, ³ Jolanda Spadavecchia, ¹ Marc Lamy de la Chapelle, ^{2,4} and Nadia Djaker*¹

¹ Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France.

² Department of clinical laboratory medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

³ Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

⁴ Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM - UMR CNRS 6283), Université du Mans, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France

***Corresponding author. Tel.: +33 148388526;. E-mail address: nadia.djaker@univ-paris13.fr**

Abstract

Gold nanoparticles (GNP) are of great interest for several applications in nanomedicine, especially in imaging and sensing, drug delivery and photothermal therapy. In the case of therapy by nanovector or hyperthermia therapy, GNP interact with blood proteins after injection. This interaction induced coating of GNP by proteins namely protein corona. To understand this interaction, protein corona have been explored for different size, shape of GNP, with several techniques, like UV-Vis spectroscopy, zeta potential and especially, scattering correlation spectroscopy (SCS).

The characterization of protein corona by SCS technique will be presented for different GNP with different shapes (spheres and urchins), in presence of different concentrations of three proteins present in blood (albumin, lysozyme and glycoprotein). The hydrodynamic radius was measured at different steps of protein-GNP functionalization, to determine protein corona thickness. Such results show how protein cover gold nanoparticle (amount, conformation, binding affinity) and the specific adsorption of this protein according to shape and size of gold nanoparticles.

1. Introduction

Gold-based nanovectors possess exceptional physico-chemical properties, which allow their use in many biomedical fields, such as drug delivery[33] and photothermal therapy.[34, 35] Two major morphologies were used in these applications, isotropic-shapes as gold nanospheres (GNS) and anisotropic-shapes, alternatively, named by different groups as nanoflowers, nanostars or nano-urchins (GNU).[36-39] The main advantage of these latter, due to their branches, is the presence of different surface energies due to different corners, edges leading to a strong enhancement of the electromagnetic field and temperature upon irradiation.[40, 41] Moreover, GNU offer a greater surface to volume area for nanovectorization compared to GNS.[42-44] Many works on a comparative cellular uptake of GNS and GNU have been reported.[45-47] A lot of efforts have been made to optimize their properties for successful tumor targeting,[48-50] where criteria, such as shape, size and charge, have been intensely discussed to enhance their tumor targeting efficiency.[51]

For each application, GNP have to be finally administered into humans and brought into contact with the biological fluids such as, plasma and blood, where they encounter a large variety of dissolved biomolecules including proteins.[52-54] In few minutes, a protein layer, known as "protein corona," completely takes in the GNP[55-59] and changes their size, charge and surface chemistry. The GNP activity is then governed by the interactions between this layer and cells.[57, 60] The most abundant proteins are adsorbed on the GNP surface like albumin, immunoglobulin, glycoproteins and apolipoproteins[16, 61] however, over the time they will be replaced by higher affinity proteins (Vroman's

effect[62]) as fibrinogen or lysozyme.[63, 64] The understanding of GNP-proteins interaction is a key step to the manufacturing of well-designed nanovectors.[65]

It is also well known that the surface charge, shape, and size of the nanoparticles all play significant roles in the formation of the protein corona.[66-68] A large number of reported works focuses on the surface chemistry and size of spherical nanoparticles effects on the protein corona,[69-71] while branched nanoparticles still a complex system to understand.

The main used techniques for protein corona characterization are circular dichroism,[72-74] chromatography,[75, 76] gel electrophoresis or surface plasmon resonance.[75, 77] Recently, more sensitive techniques without any sample purification steps were developed.[78, 79] These techniques are based on the measurement of the hydrodynamic radius of the nanoparticles before and after interaction with proteins. While the fluorescence correlation spectroscopy (FCS) needs fluorescent labeling, scattering correlation spectroscopy (SCS) is the most suitable for GNP (especially branched-shaped) characterization.[78-80] Moreover as FCS, SCS is more sensitive (sub-nanometer precision) than conventional DLS (dynamic light scattering).[80, 81]

In the present work, we report a comparative study between spherical and urchin-shaped gold nanoparticles interaction with three specific human plasma proteins by using SCS. These three proteins were: human serum albumin (HSA), lysozyme (Lys) and Alpha-2-hs-glycoprotein (Gly). HSA is present in large quantities in human blood plasma (60%) and possess a single polypeptide chain with 583 amino acid residue and a molecular weight of approximately 67 kDa.[82] α -2-HS-glycoprotein, also known as fetuin- α , α -2-Z-globulin and α -2-Heremans-Schmid-glycoprotein, has a molecular weight around 50 kDa.[83] It is built up from an α -chain (282 amino acids) and β -chain (27 amino acids) with a linker sequence (40 amino acids).[53] Originating from the liver, this protein is found at plasma levels of 0.3–0.6 mg/mL.[84] Lysozyme is a small (15 kDa) monomeric, globular protein consisting of an α -helix and β sheet domains and 6 tryptophans located in different parts of the protein.[85, 86] The three chosen proteins were already used in nanoparticle-protein interactions studies.[87-89]

Here we use SCS to explore in situ the three proteins adsorption on GNS and GNU, by monitoring the changes in the Brownian diffusion due to the protein binding. Parameters such as protein orientation, binding affinity (K') and cooperativity (n) regarding the GNP surface were extracted from the measurements of the hydrodynamic radius of GNP before and after interaction with different concentrations of proteins.

2. Experimental methods

2.1. Material.

Commercially available Citrate-stabilized GNP were obtained from Sigma-Aldrich. GNS (753645, Sigma Aldrich, USA) and GNU (797723, Sigma Aldrich, USA) with a nominal diameter of 50 nm and 80 nm respectively.[90, 91] Both GNS and GNU stocks were stored in pure water, with 10% of PBS (phosphate buffered saline). The three proteins: human serum albumine (HSA), lysozyme (Lys) and α -2-hs-glycoprotein (Gly) were purchased from Sigma Aldrich (A9511, L1667 and G0516).[92-94] Protein solutions were prepared at various concentrations in ultrapure water (pH 7.4) and stored at 4°C. Both GNS and GNU at the same concentration were incubated in protein solutions of different concentrations for two hours at 37°C to form four types of samples: GNS-HSA, GNS-Lys, GNS-Gly and GNU-HSA. Afterward, the protein functionalized GNP were centrifuged and washed with ultrapure water (10000 rpm, 10 min, two times) to remove excess proteins, giving a final concentration of 10^9 GNP/mL (10 pM) for both GNS and GNU. The proteins-functionalized GNP were found to be stable, as no aggregates could be observed even after one week of storage at 4°C in ultrapure water. The normalized extinction spectra of the GNP incubated in protein solutions of different concentrations are illustrated in Figure S1 (Supporting Information).

2.2. Characterization.

GNP concentrations were obtained by measuring the optical extinction spectra using a UV–Vis spectrometer (Kontron Instr. France) on a spectral range from 400 to 900 nm. The zeta potential and

DLS measurements of GNP were performed using a Zetasizer Nano-ZS instrument ZEN3600 (Malvern, UK). All TEM images were realized as previously described by the authors.[95, 96]

2.3. Scattering Correlation Spectroscopy (SCS).

SCS is a home-built instrument based on an inverted microscope (Axio Observer D1, Zeiss, Germany). [78, 97] The light is provided from A 633 nm He-Ne laser (Thorlabs) and circularly polarized using a $\lambda/4$ waveplate (Thorlabs, France). The excitation power was set at 10 μ W to avoid any optical trapping effect.[81] The laser beam was focused by a water immersion objective (Olympus, 40 \times , NA = 1.2) at a depth of 10 μ m inside the sample to minimize reflected light from the coverslips.

The scattered light by GNP was collected backward and passed through a 50 μ m pinhole (Thorlabs). Optical densities were set in front of the detectors to record enough signal without saturating the detectors. Two avalanche photodetectors (PerkinElmer, Canada) recorded the scattered signal and the signal cross-correlation was performed by a correlator (ALV-7004, ALV-Laser, Germany). Each individual SCS measurement was obtained by averaging five runs, each of 60 s duration. Each sample was measured at least three independent times to yield mean values and corresponding errors. The system was previously calibrated,[80] using the fluorescence signal, giving a lateral waist 470 nm and an axial waist of 1.6 μ m. Correlation analysis was performed with Igor software (WaveMetrics, USA), as previously described.[98] Each correlation curve fitted following the mathematical model:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \right] \quad (1)$$

Where, N is the average number of particles, s is a geometrical parameter of the confocal volume (the ratio between the lateral and axial waists, in our setup: $s = 0.3$) and τ_D is the diffusion time of the GNP crossing the focal volume. By using the Stokes-Einstein equation, we could determine directly the hydrodynamic radius (R_h) by using the formula: [99, 100]

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta} \left(\frac{4\tau_D}{\omega_{xy}^2} \right) \quad (2)$$

where η is the water viscosity (10^{-3} Kg.m $^{-1}$.s $^{-1}$), k the Boltzmann constant and T is the temperature (all measurements were done at room temperature 23 $^{\circ}$ C).

3. Results and Discussion

3.1. GNPs characterization by UV-Vis spectroscopy and Zetasizer

First, the shape and size of the commercial citrate-coated GNP were characterized by transmission electron microscopy (TEM; JEOL 100 U, 100 kV accelerating voltage). The TEM images show that the GNS have a round shape, a smooth surface, and a narrow size distribution whereas the GNU have a large number of tips at the surface. By image analysis using the software ImageJ, the GNS diameter was about (47 ± 3) nm. We also measured the sizes of GNU with respect to their core and branches: GNU showed a mean size of (80 ± 3) nm, a core size of (64 ± 2) nm, and a branch size of (16 ± 3) nm (Figure 1a,b).

Localized surface plasmon resonance (LSPR) wavelengths of all GNP were measured by recording their extinction spectra (Fig. 1c-f). Indeed, for bare GNS and GNU, the LSPR positions measured at 532 and 623 nm are in a good agreement with GNP sizes and the products specifications. After GNP incubation with proteins, the citrate layer is easily replaced and a spontaneous adsorption of proteins is occurred leading to a red-shift of the LSPR positions compared to bare GNP.[16, 56] The LSPR positions are red-shifted at 536 nm for GNS-HSA and GNS-Gly, while for GNS-Lys, it is shifted to 540 nm. In the

case of GNU, the LSPR position of GNU-HSA highly shifted to 630 nm as a result of the particle anisotropy and of the multiple tips at the particle surface. These red-shifts confirm the proteins adsorption at the GNP surface to form a protein corona around the GNP.[101-103] Similar evidence was observed by assessing the GNP size and surface charge changes obtained by zeta potential measurements. The protein adsorption was further confirmed by an increase of the GNP diameter and a shift of the ζ potential (see Table 1). After incubation with the proteins, we observed a ζ potential shift from -30.4 to -13.4 mV (56% of decrease) for GNS-HSA, to 18.8 mV (162% of decrease) for GNS-Lys and to -22.3 mV (27% of decrease) for GNS-Gly. In the case of GNU-HSA, it decreases from -43.1 to -13.6 mV (68% of decrease).

Note that the isoelectric points (pI) are about 4.7, 5.4 and 11 for HSA, glycoprotein and lysozyme, respectively. At pH 7.4 (buffer), HSA and glycoprotein are mainly negative, while lysozyme is mostly positive charged. Nevertheless, the observed adsorption capacity for all proteins may be explained by the fact that these proteins do not have a net electrical charge at their isoelectric points, because they are complex macromolecules characterized by polar, hydrophobic and charged areas. This fact, leads to an increasing the possibility of them making contact with any substrate, independently of charge.[104]

At comparable pI values, HSA have a much larger effect on the GNP zeta potentials than glycoprotein. However, HSA was at the highest concentration ($400 \mu\text{M}$) in comparison to the glycoprotein ($10 \mu\text{M}$). The largest change in zeta potential was observed for the lysozyme proteins with a different of 50 mV (at the same concentration of HSA, $400 \mu\text{M}$). These results support the idea that these changes on ζ potential are protein specific and not related to the concentration.[71] It was reported that when the buffer pH is far from the protein isoelectric point, the proteins adsorption will increase, this is due to internal electrostatic repulsions and thus a lower structural stability.[71, 105] Our samples were all suspended in pure water at pH 7.4, and therefore, lysozyme adsorption is occurring at a pH furthest from its isoelectric point by comparison with HSA and glycoprotein (isoelectric points closer to 7.4). These results confirm that all proteins are able to form a proper protein corona, especially on our large GNP (size $>20\text{nm}$)[101] which provide the stability of the GNP by the steric repulsion between proteins rather than via the former electrostatic repulsion provided by citrate.[56]

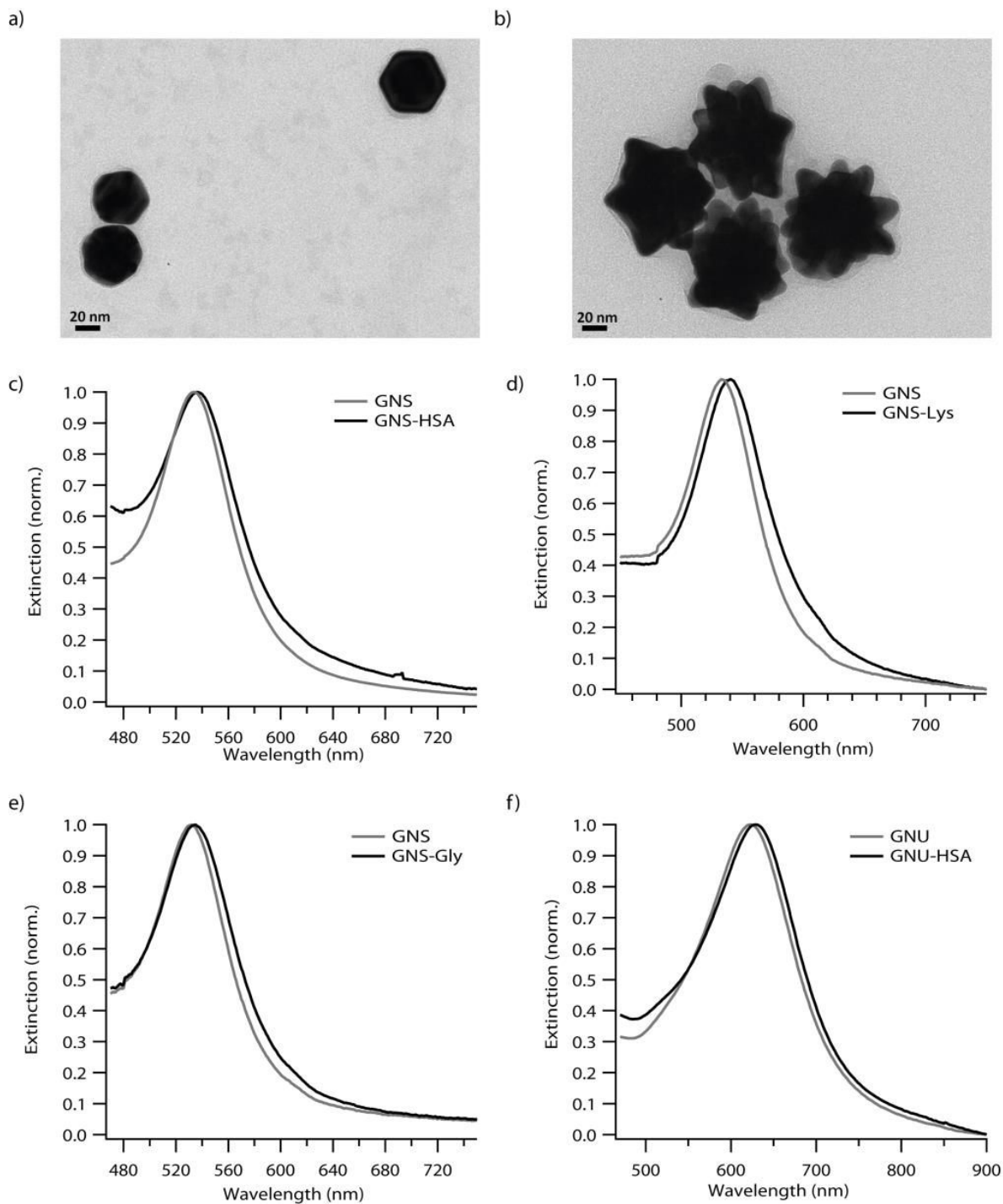


Figure 1: TEM images of (a) GNS and (b) GNU. Normalized extinction spectra of GNP before (grey) and after (black) interaction with proteins. (c) GNS incubated with 400 μ M of HSA, (d) 400 μ M of Lysozyme and (e) 10 μ M of Alpha-2-hs-Glycoprotein. (f) GNU incubated with 400 μ M of HSA.

3.2. Determination of the hydrodynamic radius of GNPs by SCS

To investigate the interaction of GNS and GNU with our three proteins (HSA, Lys and Gly), we measured the hydrodynamic radius of the GNP incubated with different concentrations of proteins by using SCS. The theory and calibration of SCS was already described in our previous works.[78, 80, 97] The scattered intensity fluctuations within the confocal volume (typically 1fL) were recorded and a cross-correlation curve was plotted for each GNP and each concentration (Fig.2 and 3). The cross-correlation curves were fitted by using equ. 1 to determine the time diffusion and hence, the hydrodynamic radius

for each GNP before and after incubation of each protein concentration was calculated using equ. 2. While for HSA and lysozyme the concentration varied between 0 and 400 μM , for glycoprotein, the concentration varied between 0 and 10 μM to achieve GNP surface saturation.

In figure 2, cross-correlation curves of GNS before and after incubation with HSA (400 μM), lysozyme (400 μM) and glycoprotein (10 μM) at a maximum of concentration were presented (for the other concentrations see Figures S2-S5 in the supporting information). A summary of all the time diffusion values and their corresponding R_H value of the GNP for each case were summarized in Tables S1-3 (supporting information). After recovering the surface of the GNS, the three proteins showed different times diffusion. This time diffusion increased with the protein concentration as showed in Tables S1-3 (supporting information). The cross-correlation curve of bare GNS in Figure 2(a) show a time diffusion of 6.15 ms, this is similar with the results already presented by the authors for spherical particle of 50 nm size.[78, 80] The time diffusion increases by increasing the proteins concentration until a maximum of 7.24 ms at 400 μM (Figure 2b) of HSA, 7.78 ms for 400 μM of lysozyme (Figure 2c) and 8.49 ms for 10 μM of glycoprotein (Figure 2d). These results indicate that the proteins were adsorbed at the surface and the hydrodynamic sizes were increased differently for each protein. The highest time diffusion was recorded for glycoprotein which indicates a greater hydrodynamic radius increase.

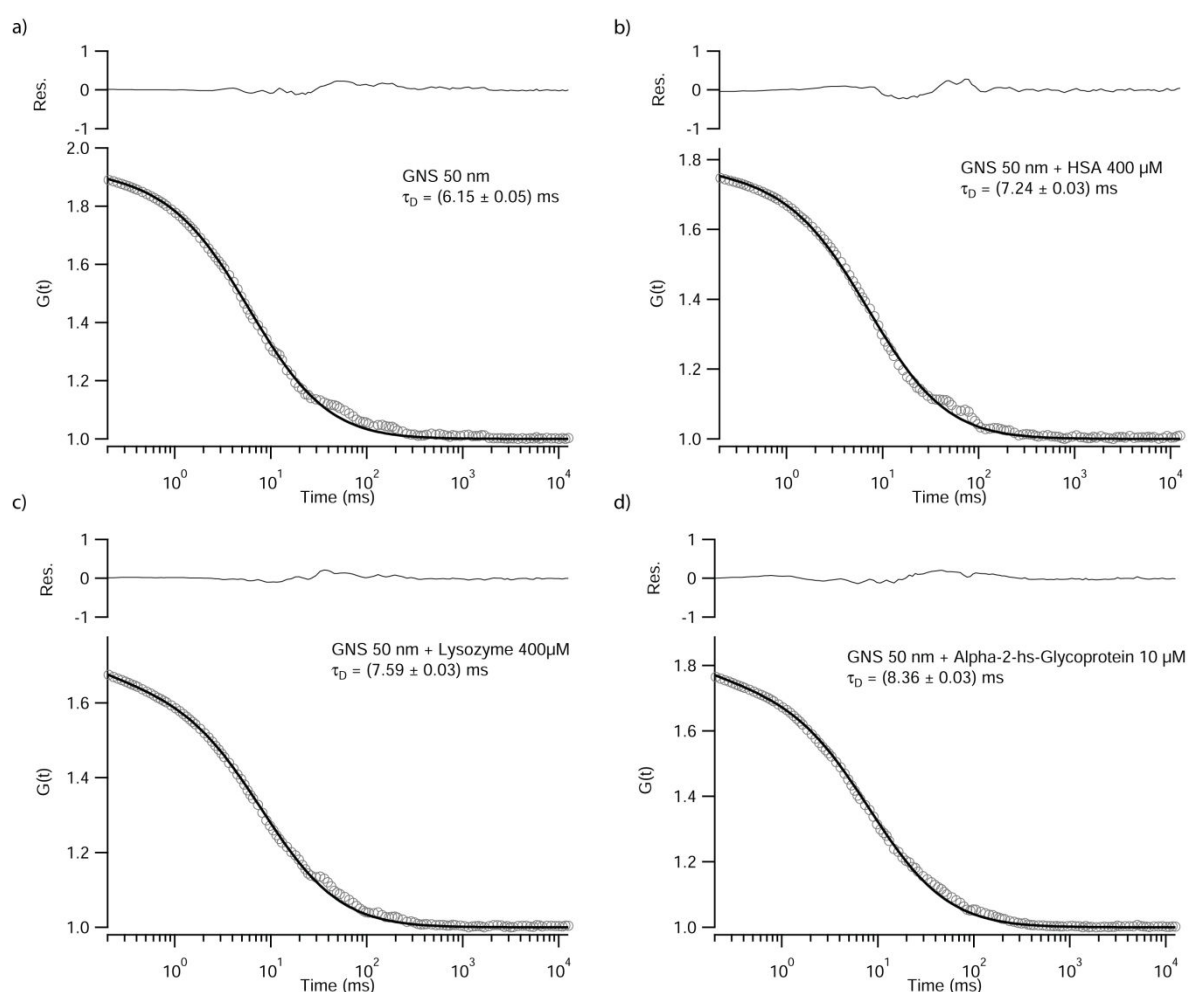


Figure 2: Cross-correlation curves (circles) and their fits with eq 1 (solid lines) of bare GNS (a), GNS after incubation with (b) HSA, (c) Lysozyme and (d) Alpha-2-hs-Glycoprotein.

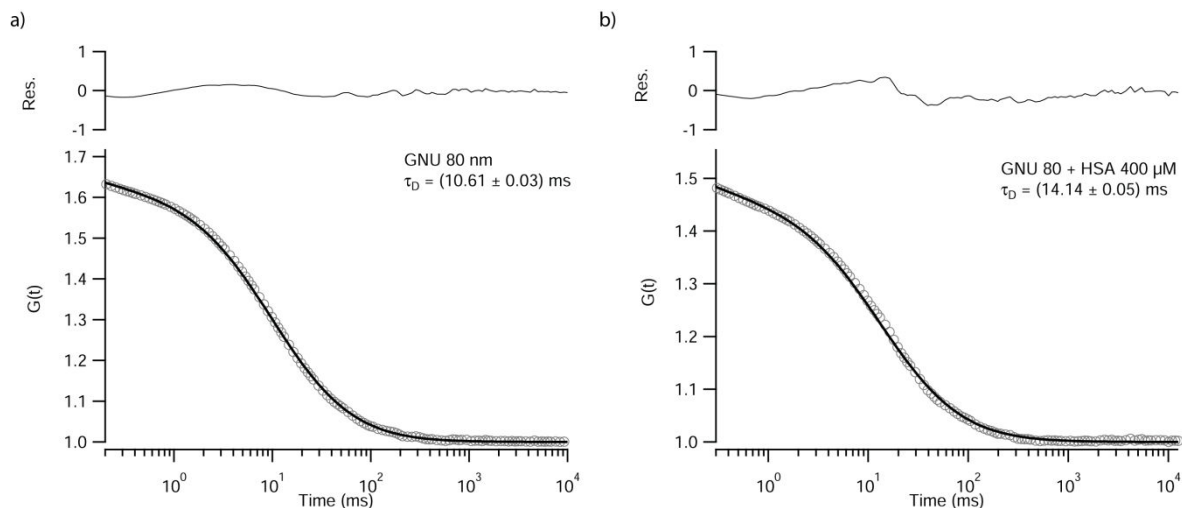


Figure 3: Cross-correlation curves (circles) and their fits with eq 1 (solid lines) of GNU before (a) and after (b) incubation with HSA.

In the case of GNU, a high increase of the time diffusion was observed compared to GNS due to their branches and their specific shape, such that HSA proteins will not form an exact monolayer as in the case of GNS, but will fill the void between the branches. This will induce a larger increase of the R_H value than in the case of GNS. Note that the measured GNU R_H is the radius of a hypothetical hard sphere that diffuses with the same speed as the GNU through the focal volume.[80] The diffusion time will depend on their size and surface chemistry (proteins), which directly affects the diffusion speed of GNP. The hydrodynamic size for all GNP before and after the formation of the protein corona were calculated and summarized in Table 1. All the size values obtained by the different techniques (DLS, TEM and SCS) were in a good agreement.

Table 1: Summary of GNP properties measured by UV-Vis spectroscopy, zetasizer, DLS, TEM and SCS.

	LSPR (nm)	ξ potential (mV) \pm sd	Size by DLS (nm)	Size by TEM (nm)	Size by SCS (nm)
GNS	532	-30.4 ± 1.6	48.4 ± 2.9	47 ± 2	44.9 ± 0.3
GNS-HSA	536	-13.4 ± 0.5	75.3 ± 4.1	-	52.8 ± 0.2
GNS-Lys	540	18.8 ± 0.9	65.0 ± 3.2	-	55.4 ± 0.2
GNS-Gly	536	-22.3 ± 0.9	75.0 ± 1.1	-	61.0 ± 0.2
GNU	623	-43.1 ± 0.4	83.7 ± 4.2	80 ± 3	77.5 ± 0.2
GNU-HSA	630	-13.6 ± 0.4	108.2 ± 8.3	-	103.2 ± 0.3

3.3. Orientation of adsorbed proteins on GNS and GNU

To investigate the protein corona on the GNP, the R_H values of both GNS and GNU with the different proteins were presented in figure 4 as a function of proteins concentration (dots). The resulting curves were fitted using the following Hill equation (solid lines) as reported in [45, 46, 65, 78, 106, 107]:

$$R_H(c) = R_H(0) \sqrt[3]{1 + \gamma N(c)} = R_H(0) \sqrt[3]{1 + \gamma \left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{K'}{c}\right)^n} \right)} \quad (3)$$

Where, $R_H(0)$ is the radius of the bare GNP (22.5 nm for GNS and 38.75 nm for GNU, measured by SCS), γ is a coefficient representing the ratio between the GNP volume (V_0) and the protein volume (V_p), with $\gamma = V_p/V_0$ (γ values for each case were given in table S4, see the supporting information). N_{max} is the maximum number of proteins binding to one GNP, K' is the concentration of free proteins at half coverage and n is the Hill coefficient, representing the cooperativity of binding. The fitting parameters of Figure 4 curves were given in Table 2.

For both nanoparticles and all proteins, the R_H curves increase progressively up to a maximum value determining a limited loading capacity of the GNP where, the final thickness of the protein corona is measured (ΔR_H), as previously reported.[102, 108] ΔR_H was about 3.9 nm for GNS-HSA, 5.2 nm for GNS-Lys and 8 nm for GNS-Gly. The thickness of the protein corona is directly related to the molecular dimensions of the proteins,[109, 110] this claims that the protein is adsorbed in a specific orientation.[107]

Since the interaction of GNP and proteins is made electrostatically, the positive surface of the proteins are involved in this interaction with the negatively charged GNP surface. Figure 5 shows a cartoon representation of the molecular structure of HSA (a), lysozyme (b) and glycoprotein (c). HSA can be represented by an equilateral triangular prism,[107] with sides of ~8.8 nm and a height of ~3.7 nm. The measured ΔR_H (3.9 nm) corresponds completely with the HSA height, which attest that the protein triangular face who sticks to the GNP surface. It was reported that the triangular HSA surfaces show a positive patch,[109-111] which is likely to promote the interaction with the negatively charged citrate-surface of the GNP. Similar evidence was obtained in the case of lysozyme and glycoprotein. Both protein shapes can be represented by a cylinder of diameter 3.1 nm for lysozyme and 5.5 nm for glycoprotein, while the height is about 5.6 nm for lysozyme and 8.2 nm for glycoprotein. The measured ΔR_H of GNS-Lys and GNS-Gly (5.2 nm and 8 nm) correspond completely with both proteins heights. These results support the idea that the spherical side of the cylinder is involved in the interaction with the GNP surface as this surface is positively charged, especially, in the case of lysozyme as reported on silica nanoparticles in[64]. Overall, about 212 HSA, 1100 lysozymes or 320 glycoproteins cover the total surface of GNS of approximately 50 nm diameter representing a surface area of about 7850 nm² ($4\pi R_H^2$). By calculating the surface of GNP by protein, i.e., dividing N_{max} by the GNP surface area, we found 37nm²/HSA, 7nm²/Lys and 25nm²/Gly. These results are in an excellent agreement with the surface area of the protein interaction side area presented in figure 6.

The equilibrium dissociation coefficient K' quantifies the strength of the protein-GNP interaction, i.e., the protein binding affinity with GNP (it denotes the free protein concentration at which $N_{max}/2$ proteins are bound to the GNP surface[46]). The typical concentration of glycoprotein in the human plasma is about 0.45mg/mL ~ 9 μ M, while HSA concentration is about 35 mg/mL ~ 500 μ M.[53, 112] The glycoprotein show a highest binding affinity for the negatively charged GNS, which differs by one order of magnitude with $K' = 5.3 \pm 0.1 \mu$ M compared to the other proteins. HSA has an intermediate value of $K' = 32.8 \pm 1.7 \mu$ M, while, lysozyme shows a K' of 76.9 \pm 4.0 μ M. It was reported that the binding affinity can be correlated with the surface binding potential,[107] hence, it can be assumed that glycoprotein involve a large patch of positive charge than the other proteins.

The cooperativity of binding is described by the Hill coefficient n . A value of $n > 1$ indicates that proteins already bound to a GNP facilitate the binding of further proteins to the remaining vacant sites ($n < 1$ is indicative of anti-cooperative binding).[65] While HSA and lysozyme show a cooperative binding with $n = 1.8 \pm 0.2$, glycoprotein gave a higher value $n = 5.7 \pm 0.5$. This result may be related to a strong stabilization of a glycoprotein molecule on the GNP in the presence of a neighboring glycoprotein molecule, since their binding affinity (K') is the highest.

In the case of branched GNP, it was already demonstrated by the authors that GNU show a higher surface area than GNS even at the same size.[78, 80] Note that a GNU surface area is larger by a factor of minimum 2.5 than GNS (GNU area, which is about 20096 nm², is calculated approximately by considering a sphere of 40nm radius). GNU ΔR_H was about 12.9 ± 0.3 nm for a number of HSA corresponding to $N_{max} = 1887$. By assuming that the measured GNU R_H is corresponding to the hydrodynamic radius of a sphere which has the same diffusion velocity of a GNU. GNU to GNS ΔR_H ratio is comparable to the surface area ratio between them. We observed that GNU can load 9 times more HSA than GNS ($N_{max}(\text{GNU-HSA}) / N_{max}(\text{GNS-HSA}) = 9$), this can be explained by a different orientations of HSA on the different oriented surfaces of GNU. Due to the branches and the specific shape of the GNU, the proteins will not form an exact monolayer but will fill the void between the branches inducing a larger increase of the R_H than in the case of GNS.

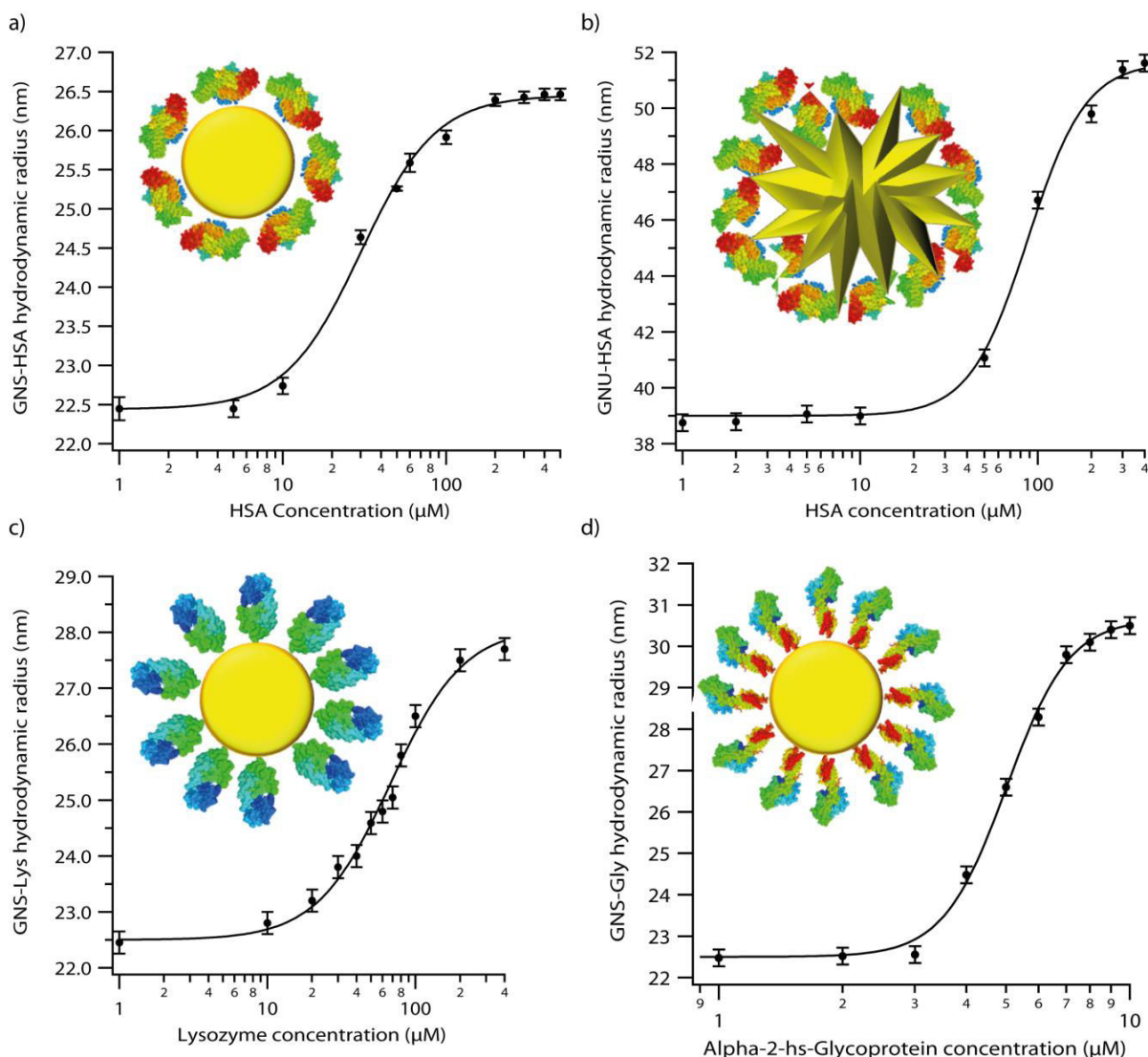
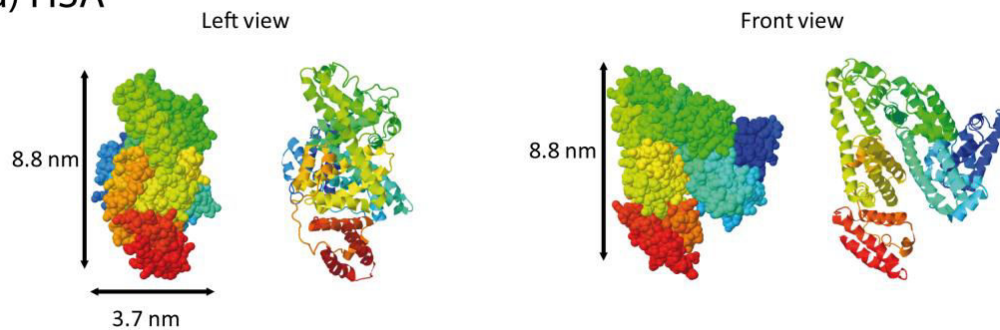


Figure 4: Hydrodynamic radii calculated using equ. for (a) GNS and (b) GNU incubated with HSA, (c) GNS incubated with lysozyme and (d) GNS incubated with glycoprotein at different concentrations (dots). The curves were fitted (solid lines) by using equ. and schematic depiction of protein monolayers formed around the GNP were presented in each case.

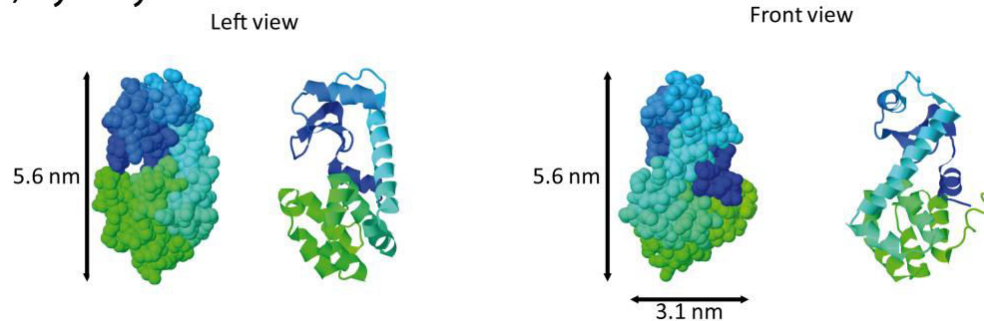
Table 2: Parameters of protein adsorption onto GNP obtained from fitting the data shown in Fig. 4 using Hill equation.

	ΔR_H (nm)	K' (μM)	n	N_{max}
GNS-HSA	3.9 ± 0.2	32.8 ± 1.7	1.9 ± 0.2	212 ± 4
GNS-Lys	5.2 ± 0.2	76.9 ± 4.0	1.8 ± 0.2	1100 ± 88
GNS-Gly	8.0 ± 0.2	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.5	320 ± 13
GNU-HSA	12.9 ± 0.3	97.5 ± 5.0	2.7 ± 0.3	1887 ± 60

a) HSA



b) Lysozyme



c) Alpha-2-hs-Glycoprotein

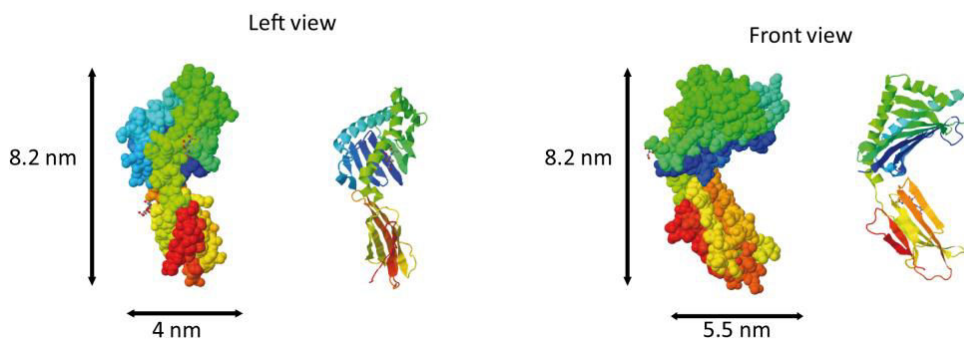


Figure 5: Space-filling models(left) and Cartoon representations (right) of (a) HSA (PDB ID 1A06), (b) Lysozyme (PDB ID 2LZM) and (c) Alpha-2-hs-Glycoprotein (PDB ID 1T7Z) calculated online and overall dimensions measured by using Pymol at <https://www.rcsb.org/>.

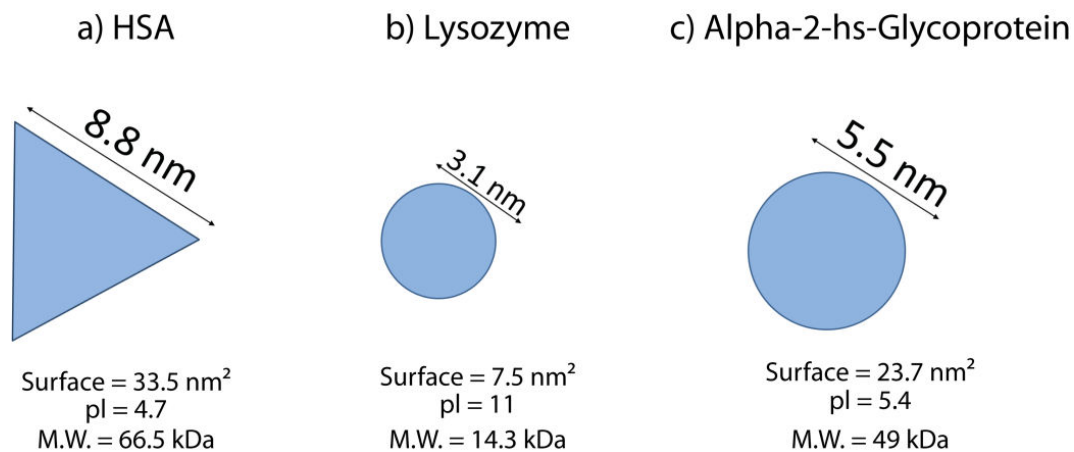


Figure 6: Schematic view of the (a) HSA, (b) Lysozyme and (c) Alpha-2-hs-Glycoprotein interaction surfaces with GNS and their physicochemical properties.

4. Conclusion

In this work, we have quantitatively analyzed the interaction of different proteins on with different shapes of GNP of tens nanometers size by using SCS. This technique allows us to investigate the protein binding in situ by determining the hydrodynamic radius in the case of nanospheres and urchin-shaped citrate-gold nanoparticles. Different values of protein corona thickness were measured, reflecting a specific orientation for each protein on the GNP surface. For GNU, the R_H is dependent not only on the GNP size but also to its shape and surface chemistry which affect its mobility. While GNS show one settled orientation of proteins, GNU, due to their branched shape (multi-oriented surfaces) show different orientation of HSA at their surface, which enhance drastically their R_H value. We have shown that the binding affinity of glycoprotein was one order of magnitude smaller than with HSA or lysozyme, indicating that the glycoprotein interacts much more strongly with negatively charged GNP than lysozyme or HSA which can be explained by a high positive surface interaction side.

As GNP are usually injected into the blood for therapeutic applications (often as nanovectors), it is of major importance to study their interaction with proteins. This study is a primordial step before any use to avoid their opsonization and facilitate their routing by the blood. In future studies, we shall investigate the interaction of other relevant proteins with complex-shaped and various surface chemistries nanovectors, already synthesized by the authors [48-50, 95, 96] at different temperature to see the effect on protein corona and hence on the drug delivery.

Acknowledgements

The authors acknowledge the ANR LOUISE project (ANR-15-CE04-0001) for financial support. This work has been performed on the *CNanoMat* and *PRISME* platforms of the University Paris 13

SUPPORTING INFORMATION

Spherical und urchin-shaped gold nanoparticles interaction with proteins: *In situ* protein corona study by scattering correlation spectroscopy

Hanane Moustouai,¹ Justine Saber,¹ Ines Djeddi,¹ Qiqian Liu,^{1,2} Dania Movia,³ Adriele Prina-Mello,³ Jolanda Spadavecchia,¹ Marc Lamy de la Chapelle,^{2,4} and Nadia Djaker*¹

¹ Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France.

² Department of clinical laboratory medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

³ Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

⁴ Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM - UMR CNRS 6283), Université du Mans, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France

*Corresponding author. nadia.djaker@univ-paris13.fr

This document contains informations and figures regarding gold nanoparticles (GNP) extinction spectra before and after incubation with proteins measured by UV-Vis spectroscopy. Scattering cross-correlation curves of GNP incubated with different concentrations of proteins (HSA, lysozyme and α -2-hs-glycoprotein). Diffusion time values obtained from the fitting of the cross-correlation curves and the corresponding R_H values of GNP before and after incubation with proteins. Calculated values of γ coefficients for each nanoparticle and protein.

1) GNS and GNU extinction spectra before and after incubation with proteins measured by UV-Vis spectroscopy:

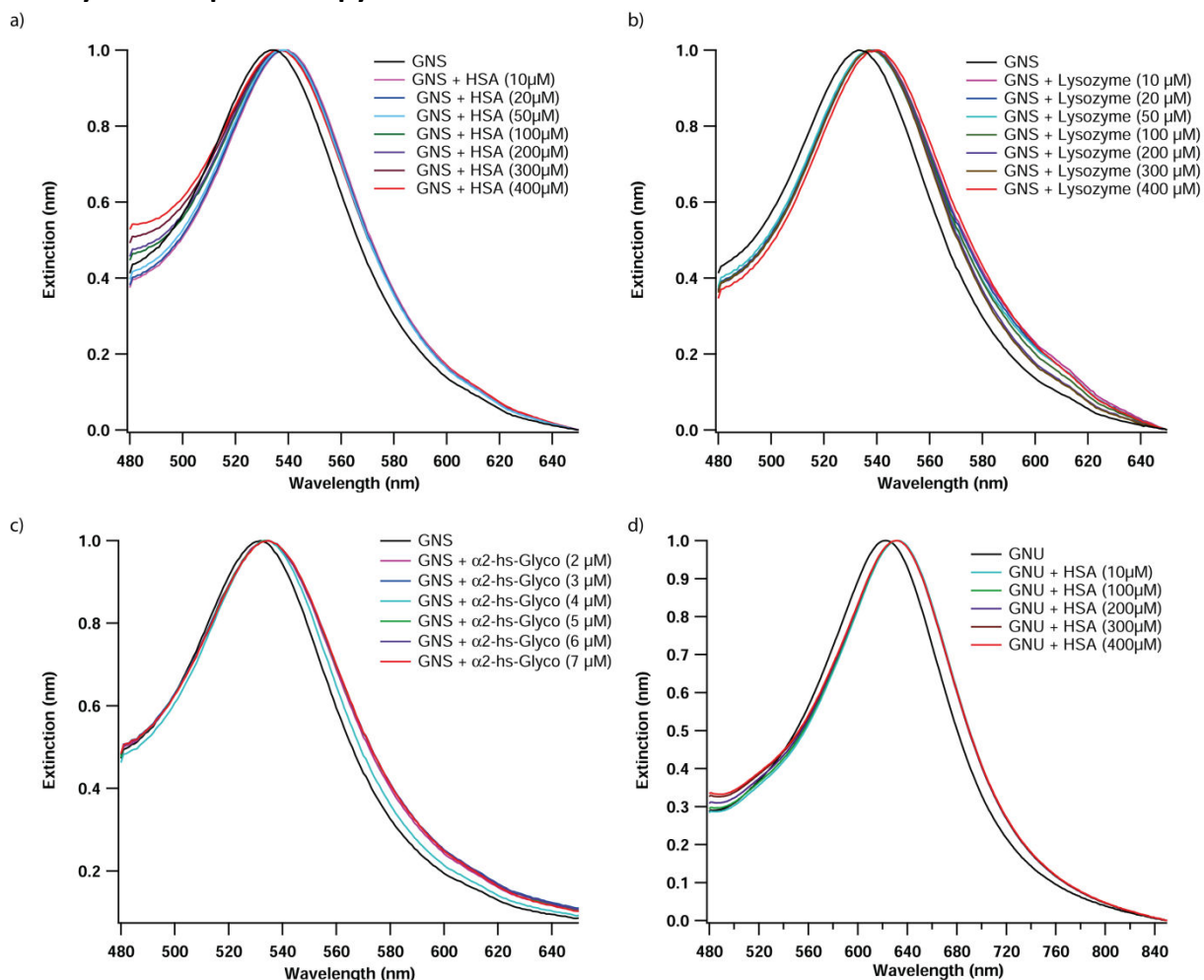


Figure S1: Extinction spectra of GNP incubated with different concentrations of proteins. GNS incubated with (a) HSA, (b) Lysozyme and (c) $\alpha 2$ -hs-Glycoprotein. (d) GNU incubated with HSA.

2) Normalized SCS curves of GNS and GNU incubated with different concentrations of HSA:

For ease comparison, the cross-correlation curves were normalized to 1 at 0.1 ms.

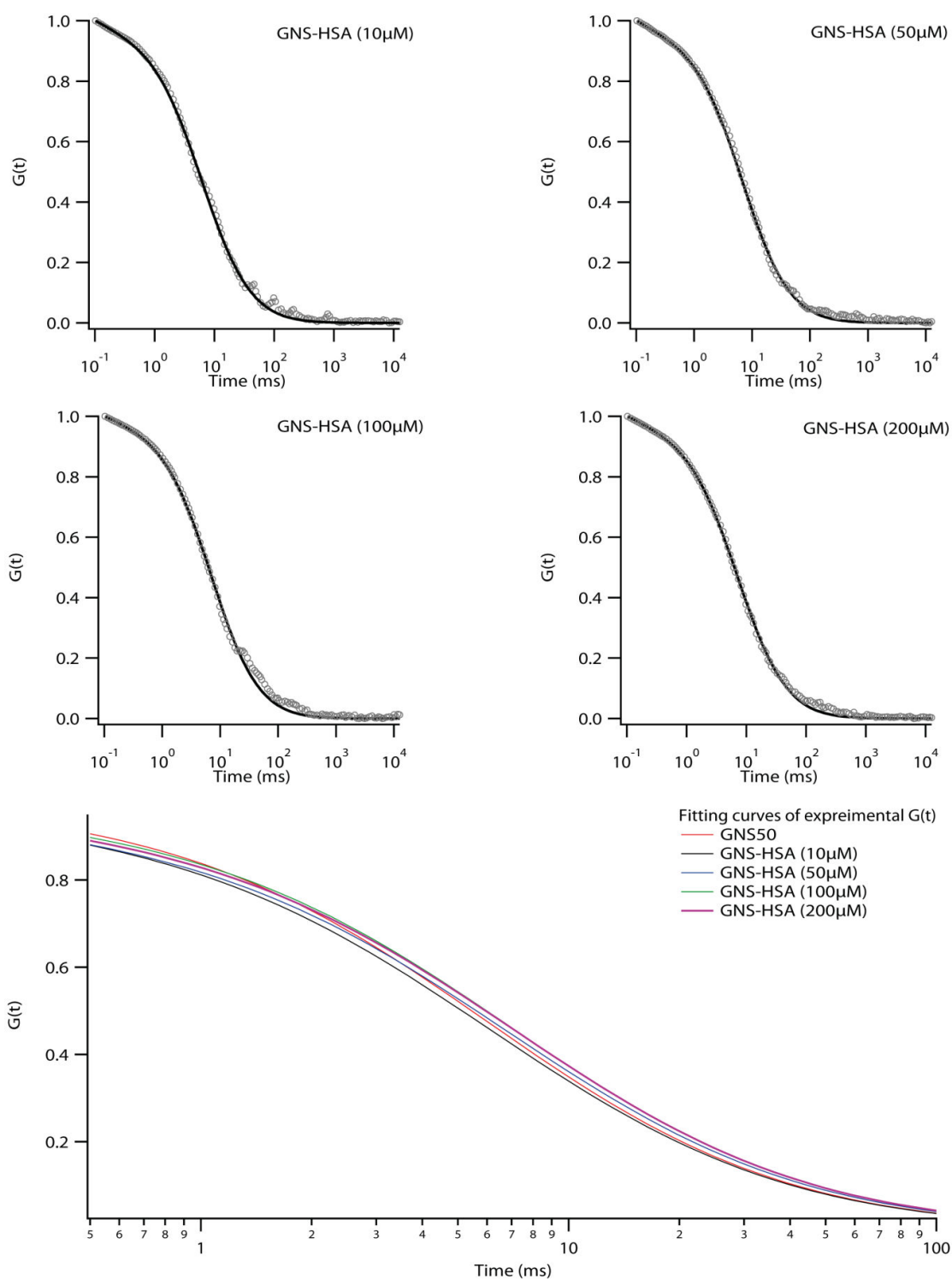


Figure S2: Cross-correlation curves of GNS incubated with different concentrations of HSA.

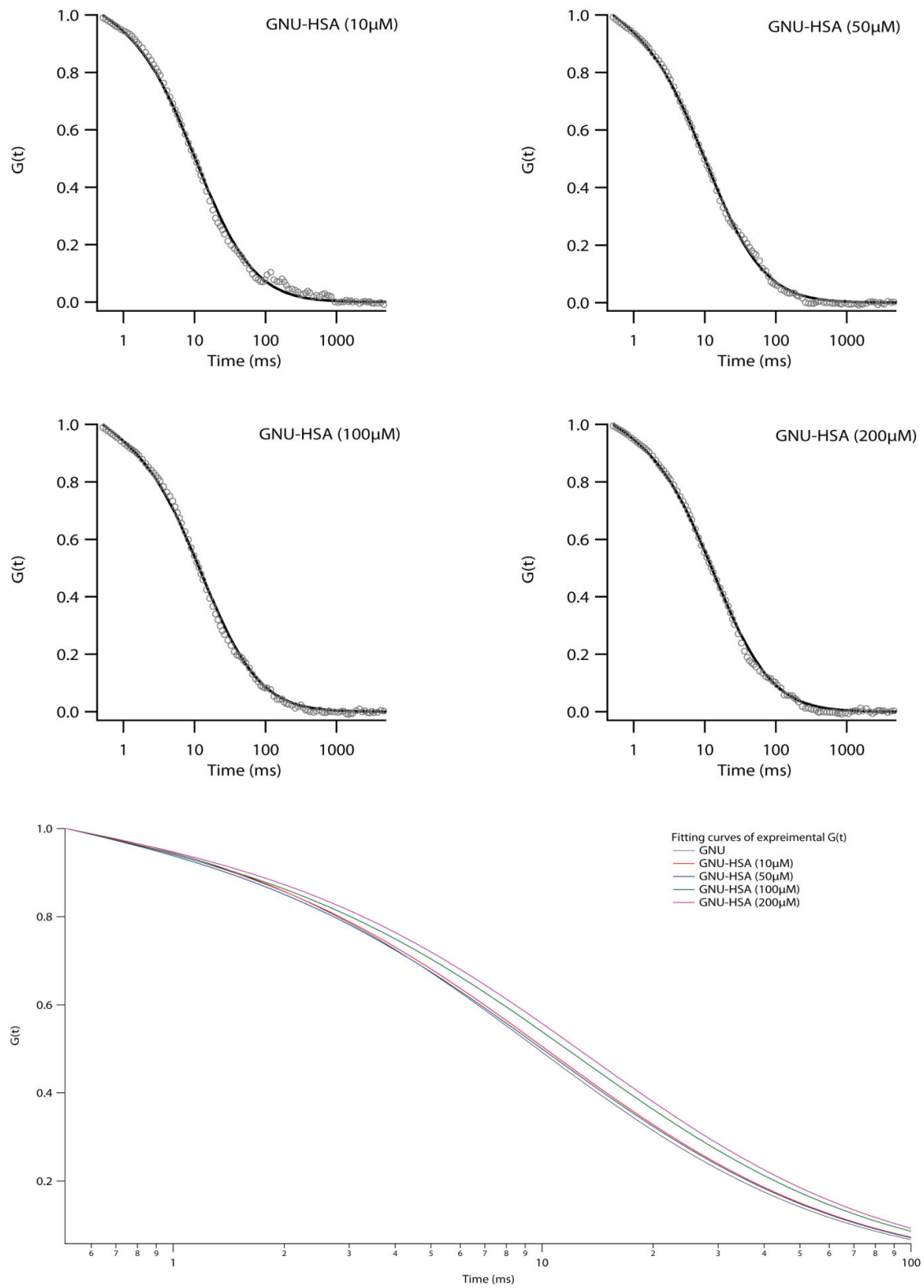


Figure S3: Cross-correlation curves of GNU incubated with different concentrations of HSA.

Table S1: Diffusion time values obtained from the fitting of the cross-correlation curves and the corresponding R_H values of GNS and GNU incubated with different concentrations of HSA.

HSA	GNS		GNU	
	τ_D ($\pm 0.03\text{ms}$)	R_H ($\pm 0.2\text{nm}$)	τ_D ($\pm 0.05\text{ms}$)	R_H ($\pm 0.3\text{nm}$)
1	6.15	22.5	10.61	38.7
2	-	-	10.62	38.8
5	6.15	22.5	10.70	39.0
10	6.23	22.8	10.68	38.9
30	6.75	24.7	-	-
50	6.92	25.3	11.25	41.0
60	7.01	25.6	-	-
100	7.1	25.9	12.79	46.7
200	7.23	26.3	13.64	49.8
300	7.24	26.4	14.07	51.3
400	7.24	26.4	14.14	51.6
500	7.25	26.5	-	-

3) Normalized SCS curves of GNS incubated with different concentrations of Lysozyme:

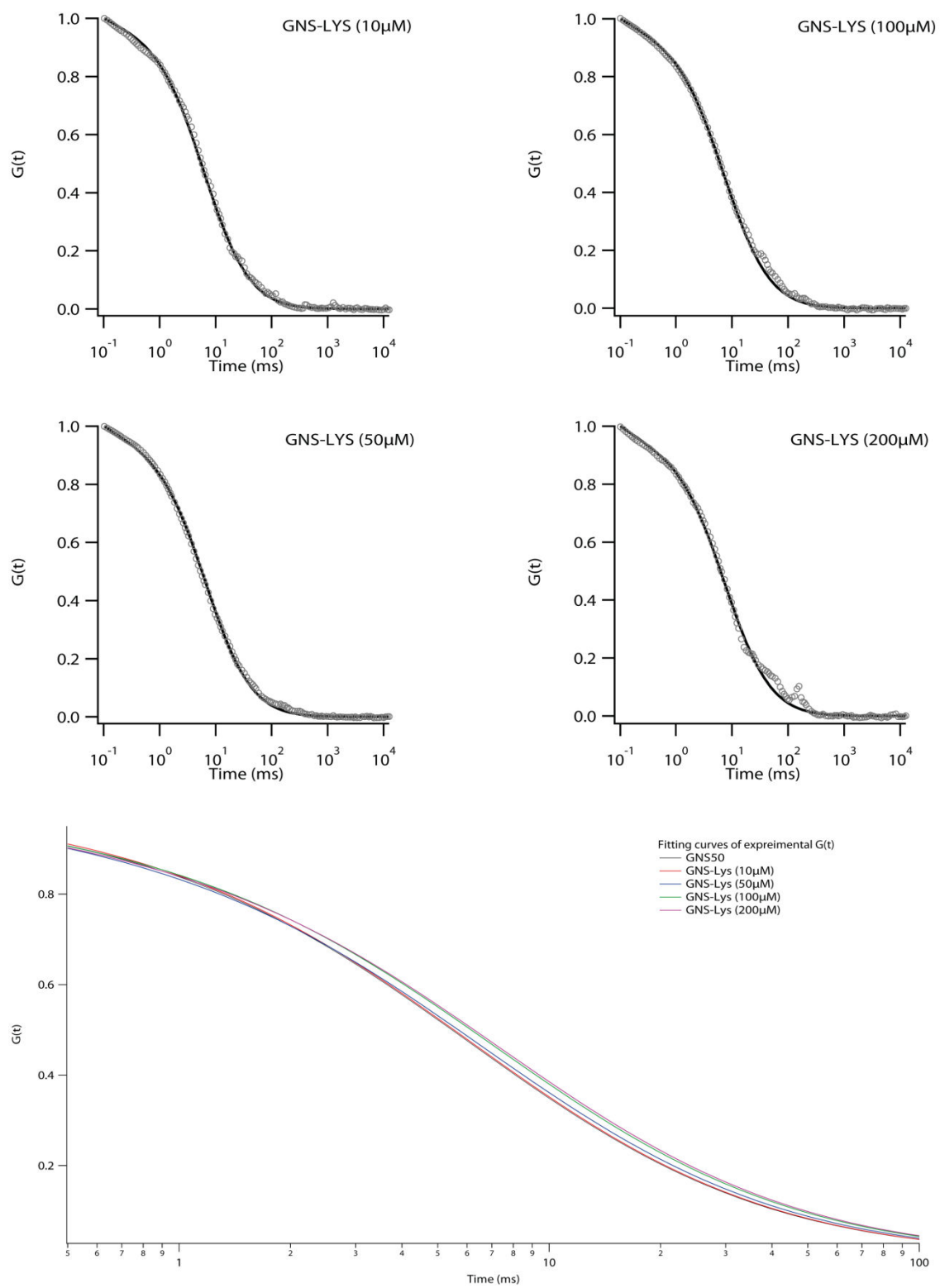


Figure S4: Cross-correlation curves of GNU incubated with different concentrations of lysozyme.

Table S2: Diffusion time values obtained from the fitting of the cross-correlation curves and the corresponding R_H values of GNS incubated with different concentrations of lysozyme.

Lysozyme	GNS	
	τ_D (± 0.03 ms)	R_H (± 0.2 nm)
1	6.15	22.5
10	6.24	22.8
20	6.35	23.2
30	6.52	23.8
40	6.57	24
50	6.73	24.6
60	6.79	24.8
70	6.86	25.0
80	7.06	25.8
100	7.26	26.5
200	7.53	27.5
400	7.59	27.7

4) **Normalized SCS curves of GNS incubated with different concentrations of α -2-hs-glycoprotein:**

Table S3: Diffusion time values obtained from the fitting of the cross-correlation curves and the corresponding R_H values of GNS incubated with different concentrations of α -2-hs-glycoprotein.

α -2-hs-glycoprotein	GNS	
	τ_D (± 0.03 ms)	R_H (± 0.2 nm)
1	6.15	22.5
2	6.16	22.6
3	6.17	22.6
4	6.70	24.5
5	7.28	26.6
6	7.75	28.3
7	8.16	29.8
8	8.25	30.1
9	8.33	30.4
10	8.36	30.5

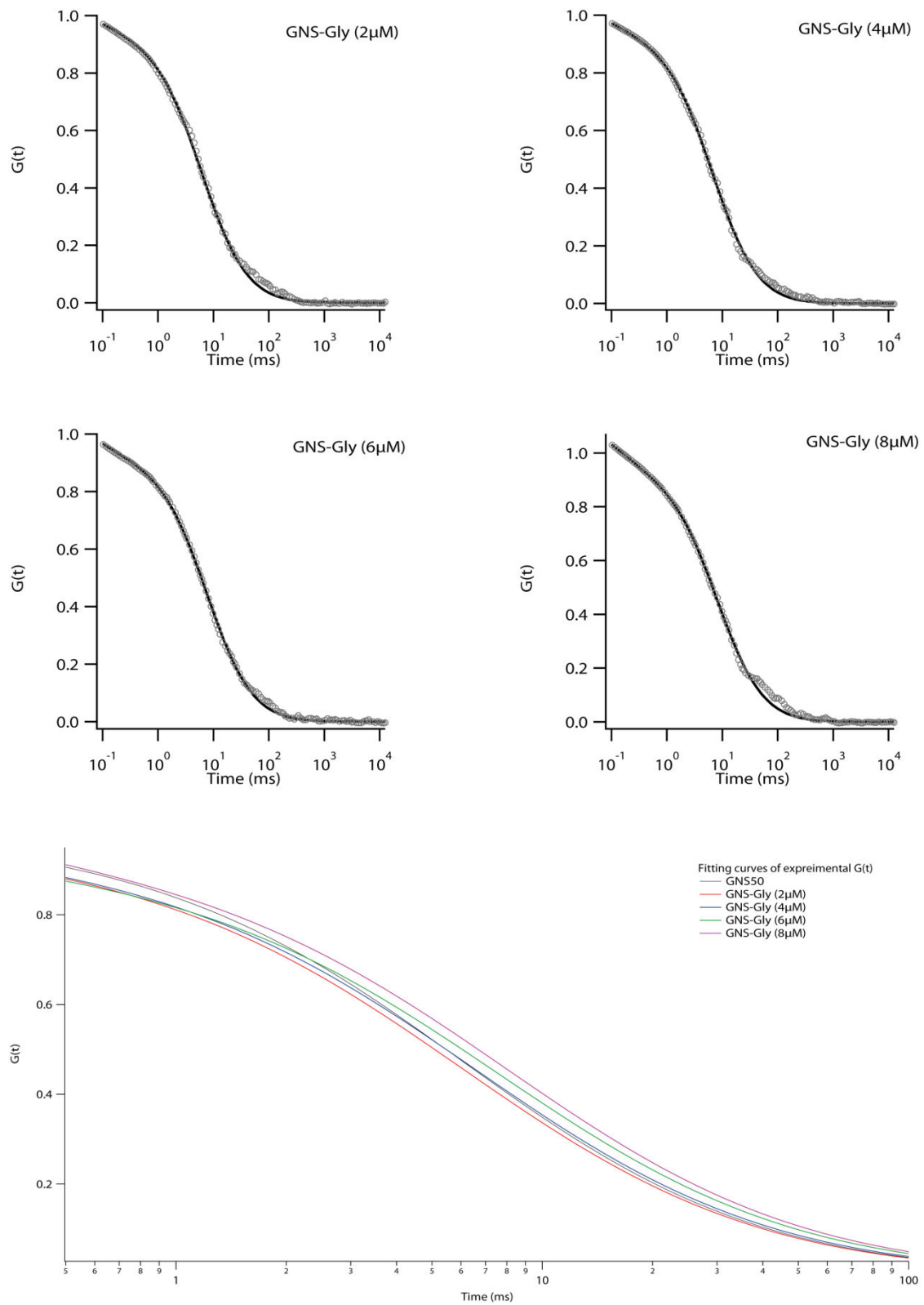


Figure S5: Cross-correlation curves of GNU incubated with different concentrations of α -2-hs-glycoprotein.

5) **Calculated values of the fitting parameter γ :**

Table S4: The coefficient γ calculated values, representing the ratio between the GNP volume (V_0) and the protein volume (V_p). For the calculations, $V_0(\text{GNS}) = 65500 \text{ nm}^3$ and $V_0(\text{GNU}) = 268000 \text{ nm}^3$.

	$V_p \text{ (nm}^3\text{)}$	γ_{GNS}	γ_{GNU}
1. HSA	~185	0.003	0.0007
2. Lysozyme	~ 38	0.0006	-
3. α -2-hs-Glycoprotein	~ 190	0.003	-

3.5 Références bibliographique

1. Matczuk, M., et al., Characterization of the protein corona of gold nanoparticles by an advanced treatment of CE-ICP-MS data. *ELECTROPHORESIS*, 2016. 37(15-16) : p. 2257-2259.
2. Fleischer, C.C. and C.K. Payne, Secondary Structure of Corona Proteins Determines the Cell Surface Receptors Used by Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2014. 118(49) : p. 14017-14026.
3. Ferrante, C., et al. BSA adsorption on gold nanoparticles investigated under static and flow conditions. in *2015 International Conference on BioPhotonics (BioPhotonics)*. 2015.
4. Carril, M., et al., In situ detection of the protein corona in complex environments. *Nature Communications*, 2017. 8(1) : p. 1542.
5. Konduru, N.V., et al., Protein corona : implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 2017. 14 : p. 42.
6. Gianneli, M., et al., Novel QCM-based Method to Predict *in Vivo* Behaviour of Nanoparticles. *Procedia Technology*, 2017. 27 : p. 197-200.
7. Ben Haddada, M., M. Salmain, and S. Boujday, Gold colloid-nanostructured surfaces for enhanced piezoelectric immunosensing of staphylococcal enterotoxin A. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 2018. 255 : p. 1604-1613.
8. Nienhaus, G.U., P. Maffre, and K. Nienhaus, Chapter Four - Studying the Protein Corona on Nanoparticles by FCS, in *Methods in Enzymology*, S.Y. Tetin, Editor. 2013, Academic Press. p. 115-137.
9. Djaker, N., et al., Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2016. 120(21) : p. 11700-11708.
10. Sadequa, S., et al., Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology*, 2015. 26(5) : p. 055101.
11. Lu, W., et al., Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres. *Biomaterials*, 2010. 31(9) : p. 2617-2626.
12. Liu, X., et al., Enhanced imaging and accelerated photothermalysis of A549 human lung cancer cells by gold nanospheres. *Nanomedicine*, 2008. 3(5) : p. 617-626.
13. Huang, X., et al., The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2007. 39(9) : p. 747-753.

14. Haustein, E. and P. Schwille, Fluorescence Correlation Spectroscopy : Novel Variations of an Established Technique. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2007. 36(1) : p. 151-169.
15. Tcherniak, A., et al., One-Photon Plasmon Luminescence and Its Application to Correlation Spectroscopy as a Probe for Rotational and Translational Dynamics of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011. 115(32) : p. 15938-15949.
16. Dominguez-Medina, S., et al., In Situ Measurement of Bovine Serum Albumin Interaction with Gold Nanospheres. *Langmuir*, 2012. 28(24) : p. 9131-9139.
17. Wang, K., et al., Single-Molecule Technology for Rapid Detection of DNA Hybridization Based on Resonance Light Scattering of Gold Nanoparticles. *ChemBioChem*, 2007. 8(10) : p. 1126-1129.
18. Etienne, E., Spectroscopie de corrélation de fluorescence sur miroir : Détection et exaltation de la luminescence de molécules biologiques individuelles diffusant en solution ou en milieu cellulaire. 2003, Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille.
19. Wawrezynieck, L., Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes : analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence. 2006, Université de la Méditerranée - Aix-Marseille.
20. Sabanayagam, C.R. and J.R. Lakowicz, Fluctuation correlation spectroscopy and photon histogram analysis of light scattered by gold nanospheres. *Nanotechnology*, 2007. 18(35) : p. 355402.
21. Kim, S.A. and P. Schwille, Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy : prospects for neuroscience. *Curr Opin Neurobiol*, 2003. 13(5) : p. 583-90.
22. Ruttinger, S., et al., Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy. *J Microsc*, 2008. 232(2) : p. 343-52.
23. Tcherniak, A., et al., Fluorescence Correlation Spectroscopy : Criteria for Analysis in Complex Systems. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(2) : p. 746-754.
24. Issaad, D., et al., Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy : Experimental and numerical study. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 2017. 145 : p. 534-542.
25. SULTANA, S., Study of Toxicity of Nanoparticles in Biological Media. 2015, Université Paris 13.
26. Boca, S., et al., Flower-shaped gold nanoparticles : synthesis, characterization and their application as SERS-active tags inside living cells. *Nanotechnology*, 2011. 22(5) : p. 055702.

27. Zhang, B., et al., Optical Trapping Effect and Its Calibration Method in Resonance Light Scattering Correlation Spectroscopy of Gold Nanoparticles in Solution. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014. 118(26) : p. 14495-14501.
28. Tripathi, A., et al., Kinetics and Reaction Mechanisms of Thiophenol Adsorption on Gold Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2013. 117(44) : p. 22834-22842.
29. Chang, C.-C., et al., Hydrothermal Synthesis of Monodispersed Octahedral Gold Nanocrystals with Five Different Size Ranges and Their Self-Assembled Structures. *Chemistry of Materials*, 2008. 20(24) : p. 7570-7574.
30. Li, S., et al., Theoretical and experimental studies on the adsorption behavior of thiophenol on gold nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007. 38(11) : p. 1436-1443.
31. Gao, W., et al., Design Principles of Inert Substrates for Exploiting Gold Clusters' Intrinsic Catalytic Reactivity. *Scientific Reports*, 2015. 5 : p. 15095.
32. Tian, F., et al., Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles : effect of particle shape. *Analytical Methods*, 2014. 6(22) : p. 9116-9123.
33. Truong, N.P., et al., The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2015. 12(1) : p. 129-142.
34. Song, W.Z., et al., Gold nanoflowers with mesoporous silica as "nanocarriers" for drug release and photothermal therapy in the treatment of oral cancer using near-infrared (NIR) laser light. *J. Nanoparticle Res.*, 2016. 18(4).
35. Xia, Y.Z., et al., Three dimensional plasmonic assemblies of AuNPs with an overall size of sub-200 nm for chemo-photothermal synergistic therapy of breast cancer. *Nanoscale*, 2016. 8(44) : p. 18682-18692.
36. Bazan-Diaz, L., et al., Gold-copper nanostars as photo-thermal agents : synthesis and advanced electron microscopy characterization. *Nanoscale*, 2015. 7(48) : p. 20734-20742.
37. Maiorano, G., et al., Monodispersed and size-controlled multibranch gold nanoparticles with nanoscale tuning of surface morphology. *Nanoscale*, 2011. 3(5) : p. 2227-2232.
38. Han, J., et al., Photothermal therapy of cancer cells using novel hollow gold nanoflowers. *Int. J. Nanomedicine*, 2014. 9 : p. 517-526.
39. Sironi, L., et al., Gold Branched Nanoparticles for Cellular Treatments. *J. Phys. Chem. C*, 2012. 116(34) : p. 18407-18418.
40. Chaudhary, A., et al., Effect of surface chemistry and morphology of gold nanoparticle on the structure and activity of common blood proteins. *New J. Chem.*, 2016. 40(6) : p. 4879-4883.

41. Garcia-Alvarez, R., et al., *In vivo* formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale*, 2018. 10(3) : p. 1256-1264.
42. Kumar, P.S., et al., High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology*, 2008. 19(1).
43. Soetan, N., et al., Morphology-Directed Catalysis with Branched Gold Nanoantennas. *J. Phys. Chem. C*, 2016. 120(19) : p. 10320-10327.
44. Van Doren, E.A.F., et al., Determination of the volume-specific surface area by using transmission electron tomography for characterization and definition of nanomaterials. *J Nanobiotechnology*, 2011. 9.
45. Ashraf, S., et al., Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake. *Nanoscale*, 2016. 8(41) : p. 17794-17800.
46. Pelaz, B., et al., Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol : Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *Acs Nano*, 2015. 9(7) : p. 6996-7008.
47. Sultana, S., et al., Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology*, 2015. 26(5).
48. Liu, H., et al., HIV-1 Tat Peptide-Gemcitabine Gold (III)-PEGylated Complex-Nanoflowers : A Sleek Thermosensitive Hybrid Nanocarrier as Prospective Anti-cancer. *Part. Part. Syst. Charact.*, 2018. DOI : 10.1002/ppsc.201800082.
49. Marguerit, G., et al., Taxanes Hybrid Nanovectors : From Design to Physico-Chemical Evaluation of Docetaxel and Paclitaxel Gold (III)-PEGylated Complex Nanocarriers. *Part. Part. Syst. Charact.*, 2018. 35(2).
50. Monteil, M., et al., Polyphosphonate ligands : From synthesis to design of hybrid PEGylated nanoparticles toward phototherapy studies. *J. Colloid Interface Sci.*, 2018. 513 : p. 205-213.
51. Walkey, C.D. and W.C.W. Chan, Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.*, 2012. 41(7) : p. 2780-2799.
52. Aggarwal, P., et al., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009. 61(6) : p. 428-437.
53. Clerc, F., et al., Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconjugate Journal*, 2016. 33(3) : p. 309-343.
54. Lai, W.J., et al., Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma : Analysis of protein corona reveals specific binding patterns. *Colloids Surf. B*, 2017. 152 : p. 317-325.

55. Cheng, X., et al., Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015. 7(37) : p. 20568-20575.
56. Casals, E., et al., Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano*, 2010. 4(7) : p. 3623-3632.
57. Rihn, B.H. and O. Joubere, Comment on "Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles". *ACS Nano*, 2015. 9(6) : p. 5634-5635.
58. Treuel, L., et al., Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle-Cell Interactions. *ACS Nano*, 2014. 8(1) : p. 503-513.
59. Motta, S., et al., What the cell surface does not see : The gene vector under the protein corona. *Colloids Surf. B*, 2016. 141 : p. 170-178.
60. Grafe, C., et al., Intentional formation of a protein corona on nanoparticles : Serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle-cell interaction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016. 75 : p. 196-202.
61. Deng, J., et al., Molecular interactions of different size AuNP-COOH nanoparticles with human fibrinogen. *Nanoscale*, 2013. 5(17) : p. 8130-8137.
62. Vroman, L., et al., INTERACTION OF HIGH MOLECULAR-WEIGHT KININOGEN, FACTOR-XII, AND FIBRINOGEN IN PLASMA AT INTERFACES. *Blood*, 1980. 55(1) : p. 156-159.
63. Yang, T., et al., Synthesis, characterization, and self-assembly of protein lysozyme monolayer-stabilized gold nanoparticles. *Langmuir*, 2007. 23(21) : p. 10533-10538.
64. Yu, G.B. and J. Zhou, Understanding the curvature effect of silica nanoparticles on lysozyme adsorption orientation and conformation : a mesoscopic coarse-grained simulation study. *PCCP*, 2016. 18(34) : p. 23500-23507.
65. Del Pino, P., et al., Protein corona formation around nanoparticles - from the past to the future. *Mater. Horizons*, 2014. 1(3) : p. 301-313.
66. Barhate, G.A., et al., Structure function attributes of gold nanoparticle vaccine association : Effect of particle size and association temperature. *Int. J. Pharm.*, 2014. 471(1-2) : p. 439-448.
67. Hirn, S., et al., Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011. 77(3) : p. 407-416.
68. Patra, A., et al., Component-Specific Analysis of Plasma Protein Corona Formation on Gold Nanoparticles Using Multiplexed Surface Plasmon Resonance. *Small*, 2016. 12(9) : p. 1174-1182.

69. Bertoli, F., et al., The Intracellular Destiny of the Protein Corona : A Study on its Cellular Internalization and Evolution. *Acs Nano*, 2016. 10(11) : p. 10471-10479.
70. Bichelberger, M.A., P. Maffre, and G.U. Nienhaus, Investigating the protein corona on nanoparticles. *Eur. Biophys. J.*, 2015. 44 : p. S68-S68.
71. Blundell, E.L.C.J., et al., Characterisation of the protein corona using tunable resistive pulse sensing : determining the change and distribution of a particle's surface charge. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016. 408(21) : p. 5757-5768.
72. Capomaccio, R., et al., Determination of the structure and morphology of gold nanoparticle-HSA protein complexes. *Nanoscale*, 2015. 7(42) : p. 17653-17657.
73. Sen, T., et al., Interaction of Gold Nanoparticle with Human Serum Albumin (HSA) Protein Using Surface Energy Transfer. *J. Phys. Chem. C*, 2011. 115(49) : p. 24037-24044.
74. Shang, L., et al., pH-dependent protein conformational changes in albumin : gold nanoparticle bioconjugates : A spectroscopic study. *Langmuir*, 2007. 23(5) : p. 2714-2721.
75. Cedervall, T., et al., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007. 104(7) : p. 2050-2055.
76. Walkey, C.D., et al., Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *Acs Nano*, 2014. 8(3) : p. 2439-2455.
77. Lira, A.L., et al., Binding kinetics of ultrasmall gold nanoparticles with proteins. *Nanoscale*, 2018. 10(7) : p. 3235-3244.
78. Issaad, D., et al., Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles : Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins. *J. Phys. Chem. C*, 2017. 121(33) : p. 18254-18262.
79. Tcherniak, A., et al., One-Photon Plasmon Luminescence and Its Application to Correlation Spectroscopy as a Probe for Rotational and Translational Dynamics of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C*, 2011. 115(32) : p. 15938-15949.
80. Djaker, N., et al., Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2016. 120(21) : p. 11700-11708.
81. Zhang, B.C., et al., Optical Trapping Effect and Its Calibration Method in Resonance Light Scattering Correlation Spectroscopy of Gold Nanoparticles in Solution. *J. Phys. Chem. C*, 2014. 118(26) : p. 14495-14501.
82. Fanali, G., et al., Human serum albumin : From bench to bedside. *Mol. Aspects Med.*, 2012. 33(3) : p. 209-290.

83. Yoshioka, Y., et al., THE COMPLETE AMINO-ACID-SEQUENCE OF THE A-CHAIN OF HUMAN-PLASMA ALPHA-2HS-GLYCOPROTEIN. *J. Biol. Chem.*, 1986. 261(4) : p. 1665-1676.
84. Haglund, A.C., B. Ek, and P. Ek, Phosphorylation of human plasma alpha(2)-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) *in vivo*. *Biochem. J.*, 2001. 357 : p. 437-445.
85. Chakraborti, S., et al., Structure and Activity of Lysozyme on Binding to ZnO Nanoparticles. *Langmuir*, 2010. 26(5) : p. 3506-3513.
86. Hankiewicz, J. and E. Swierczek, LYSOZYME IN HUMAN BODY-FLUIDS. *Clin. Chim. Acta*, 1974. 57(3) : p. 205-209.
87. Wrobel, D., et al., Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins-Human serum albumin and lysozyme. *Colloids Surf. B*, 2017. 152 : p. 18-28.
88. Mahmoudi, M., et al., Variation of Protein Corona Composition of Gold Nanoparticles Following Plasmonic Heating. *Nano Lett.*, 2014. 14(1) : p. 6-12.
89. Shannahan, J.H., et al., Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *Plos One*, 2013. 8(9).
90. Horikoshi, S. and N. Serpone, Introduction to Nanoparticles, in *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. 2013. p. 1-24.
91. Horikoshi, S.a.S., N, , Introduction to Nanoparticles, in *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. 2013.
92. Cardinal, J., et al., Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. *Surgery*, 2008. 144(2) : p. 125-132.
93. Daniel, M.-C. and D. Astruc, Gold Nanoparticles : Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2004. 104(1) : p. 293-346.
94. Kim, J.H., et al., Anti-glycation effect of gold nanoparticles on collagen. *Biol Pharm Bull*, 2012. 35(2) : p. 260-4.
95. Moustaooui, H., et al., Tunable Design of Gold(III)-Doxorubicin Complex-PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Ontological Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016. 8(31) : p. 19946-19957.
96. Spadavecchia, J., et al., Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer : from synthesis to proof-of-concept *in vitro* studies. *Int. J. Nanomed.*, 2016. 11 : p. 791-822.
97. Issaad, D., et al., Refractive effects of the Gaussian beam on the volume confinement for fluorescence correlation spectroscopy : Experimental and numerical study. *Optik*, 2017. 145 : p. 534-542.

98. Aouani, H., et al. High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres. in *Single Molecule Spectroscopy and Imaging Iii*. 2010. SPIE.
99. Bhattacharyya, S., et al., Photophysics and Dynamics of Dye-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles by Time-Resolved and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2013. 117(50) : p. 26750-26759.
100. Prashanthi, S., et al., Determination of Hydrodynamic Properties of Bare Gold and Silver Nanoparticles as a Fluorescent Probe Using Its Surface-Plasmon-Induced Photoluminescence by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 2012. 66(7) : p. 835-841.
101. Piella, J., N.G. Bastus, and V. Puntes, Size-Dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles : The Emergence of the Protein Corona. *Biochem. J.*, 2017. 28(1) : p. 88-97.
102. Shang, L. and G.U. Nienhaus, Metal nanoclusters : Protein corona formation and implications for biological applications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016. 75 : p. 175-179.
103. Winzen, S., et al., Complementary analysis of the hard and soft protein corona : sample preparation critically effects corona composition. *Nanoscale*, 2015. 7(7) : p. 2992-3001.
104. Denizli, A., et al., Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed-bed column with Cibacron Blue F3GA-Zn(II) attached poly(EGDMA-HEMA) microbeads. *React. Funct. Polym.*, 1999. 40(3) : p. 195-203.
105. Ortega-Vinuesa, J.L., P. Tengvall, and I. Lundstrom, Molecular packing of HSA, IgG, and fibrinogen adsorbed on silicon by AFM imaging. *Thin Solid Films*, 1998. 324(1-2) : p. 257-273.
106. Jiang, X., et al., Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J. Royal Soc. Interface*, 2010. 7 : p. S5-S13.
107. Maffre, P., et al., Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2011. 2 : p. 374-383.
108. Wang, H.X., et al., The Nature of a Hard Protein Corona Forming on Quantum Dots Exposed to Human Blood Serum. *Small*, 2016. 12(42) : p. 5836-5844.
109. Jiang, X.U., et al., Quantitative Study of the Protein Corona on Engineered Nanoparticles. *Biophys. J.*, 2010. 98(3) : p. 403A-+.
110. Rocker, C., et al., A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, 2009. 4(9) : p. 577-580.

111. Nienhaus, G.U., P. Maffre, and K. Nienhaus, Studying the Protein Corona on Nanoparticles by FCS, in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy, S.Y. Tetin, Editor. 2013. p. 115-137.
112. Adkins, J.N., et al., Toward a human blood serum proteome - Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics, 2002. 1(12) : p. 947-955.

Chapitre 4

Les nanoparticules d'or pour une application d'hyperthermie

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le transfert de chaleur des nanoparticules vers un milieu environnant est un processus fondamental dans de nombreuses applications médicales telles que la libération contrôlée de médicament ou encore le traitement hyperthermique. L'hyperthermie est une approche utilisée dans le traitement du cancer. Cette méthode est non invasive et les tissus sont alors exposés à des températures élevées (entre 41 et 48 °C) afin de favoriser la destruction sélective des cellules anormales. Les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux effets de températures que les cellules normales en raison de leur taux métabolique plus élevé. Il existe plusieurs méthodes hyperthermiques telles que l'irradiation par micro-onde [1], les impulsions RF [2, 3] ou encore les ultrasons [4, 5]. Cependant, ces techniques produisent des effets indésirables sur les tissus environnants (normaux) du fait de leur nature diffusive.

L'utilisation de laser dans le proche infrarouge permet de faire pénétrer l'énergie avec une intensité suffisante et une grande précision spatiale. Cependant, la faible absorption de la lumière proche infrarouge par les tumeurs nécessite un apport énergétique élevé afin de produire un effet hyperthermique suffisant. Pour que ce traitement par laser proche infrarouge soit sûr et viable cliniquement, il faut que l'effet hyperthermique soit intensifié et fortement localisé afin d'augmenter l'absorption de l'énergie dans les tumeurs.

Parmi toutes les nanoparticules, celles en or sont de plus en plus utilisées en raison de leurs propriétés optiques, chimiques et thermiques. En effet, les nanoparticules d'or sont capables de convertir rapidement l'énergie lumineuse absorbée en énergie thermique (de l'ordre du picoseconde), à travers l'excitation des plasmons de surface et afin que la chaleur soit transférée dans le milieu environnant. Ceci fait des nanoparticules d'or d'excellents agents pour le traitement du cancer par hyperthermie. En effet, le rendement quantique des particules d'or étant faible, la totalité de l'énergie absorbée par les nanoparticules sera convertie en chaleur par effet joule. Toutefois, l'efficacité de chauffage

des nanoparticules d'or dépend à la fois de la position du plasmon de surface et de la longueur d'onde lumineuse excitatrice. Il est alors nécessaire d'ajuster la taille et la forme des nanoparticules afin d'augmenter l'interaction de la lumière avec la nanoparticule afin d'optimiser l'augmentation de température générée par la nanoparticule.

Des travaux récents de G. Baffou et al, montrent l'influence de la section efficace d'absorption (σ_{abs}) sur l'élévation de température (T) induite par une nanoparticule d'or sous excitation laser [6] :

$$\Delta T = \frac{\sigma_{abs} \cdot I}{4 \cdot \pi \cdot \kappa \cdot r_{eff}} \quad (\text{Equation 4.1})$$

Où I est l'éclairage de la lumière excitatrice, κ est la conductivité thermique de l'or et r_{eff} est un paramètre géométrique caractéristique de la forme de la nanoparticule.

Il s'agit dans ce chapitre d'étudier l'effet hyperthermique induit par les nanoparticules d'or pour détruire les tumeurs localisées. Pour cela, une première partie sera consacrée à l'évaluation du pouvoir thermique des nanoparticules suivant la taille et la forme des nanoparticules. Des mesures d'augmentation de température, par excitation lumineuse, ont été réalisées pour différents types de nanoparticules d'or dans l'eau. Une deuxième partie sera consacrée à une application de l'effet thermique de nanoparticules synthétisées à partir de la méthode de complexation établie et étudiée dans le chapitre 2. Dans ce cas l'agent thérapeutique est un bisphosphonate. En effet, cette molécule présenterait une activité antitumorale en induisant des effets antiprolifératifs et apoptotiques des cellules cancéreuses [7-9]. Après synthèse et caractérisation des nanoparticules d'or à base de bisphosphonates, ces nanoparticules ont été internalisées dans des cellules cancéreuses du pancréas afin d'étudier leur activité photothermique au sein des cellules.

Ces deux travaux seront présentés sous forme d'article.

4.1 Evaluation du pouvoir thermique des nanoparticules en fonction de leurs tailles et de leurs formes

Publication : Shape and Size Effect on Temperature Elevation of Gold Nanoparticles : Comparative Study between Spherical and Urchin-shaped Gold Nanoparticles.

Shape and Size Effect on Temperature Elevation of Gold Nanoparticles: Comparative Study between Spherical and Urchin-shaped Gold Nanoparticles.

Hanane Moustouia^a, Justine Saber^a, Ines, Djeddi^a, Qiqian Liu^{a,b}, Jolanda Spadavecchia^a, Marc Lamy de la Chapelle^{a,b,c} and Nadia Djaker^{*a}

^a Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France.

^b Department of Clinical Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China

^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM - UMR CNRS 6283), Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 148388526; E-mail address: nadia.djaker@univ-paris13.fr

Abstract

Gold nanoparticles (GNP) are very suitable agents for thermal destruction of cancer cells due to their photothermal heating ability. In this work, photothermal properties of different sizes and shapes of GNP were studied regarding different parameters such as GNP concentration, laser excitation power and heating time. GNP were first characterized by TEM and UV-vis spectroscopy, after that, the temperature elevation for each type of GNP was recorded at different time, laser power and GNP concentration. The absorption cross section (σ_{abs}) of two different sizes of spherical gold nanoparticles (GNS) were measured and compared with the theoretical calculations based on Mie theory and both results were in a good agreement. We have experimentally measured σ_{abs} for gold nano-urchins (GNU) with different sizes (50, 80 and 90nm), the results show that the absorption properties of branched particles are stronger than spherical ones. Finally, the temperature elevation speed values were experimentally measured for all GNP and we have demonstrated that they depend linearly with the GNP surface area as demonstrated in the classical diffusive heat transport theory. The proposed approaches can be used for monitoring of local hyperthermia in the case of application of nanovectors of different shapes/structures in the photothermal therapy. Furthermore, the experimental reports on branched shapes such as GNU, can be useful for a better understanding of their photothermal properties.

1. Introduction

Recently, different types of nanovectors based on gold nanoparticles (GNP) showed a large field of applications in cancer treatment.¹⁻³ Owing to their unique optical and thermal properties which can be adjusted by changing their size, shape or surface chemistry, they became the best candidates for cancer photothermal therapy.⁴⁻⁵ This thermal treatment consist in keeping the temperature of a tumor at minimum 41°C (temperature elevation of minimum of 4°C in the body) to cause an oxidative damage due to the increment of the intracellular density of reactive oxygen species.⁶⁻⁷ This resulting to a long term cell inactivation and finally tumor cells death.⁸⁻⁹

The Photothermal properties of GNP are directly relied to their ability to convert the absorbed light into heat. When an electromagnetic field of propagating light interacts with GNP, it causes a collective

oscillation of electrons at the surface of the nanoparticle, which commonly called the localized surface plasmon resonance (SPR). If the light frequency matches with the electron oscillation frequency, GNP present a strong absorption and scattering light.¹⁰⁻¹³

These optical properties due to the surface plasmon resonance affect directly the heat generation of GNP. A strong light absorption leads to a high photon to heat conversion, especially when using a continuous wave laser, heat is generated and dissipated into the environment continuously. Hence, the surrounding medium temperature is increased by tens of degrees.¹⁴⁻¹⁵ Depending on the interaction of GNP and the laser, GNP and the surrounding medium experience several possible physical phenomena, such as thermal expansion¹⁶⁻¹⁷ or vapor bubble formation.¹⁸⁻²¹

Since the heating efficiency depends on SPR and excitation wavelength, size and shape of GNP can be tuned to increase the temperature generation by increasing the absorption cross-section of the GNP (σ_{abs}). Theoretically, for a spherical gold nanoparticle, the total absorption power P is described as $P = \sigma_{abs} \cdot I$, where, I is the irradiance of the excitation laser (fixed by the experimental setup).^{16, 22-23}

While a lot of efforts were made to understand the temperature elevation on well-defined shapes of GNP, especially using numerical tools, temperature elevation of complex-shaped (branched) GNP remains challenging.²²⁻²⁴ Elongated or sharp nanoparticles are much more efficient heaters than smooth GNP because the laser electric field penetrates more easily inside the thin nanostructures making the whole amount of gold matter involved in heating.²⁵ This makes branched gold nanoparticles most appropriate agents for photothermal therapy.²⁶⁻²⁸

Therefore, we investigate in this work how concentration, shape and size of GNP influence the temperature elevation in water. Theoretical calculations based on Mie theory and experimental measurements of the absorption cross-section (σ_{abs}) of spherical (GNS) and urchin-shaped (GNU) gold nanoparticles were reported. We have demonstrated that σ_{abs} is increased by 60-80% and the temperature elevation speed in water (Ψ) is increased by 80% in GNU compared to GNS. Understanding how to control the temperature elevation of branched GNP is fundamental to manufacturing optimal nanovectors for Photothermal therapy.

2. Experimental methods

2.1. Material.

Five citrate-stabilized GNP with different shapes (spheres -GNS- and urchins -GNU-) and diameters (50, 80 and 90 nm) were obtained from Sigma-Aldrich (ref products: 753645, 753661, 795380, 797707, 797723). The GNP were diluted to the desired concentration (10 to 60 pM) in ultrapure molecular biology grade water (Gibco).

2.2. Characterization.

GNP concentrations were obtained by measuring the optical extinction spectra using a UV-Vis spectrometer (Kontron Instr. France) on a spectral range from 400 to 800 nm. Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded with a JEOL JEM 1011 microscope operating (JEOL, Tokyo, Japan) as previously described by the authors²⁹⁻³⁰.

2.3. Photothermal heating set up.

Aqueous solutions of GNS and GNU (700 μL) with different concentrations (0, 10, 25, 50 and 60 μM) were introduced in a quartz cuvette and irradiated with an 808 nm continuous laser (FocusLight, China) at different laser irradiances (0.5, 1, 2, and 3 W/cm^2) for 15 minutes at room temperature (23°C or 296°K). The temperature was recorded every 30 second with a digital thermometer using a thermocouple probe (Hanna Instruments, USA) with an accuracy of 0.1 °C (see the setup in figure S1 in the supporting information).

3. Results and Discussion

3.1. GNP Characterization.

The GNP were characterized using TEM and UV-Vis spectroscopy as shown in Figure 1. The shape and size informations given by the supplier were confirmed as shown in Figure 1 a) and b). The GNS were mostly spherical and GNU have branched shape. The sizes were confirmed also by the measurement of the peak of the surface plasmon resonance (SPR) of the GNP as shown in Figure 1 c). The maximum SPR wavelengths are in a good agreement with the GNP shape and diameters as presented in the product technical specifications (reported is table S1, see supporting information).

3.2. GNP heating measurements under laser illumination.

During laser heating of GNP suspended in water, the optical energy is converted to thermal energy through the surface plasmon resonance which raises the GNP temperature and then the heat is transferred to the surrounding medium (water). The measurement of the different values of the temperature raise ΔT ($\Delta T = T(\text{after 15 minutes}) - T(0)$, with $T(0) = 296^\circ\text{K}$) at different concentration (10 to 60 μM) of GNP excited with different laser powers (0.5, 1, 2 and 3W) is shown in Figure 2. While the temperature elevation in water (without GNP) show a maximum of 4°K at maximum of laser power (3W), in the case of GNP, the temperature elevation increases linearly with the GNP concentration (number of emitters). The red line denotes the minimum of temperature elevation for the photothermal therapy application^{3, 31}. Branched nanoparticles (GNU) show a higher temperature elevation than spherical shaped nanoparticles (GNS) with the same size. This is because the temperature elevation is directly related to the plasmon surface resonance and the excitation wavelength. More the peak of SPR is close to the laser wavelength (GNU), more the optical-thermal energy conversion is increased as reported in^{24, 32}.

The linear fit of these curves shows an increase of the slope by increasing the excitation power for each type of GNP. The different values of slopes present the temperature elevation per picomolar of GNP ($\text{K}^\circ/\mu\text{M}$). By taking into account the solution volume (700 μL) and Avogadro number (N_A), we can calculate the temperature elevation of water per nanoparticle using the following equation:

$$\Delta T_{w/NP} (\text{K}^\circ/NP) = \frac{\Delta T_{w/pM} (\text{K}^\circ/pM)}{N_A \times \text{Volume}} \quad (1)$$

Figure 3 shows these slope values (α for GNS and α' for GNU) of temperature elevation per picomolar ($\Delta T_{w/pM}$) and per nanoparticle ($\Delta T_{w/NP}$) at different excitation powers. These curves show the linear dependence of the temperature elevation of water per nanoparticle ($\Delta T_{w/NP}$) with the laser irradiance. Considering the theoretical model of temperature conservation between water and gold surface

(detailed calculations were given in the supporting information), the temperature elevation in water ($\Delta T_{W/NP}$) and the temperature at the surface of a gold nanoparticle (ΔT_{NP}) are related by the following equation:³³

$$\Delta T_{NP} = 7.6 \cdot 10^5 \Delta T_{W/NP} \quad (2)$$

We can write, then:

$$\Delta T_{NP} = 7.6 \cdot 10^5 \left(\frac{\Delta T_{W/pM}}{N_A \times \text{Volume}} \right) \quad (3)$$

Otherwise, the uniform temperature increase of a uniform gold nanosphere with a radius R, generated by the total absorption power P was described by the theoretical models given by Baffou et al.²²⁻²³:

$$\Delta T_{NP} = \frac{P}{4\pi R \kappa_w} = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi R \kappa_w} = \alpha \cdot I \quad (4)$$

Where σ_{abs} is the absorption cross section and I is the irradiance of the excitation light. This temperature elevation is produced by a uniformly charged sphere in a homogeneous medium of effective permittivity, in this case, water ($\kappa_w = 0.6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

In the case of a non-spherical nanoparticle, a dimensionless thermal-capacitance coefficient was introduced as β and R_{eq} is chosen as the radius of a sphere with the same volume as the particle. Hence the temperature elevation was expressed as²³:

$$\Delta T'_{NP} = \frac{P}{4\pi R_{eq} \beta \kappa_w} = \frac{\sigma'_{abs} I}{4\pi R_{eq} \beta \kappa_w} = \alpha' \cdot I \quad (5)$$

From equation 4 and 5, we can obtain that for GNS, the absorption cross section is expressed as:

$$\sigma_{abs} = \alpha 4\pi R \kappa_w \quad (6)$$

While for GNU, we can write:

$$\sigma'_{abs} = \alpha' 4\pi R_{eq} \kappa_w \quad (7)$$

The temperature elevation curves per nanoparticle (ΔT_{NP}) at different excitation densities shown in Figure 3 were fitted linearly and the slopes α and α' were extracted to calculate the experimental absorption cross sections: σ_{abs} and σ'_{abs} for each GNP by using equations 6 and 7 and are presented in table 1.

The experimental cross section of 50GNS is about $(0,71 \pm 0.15) \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$ which is comparable to the estimated theoretical value, $0,67 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$, by calculations made using Mie theory (see supporting information, Figure S2). Also, for 80GNS, experimental value of σ is about $(4,04 \pm 0.24) \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$ which very close to the theoretical value $3,54 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$. In the case of complex shape (GNU), the experimental value of σ for the same effective size is increased by a factor of 5 for 50GNU (compared to the theoretical value $0.67 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$), a factor of 3 for 80GNU and a factor of 2.5 for 90GNU. This increase is due to branched shape which involves more hot points on the nanoparticle. These results demonstrate that branched nanoparticles lead to an enhancement of optical properties as already reported in³⁴⁻³⁷ and demonstrated by the authors^{10, 38}.

Figure 4 shows the temperature elevation $\Delta T(t)$ during 15 minutes of 50 pM of GNP (corresponding to $2 \cdot 10^{10}$ GNP in 700 μL of water) at 1W and 2W excitation powers ($\Delta T(t) = T(t) - T(0)$, with $T(0) = 296^\circ\text{K}$). From 0 to approximately 5 minutes the temperature rises linearly in time after that it stabilizes after 10 minutes. The linear progression of temperature elevation in the first few minutes was fitted by a linear

curve passing via the origin (dashed lines in figure 4 a and b). The slopes values (Ψ) of the fitting curves were presented in Figure 4 c for each type of GNP at the two excitation powers. These values represent the temperature elevation speed Ψ (K° per minute) in the first 5 minutes for each type of GNP. In Figure 4 c, we can see that for the same size (50 or 80 nm), Ψ is 80% higher for GNU than for GNS independently of laser power. The branched shape of GNU gives a higher temperature elevation speed of about 80% than the spherical shape with the same size. Even if the GNP sizes (effective diameters) were the same, the branched shape exhibits more contact surface with water than the spherical one. Otherwise, GNU present more hot points than GNS which contribute also to a higher conversion of the Photothermal energy.

For a same shape and by comparing the size differences (50GNU, 80GNU and 90GNU), the temperature elevation speed Ψ is linear with the effective GNP surface (GNU Ψ versus surface curves were presented in Figure S3 in the supporting information). These results are in a good agreement with the theory of the classical diffusive heat transport (Fourier's law) reported in ²⁴, which describes the diffused heat by a gold nanoparticle as a function of the particle surface and the thermal conductivity.

4. Conclusion

The temperature elevation of gold nanoparticles depends on many parameters as shape, size and excitation wavelength and power. In this work, the optical and thermal properties of different shapes and sizes of GNP have been investigated. We have shown that the temperature elevation depends not only on the GNP SPR position regarding the excitation wavelength but also on the GNP shape and surface. We have achieved an experimental measurement of the absorption cross section of a complex shaped nanoparticles (GNU) and also spherical shaped nanoparticles (GNS) which were in a good agreement with the theoretical calculations based on Mie theory. The results confirmed that the temperature elevation speed is also depending on GNP properties and GNU present higher thermo-optical conversion properties than GNS. We have shown that the experimental values of the temperature elevation speed are depending linearly with the GNP surface as already described in the theory. This work contributes to further insight to understand macroscopic photothermal effects such as tumor tissues damage or drogue release in the case of Photothermal therapy.

Acknowledgements

.....

References

- (1) Han, J.; Li, J.; Jia, W.; Yao, L.; Li, X.; Jiang, L.; Tian, Y., Photothermal therapy of cancer cells using novel hollow gold nanoflowers. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 517-526.
- (2) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23* (3), 217-228.
- (3) Jaque, D.; Martinez Maestro, L.; del Rosal, B.; Haro-Gonzalez, P.; Benayas, A.; Plaza, J. L.; Martin Rodriguez, E.; Garcia Sole, J., Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9494-9530.

- (4) Liu, H.; Jiang, P.; Li, Z.; Li, X.; Djaker, N.; Spadavecchia, J., HIV-1 Tat Peptide-Gemcitabine Gold (III)-PEGylated Complex—Nanoflowers: A Sleek Thermosensitive Hybrid Nanocarrier as Prospective Anticancer. *Part. Part. Syst. Charact.* **2018**, *0* (0), 1800082.
- (5) Singh, R.; Nalwa, H. S., Medical Applications of Nanoparticles in Biological Imaging, Cell Labeling, Antimicrobial Agents, and Anticancer Nanodrugs. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7* (4), 489-503.
- (6) Sapareto, S. A.; Dewey, W. C., Thermal dose determination in cancer therapy. *IJROBP* **1984**, *10* (6), 787-800.
- (7) Wang, X. H.; Peng, H. S.; Yang, W.; Ren, Z. D.; Liu, Y. A., Preparation of Gold Nanoparticles-Attached Phosphorescent Nanospheres for Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapy. *Nanosci. Nanotech. Lett.* **2017**, *9* (3), 227-232.
- (8) Monteil, M.; Moustououi, H.; Picardi, G.; Aouidat, F.; Djaker, N.; de la Chapelle, M. L.; Lecouvey, M.; Spadavecchia, J., Polyphosphonate ligands: From synthesis to design of hybrid PEGylated nanoparticles toward phototherapy studies. *J. Coll. Inter. Sci.* **2018**, *513*, 205-213.
- (9) Ong, Z. Y.; Chen, S.; Nabavi, E.; Regoutz, A.; Payne, D. J.; Elson, D. S.; Dexter, D. T.; Dunlop, I. E.; Porter, A. E., Multibranching Gold Nanoparticles with Intrinsic LAT-1 Targeting Capabilities for Selective Photothermal Therapy of Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (45), 39259-39270.
- (10) Issaad, D.; Moustououi, H.; Medjahed, A.; Lalaoui, L.; Spadavecchia, J.; Bouafia, M.; de la Chapelle, M. L.; Djaker, N., Scattering Correlation Spectroscopy and Raman Spectroscopy of Thiophenol on Gold Nanoparticles: Comparative Study between Nanospheres and Nanourchins. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (33), 18254-18262.
- (11) Juluri, B. K.; Zheng, Y. B.; Ahmed, D.; Jensen, L.; Huang, T. J., Effects of geometry and composition on charge-induced plasmonic shifts in gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (19), 7309-7317.
- (12) 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* **2003**, *107* (3), 668-677.
- (13) Kreibig, U.; Vollmer, M., *Optical properties of metal clusters*. Springer: New York, 1995.
- (14) Abadeer, N. S.; Murphy, C. J., Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (9), 4691-4716.
- (15) Bucharskaya, A.; Maslyakova, G.; Terentyuk, G.; Yakunin, A.; Avetisyan, Y.; Bibikova, O.; Tuchina, E.; Khlebtsov, B.; Khlebtsov, N.; Tuchin, V., Towards Effective Photothermal/Photodynamic Treatment Using Plasmonic Gold Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (8).
- (16) Baffou, G.; Rigneault, H., Femtosecond-pulsed optical heating of gold nanoparticles. *Phys. Rev. B* **2011**, *84* (3).
- (17) Govorov, A. O.; Zhang, W.; Skeini, T.; Richardson, H.; Lee, J.; Kotov, N. A., Gold nanoparticle ensembles as heaters and actuators: melting and collective plasmon resonances. *Nanoscale Res. Lett.* **2006**, *1* (1), 84-90.
- (18) Chen, X.; Munjiza, A.; Zhang, K.; Wen, D., Molecular Dynamics Simulation of Heat Transfer from a Gold Nanoparticle to a Water Pool. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (2), 1285-1293.
- (19) Kotaidis, V.; Dahmen, C.; von Plessen, G.; Springer, F.; Plech, A., Excitation of nanoscale vapor bubbles at the surface of gold nanoparticles in water. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (18).
- (20) Lukianova-Hleb, E.; Hu, Y.; Latterini, L.; Tarpani, L.; Lee, S.; Drezek, R. A.; Hafner, J. H.; Lapotko, D. O., Plasmonic Nanobubbles as Transient Vapor Nanobubbles Generated around Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4* (4), 2109-2123.
- (21) Lukianova-Hleb, E. Y.; Anderson, L. J. E.; Lee, S.; Hafner, J. H.; Lapotko, D. O., Hot plasmonic interactions: a new look at the photothermal efficacy of gold nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (38), 12237-12244.
- (22) Baffou, G.; Quidant, R., Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser Photonics Rev.* **2013**, *7* (2), 171-187.
- (23) Baffou, G.; Quidant, R.; Javier Garcia de Abajo, F., Nanoscale Control of Optical Heating in Complex Plasmonic Systems. *ACS Nano* **2010**, *4* (2), 709-716.

- (24) Palpant, B.; Guillet, Y.; Rashidi-Huyeh, M.; Prot, D., Gold nanoparticle assemblies: Thermal behaviour under optical excitation. *Gold Bull.* **2008**, *41* (2), 105-115.
- (25) Van de Broek, B.; Devoogdt, N.; D'Hollander, A.; Gijs, H. L.; Jans, K.; Lagae, L.; Muyldermans, S.; Maes, G.; Borghs, G., Specific Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4319-4328.
- (26) Chen, X. J.; Li, G. L.; Han, Q. H.; Li, X. L.; Li, L.; Wang, T. T.; Wang, C. G., Rational Design of Branched Au-Fe₃O₄ Janus Nanoparticles for Simultaneous Trimodal Imaging and Photothermal Therapy of Cancer Cells. *Chem. Euro. J.* **2017**, *23* (68), 17204-17208.
- (27) Jang, Y.; Lee, N.; Kim, J. H.; Il Park, Y.; Piao, Y., Shape-Controlled Synthesis of Au Nanostructures Using EDTA Tetrasodium Salt and Their Photothermal Therapy Applications. *Nanomaterials* **2018**, *8* (4).
- (28) Yang, D. P.; Liu, X.; Teng, C. P.; Owh, C.; Win, K. Y.; Lin, M.; Loh, X. J.; Wu, Y. L.; Li, Z. B.; Ye, E. Y., Unexpected formation of gold nanoflowers by a green synthesis method as agents for a safe and effective photothermal therapy. *Nanoscale* **2017**, *9* (41), 15753-15759.
- (29) Moustou, H.; Movia, D.; Dupont, N.; Bouchemal, N.; Casale, S.; Djaker, N.; Savarin, P.; Prina-Mello, A.; de la Chapelle, M. L.; Spadavecchia, J., Tunable Design of Gold(III)-Doxorubicin Complex-PEGylated Nanocarrier. The Golden Doxorubicin for Ontological Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (31), 19946-19957.
- (30) Spadavecchia, J.; Movia, D.; Moore, C.; Maguire, C. M.; Moustou, H.; Casale, S.; Volkov, Y.; Prina-Mello, A., Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. *Int. J. Nanomed* **2016**, *11*, 791-822.
- (31) Yeo, E. L. L.; Cheah, J. U. J.; Neo, D. J. H.; Goh, W. I.; Kanchanawong, P.; Soo, K. C.; Thong, P. S. P.; Kah, J. C. Y., Exploiting the protein corona around gold nanorods for low-dose combined photothermal and photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (2), 254-268.
- (32) Guillet, Y.; Rashidi-Huyeh, M.; Prot, D.; Palpant, B., Gold nanoparticle assemblies: interplay between thermal effects and optical response. *Gold Bull.* **2008**, *41* (4), 341-348.
- (33) Lienhard IV, J. H., *A heat transfer textbook*. Lienhard V, J.H.: Cambridge, Massachusetts, USA, 2001.
- (34) Hao, E.; Bailey, R. C.; Schatz, G. C.; Hupp, J. T.; Li, S. Y., Synthesis and optical properties of "branched" gold nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4* (2), 327-330.
- (35) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (14), 7238-7248.
- (36) Nehl, C. L.; Liao, H. W.; Hafner, J. H., Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. *Nano Lett.* **2006**, *6* (4), 683-688.
- (37) Senthil Kumar, P.; Pastoriza-Santos, I.; Rodriguez-Gonzalez, B.; Garcia de Abajo, F. J.; Liz-Marzan, L. M., High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1).
- (38) Djaker, N.; Sultana, S.; Issaad, D.; Boca, S.; Moustou, H.; Spadavecchia, J.; Medjahed, A.; Bouafia, M.; Astilean, S.; de la Chapelle, M. L., Spherical and Flower-Shaped Gold Nanoparticles Characterization by Scattering Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (21), 11700-11708.

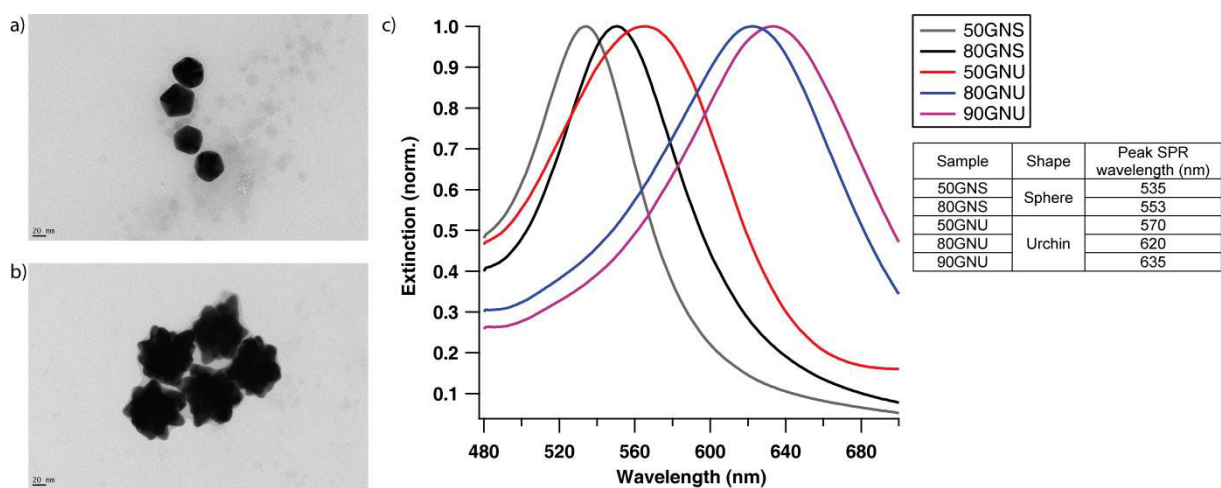


Figure 1: TEM images of 50GNS (a), 80GNU (b) and normalized extinction spectra of different sizes of used GNP (c).

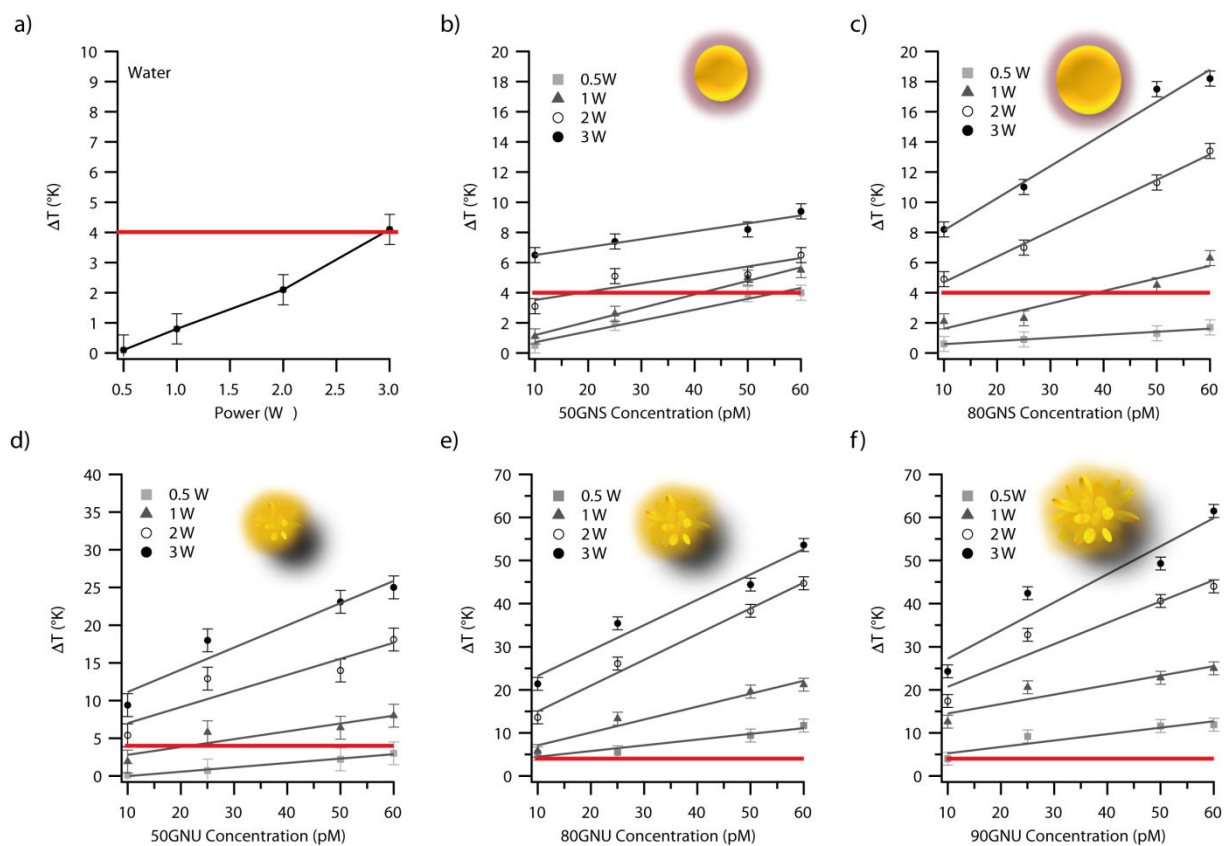


Figure 2: Temperature elevation in water curves after 15 minutes of excitation with different excitation powers (0.5, 1, 2 and 3 W) in water (a), 50GNS (b), 80GNS (c), 50GNU (d), 80GNU (e) and 90GNU (f). The red line denotes the minimum temperature for the photothermal therapy.

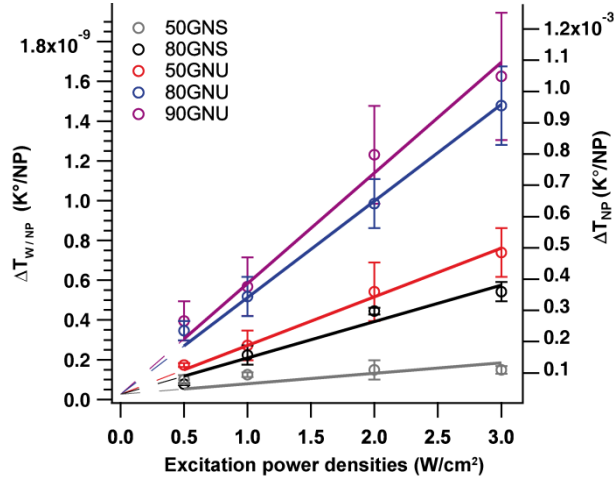


Figure 3: Temperature elevation in water curves per nanoparticle $\Delta T_{W/NP}$ (left axis) and temperature elevation curves of a gold nanoparticle ΔT_{NP} (right axis) at different excitation powers densities obtained from the linear fit of Figure 1 and calculated by using equation 1 and 2.

Table 1:

	Experimental values of α (K°.m²/ watt)	Experimental absorption Coefficient σ_{abs} (m²) calculated using equ. 8 and 9
50GNS	$\alpha = (0.38 \pm 0.08) 10^{-9}$	$\sigma_{abs} = (0.71 \pm 0.15) 10^{-16}$
80GNS	$\alpha = (1.34 \pm 0.08) 10^{-9}$	$\sigma_{abs} = (4.04 \pm 0.24) 10^{-16}$
50GNU	$\alpha' = (1.80 \pm 0.05) 10^{-9}$	$\sigma_{abs} = (3.39 \pm 0.09) 10^{-16}$
80GNU	$\alpha' = (3.56 \pm 0.08) 10^{-9}$	$\sigma_{abs} = (10.73 \pm 0.24) 10^{-16}$
90GNU	$\alpha' = (4.08 \pm 0.10) 10^{-9}$	$\sigma_{abs} = (13.84 \pm 0.34) 10^{-16}$

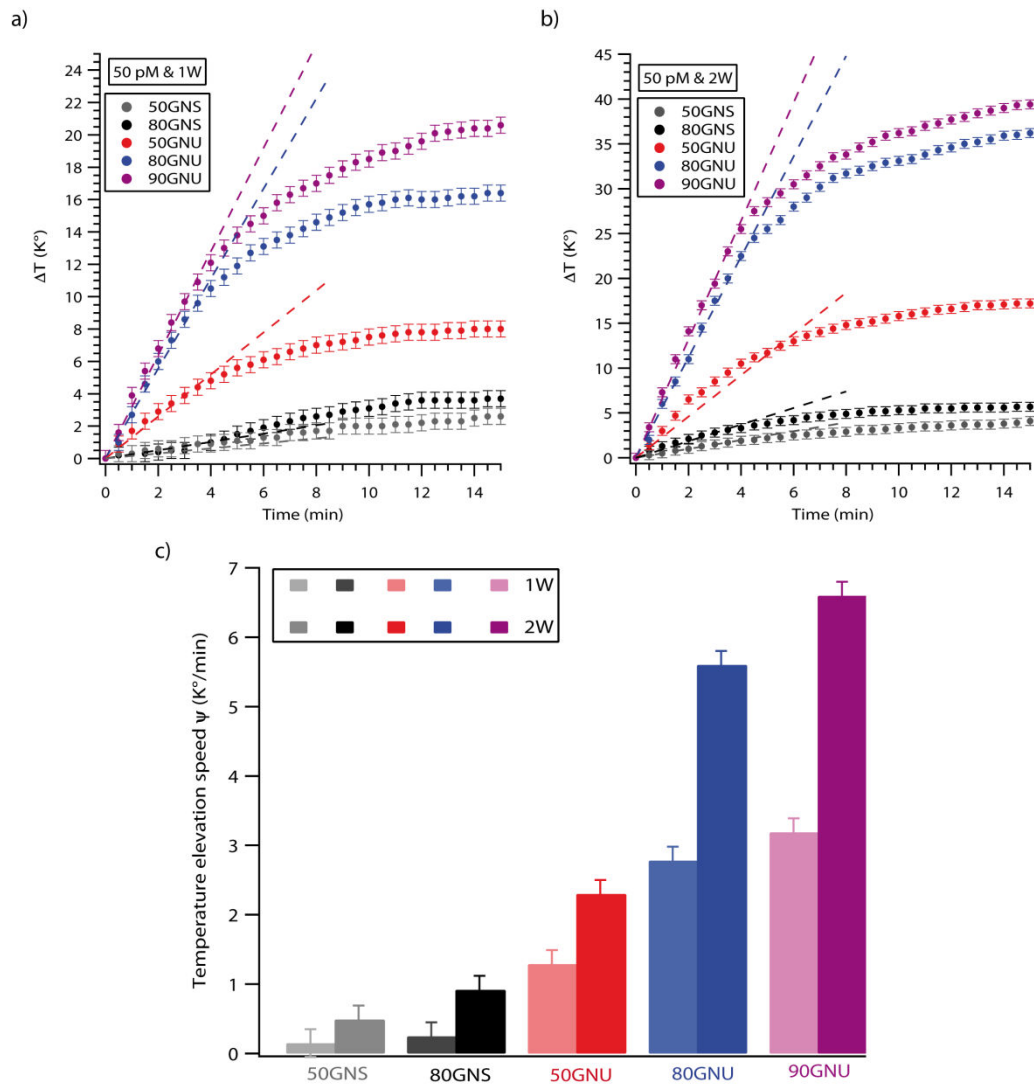


Figure 4: Temperature elevation in water curves of 50 pM GNP during time excited with 1W (a) and 2W (b) laser power (dashed lines are the linear fitting of the temperature elevation curves). Calculated temperature elevation speeds in water from curves fitting in a) and b) for all GNP (c).

SUPPORTING INFORMATION

Shape and Size Effect on the Temperature Elevation of Gold Nanoparticles: Comparative Study Between Spherical and Urchin-shaped Gold Nanoparticles.

Hanane Moustouia^a, Justine Saber^a, Ines, Djeddi^a, Qiqian Liu^{a,b}, Jolanda Spadavecchia^a, Marc Lamy de la Chapelle^{a,b,c} and Nadia Djaker^{*a}

^a Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire CSPBAT, CNRS (UMR 7244), 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France.

^b Department of Clinical Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China

^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM - UMR CNRS 6283), Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 148388526;. E-mail address: nadia.djaker@univ-paris13.fr

This document contains information and figures regarding the Photothermal heating set up, the numerical calculation of extinction, absorption and scattering coefficients based on Mie theory and the experimental measurements of the temperature elevation speed versus gold nanoparticles surface.

1) The experimental set up used for Photothermal heating of gold nanoparticles:

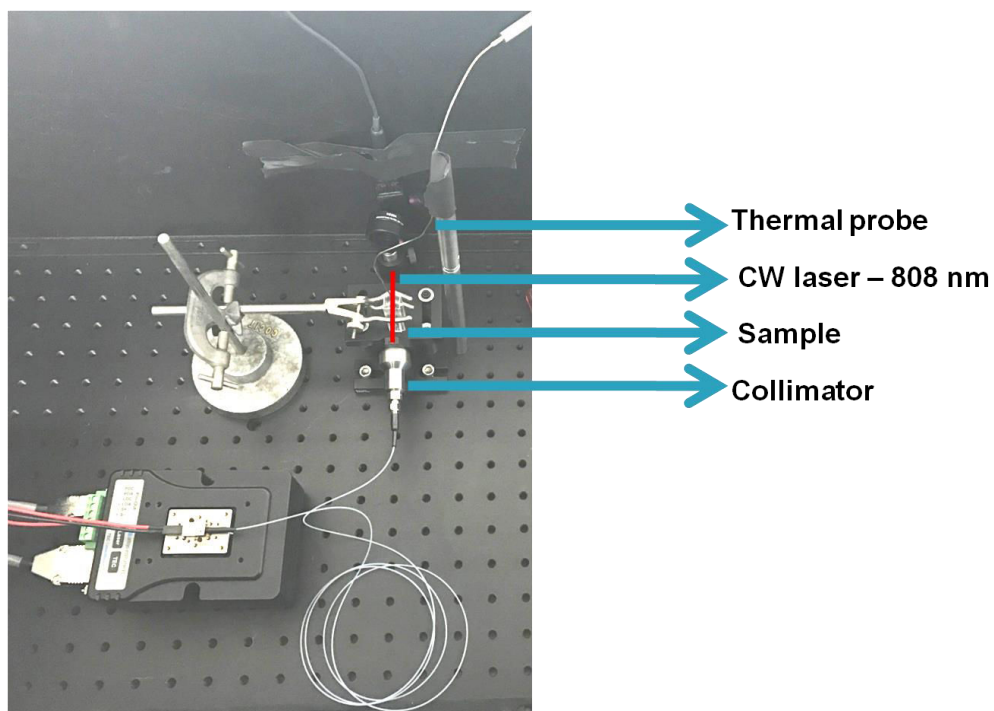


Figure S1: Photothermal heating set up.

2) Gold nanoparticles technical specifications obtained from Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>)

	Peak SPR wavelength (nm)	Concentration (NP/mL)
50GNS	535	$3,5 \cdot 10^{10}$
80GNS	553	$7,8 \cdot 10^9$
50GNU	585	$3,5 \cdot 10^{10}$
80GNU	620	$7,8 \cdot 10^9$
90GNU	630	$5,4 \cdot 10^9$

3) Theoretical calculation of heat transfer rate between water and a gold nanoparticle:

The first law of thermodynamics for a closed system takes the following form*:

$$Q = m \cdot c \cdot \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

Where, Q is the heat transfer rate [J/s], m, the mass [Kg] and c, the specific heat capacity [J/Kg.C°]. In our case, the heat energy transfer between gold nanoparticles and the surrounding water reaches the equilibrium when:

$$m_W \cdot C_W \cdot \Delta T_W = m_G \cdot C_G \cdot \Delta T_G \quad (2)$$

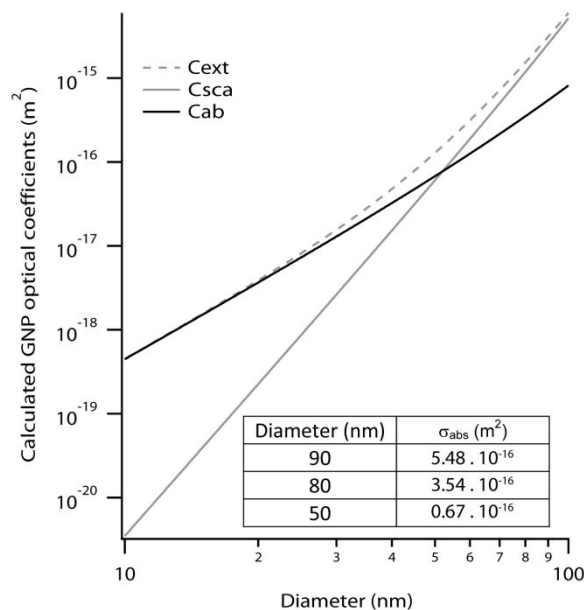
Where, m is the mass and T is the temperature elevation (the indication *w* is for water and *G* for gold). $C_W=4186$ [J/Kg.C°] and $C_G=129$ [J/Kg.C°] are the specific heat capacities of water and gold respectively.

	$V_{GNP}: \frac{4}{3}\pi r^3$ (nm ³)	Gold volume in 700 μ L of water (m ³)	m_G (Kg) ($\rho_G = 19.3 \cdot 10^3$ Kg/m ³)	m_W (Kg) ($\rho_W = 10^3$ Kg/m ³)
50GNS	65450	$1.6 \cdot 10^{-12}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-4}$
80GNS	268083	$1.5 \cdot 10^{-12}$		
90GNS	381703	$1.4 \cdot 10^{-12}$		

By calculating, the gold and water masses (values in the previous table), we found that for our experimental conditions, the equation (2) can be written as following:

$$\Delta T_G = 7.6 \cdot 10^5 \Delta T_W \quad (3)$$

4) Calculations of extinction, absorption and scattering coefficients of different sizes of gold nanospheres using Mie theory:



* Lienhard IV, J. H., *A heat transfer textbook*. Lienhard V, J.H.: Cambridge, Massachusetts, USA, 2001.

Figure S2: Numerical calculation of GNP optical coefficients (absorption, scattering and extinction) at 808 nm excitation laser by using the software MiePlot (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>) available freely.

5) Temperature elevation speed calculation for each GNP surface:

The GNU approximate surfaces were calculated using the formula: $4\pi R^2$ (for each size). In this case, the effective diameter of each GNU (50, 80 and 90 nm) was considered.

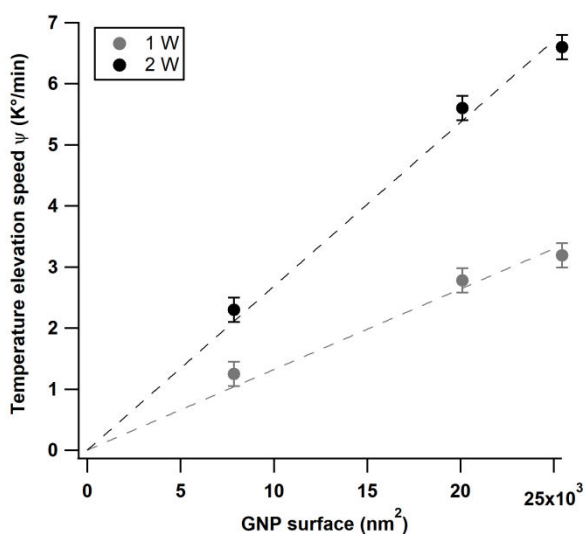


Figure S3: GNU temperature elevation speed Ψ (K°/min) versus GNU surface at two excitation power 1 W and 2 W.

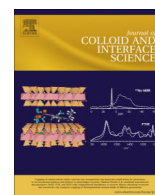
4.2 Application

Publication : Polyphosphonate ligands : From synthesis to design of hybrid PEGylated nanoparticles toward phototherapy studies.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Regular Article

Polyphosphonate ligands: From synthesis to design of hybrid PEGylated nanoparticles toward phototherapy studies



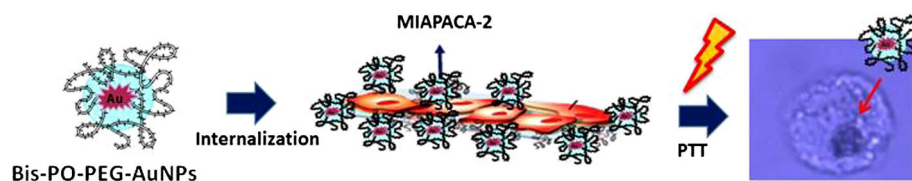
Maelle Monteil^{a,1}, Hanane Moustouai^{a,1}, Gennaro Picardi^a, Fatima Aouidat^a, Nadia Djaker^a, Marc Lamy de La Chapelle^{a,b}, Marc Lecouvey^{a,*}, Jolanda Spadavecchia^{a,*}

^aCNRS, UMR 7244, CSPBAT, Laboratoire de Chimie, Structures et Propriétés de Biomateriaux et d'Agents Thérapeutiques, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France

^bSouthwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China

GRAPHICAL ABSTRACT

Synthesis of Bis-PO-PEG-AuNPs by a fast chemical method and ability of internalization in pancreatic adenocarcinoma cancer cells (MIAPACA 2) for Phototherapy applications.



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2017

Revised 9 October 2017

Accepted 13 October 2017

Available online 2 November 2017

Keywords:

Gold nanoparticles

Polyphosphonate

Raman

H NMR

Hyperthermia

Photothermal therapy

ABSTRACT

The use of phosphonate ligands to modify the nanoparticle (NPs) surface has attracted a strong interest in the last years for the design of highly functional hybrid materials. **Here, we applied a methodology to synthesize bisphosphonates having functionalized PEG side chains with a specific length in order to design a novel class** of hybrid nanomaterials composed by tetraphosphonate-complex-gold COOH-terminated PEG-coated NPs (**Bis-PO-PEG-AuNPs**). The synthetic approach consist in three steps: (1) Complexation between new phosphonate ligands (Bis PO) and tetrachloroauric acid (HAuCl₄) to form gold clusters; (2) adsorption of COOH-terminated PEG molecules (PEG) onto Bis PO-Au complex; (3) reduction of metal ions in that vicinity, growth of gold particles and colloidal stabilization. The obtained snow-shape-like hybrid nanoparticles, have been characterized by ultra-violet/visible, Raman spectroscopies, and electron microscopy imaging, involving their optical properties and photothermal activity in pancreatic adenocarcinoma cancer cells (PDAC).

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Recent advances in medicinal chemistry and nanotechnology have determined the development of various nanomaterials with

original physico-chemical properties for biomedical applications [1–3].

In many cases, the elevated cytotoxicity of nanostructures, restrict their use for clinical purposes [4,5]. **Recently new polymers and phosphonates have applied in nanomedicine [6], thanks to their high chemical stability and low toxicity. The structural relationship between natural compounds and their capacity to chelate various metal ions, represent the base of anti-metabolites activity and allow them to compete for active**

* Corresponding authors.

E-mail addresses: marc.lecouvey@univ-paris13.fr (M. Lecouvey), jolanda.spadavecchia@univ-paris13.fr (J. Spadavecchia).

¹ These authors contributed equally.

sites of enzymes or cellular receptors [7]. Most recently, phosphonates have been successfully employed in photothermal therapy (PTT) [8]. PTT, clinically termed as hyperthermia, is a minimal-invasive therapeutic strategy for the destruction of cancerous cells as well as bacteria. It is based on the conversion of photon energy into cytotoxic heat upon near infrared (NIR) laser irradiation [9–11]. Various polymers have been described to bind onto gold nanoparticle surfaces by chemisorption or **physisorption** [12,13]. Polyethylene glycol (PEG) derivatives have been widely used to graft and stabilize gold nanoparticles, because they are hydrophilic, water soluble, biocompatible and also resistant to unspecific protein adsorption due to the steric stabilization of the PEG chains [14–16]. The polymer layer not only serves for the stabilization of nanoparticles, but can also be used for further functionalization with drugs or targeting moieties [15,17]. In recent years, the conjugation of polymers onto gold nanoparticles have led to new and exciting development with enormous potential in many fields from chemistry [18,17] to biology [19] and medicine [20]. H. Moustouai et al., have shown that gold nanoconjugates, when functionalized with appropriate surface moieties, can readily enter living cells [2,15]. Our experiments in an *in vitro* model of Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC) demonstrated that the therapeutic efficiency was positively influenced by complexation into a PEGylated nanometre-sized delivery system [2]. Other authors have studied the mechanism of hybrid nanoparticles and competition effect with different capping agent on the growth process [18,21]. Therefore the conjugation of phosphonate ligands to the nanoparticle surface drew a lot of attention these last years for the design of highly functional hybrid materials [22]. Previously, M. Lecouvey et al. have reported the methodology to synthesize bisphosphonates having functionalized PEG side chain with different lengths of PEG chain [23]. The aim of this article is threefold: first, we synthesize novel dihydroxymethylene bisphosphonate polymer PEG polymers from PEG dicarboxylic acid by a one-step procedure from acyl chloride and tris(trimethylsilyl) phosphite. Second, we intend to design and synthesize AuNPs using a “simple” method implying hybrid NPs with different capping materials (Bis-PO; PEG) to understand the competition effect between **polymer capping agents during the growth process of AuNPs**. **Third, we investigated the PTT activity of Bis-PO-PEG-AuNPs, before and after internalization in PDAC cells in order to evaluate their ability for ablation of cancer cells.**

2. Experimental section

2.1. Materials

Tetrachloroauric acid (HAuCl_4), sodium borohydride (NaBH_4), Phosphate Buffer Solution (PBS); dicarboxylic PolyEthylene Glycol (PEG)-600 (PEG), were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All reactions were carried out under an argon atmosphere. All starting materials were purchased from commercial sources and used without any further purification. More particularly, compounds 3a, 3b, PEG 200 alcohol and Dowex® 50WX2 H^+ resins were purchased from Sigma-Aldrich. Bisphosphonate was synthesized as reported in the literature [24]. Infrared spectra were recorded on a Thermo Electron Corporation Nicolet 380 FT-IR spectrometer between 4000 and 500 cm^{-1} (16 scans, resolution = 1–2 cm^{-1}). The samples were analysed as films placed between two pieces of KBr for oils.

High resolution mass spectroscopy spectra were acquired using a WATERS Micromass Q-tof spectrometer in positive mode (ES+). NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 400 MHz spectrometer. Chemical shifts (δ) and coupling constants (J) were expressed in ppm and Hz respectively. All compounds were anal-

ysed in D_2O or CDCl_3 solvents. The chemical shifts of ^1H , ^{13}C , and ^{31}P were reported in delta (δ) units, parts per million (ppm). NMR multiplicities were abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qt = quintuplet, m = multiplet, br = broad signal. All ^{31}P spectra were realized with ^1H decoupling. Dicarboxylic acid derivative Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether average M_n 600 was purchased from sigma Aldrich.

The analytical data for the known compounds were found to match with the literature data. All solvents were used without any further purification. Experiments were carried out at room temperature if not specified otherwise.

2.2. Synthesis of corresponding acid chloride

A 50 mL flame-dried three necked flask equipped with an argon inlet and a dropping funnel was charged with the dicarboxylic acid derivative (1 mmol, 1 eq) and 25 mL of freshly distilled DCM. The flask is placed in ice bath (0 °C) and a solution of oxalyl chloride (10 mmol, 10 eq) was added dropwise. The reaction mixture was then stirred at RT during 24 h.

Then, volatile fractions were co-evaporated under reduced pressure (0.01 Torr) twice with dried dichloromethane and anhydrous diethyl ether. The crude product was dried under vacuum for a few minutes and used without purification.

2.3. Synthesis of (1,5-Dihydroxy-1,5,5-tris-phosphono-pentyl)-phosphonic acid (di-HMBPs)

In a 50 mL round-bottom three-neck flask equipped with a thermometer, corresponding acid chloride (1 eq, 5 mmol) was added dropwise, under argon, at -5°C , to tris(trimethylsilyl) phosphite (20 mmol) in 5 mL of anhydrous tetrahydrofuran. When addition was completed, reaction mixture was allowed to stand at room temperature. The evolution of the reaction was monitored by ^{31}P ^1H NMR. Then, volatile fractions were evaporated under reduced pressure (0.1 Torr) before methanolysis (20 mL). After evaporation, crude products were washed in diethylether and lyophilized. The pure product was obtained in 95% yield.

^{31}P NMR ^1H (161.9 MHz, D_2O) δ = 16.78, ^1H NMR (400.1 MHz, D_2O) δ = 3.83 (t, $^3J_{\text{P-H}}$ = 12 Hz, 4H), 3.69–3.50 (m, 42H, O–CH₂–CH₂).

^{13}C NMR ^1H (100.6 MHz, D_2O) δ = 74.2 (t, $^1J_{\text{P-C}}$ = 142.4 Hz, P–C (OH)–P), 72.2, 70.45, 69.73–69.27.

2.4. Synthesis of PO-PEG-AuNPs

The synthesis of **Bis-PO-PEG-AuNPs** colloids included three main steps, followed in Fig. 1. 20 mL HAuCl_4 aqueous solution (2.5×10^{-4} M) was added to Bis-PO (5 mL, 1.72×10^{-4} M in water) and aged for 10 min. After 10 min, 250 μL of dicarboxylic PEG (PEG–COOH) was added and mixed by magnetic stirring for 10 min at room temperature. Finally, 1 mL of aqueous 0.01 M NaBH_4 was added at once. The formation of the Bis-PO-PEG-AuNPs was observed as an instantaneous colour change of the solution from pale yellow to bright pink-purple after addition of the reducing agent. Products of each synthetic step were stored at 27–29 °C and characterized by UV–Vis spectroscopy, Transmission Electron Microscopy (TEM), and Raman spectroscopy. The “as-prepared” Bis-PO-PEG-AuNPs solution was centrifuged at 9000 rpm for 16 min for three times; then, the supernatant was discarded. The **pellet** was re-dispersed in an equivalent amount of PBS (pH = 7). This was repeated twice to remove excess of not-conjugated dicarboxylic PEG and Bis-PO respectively.

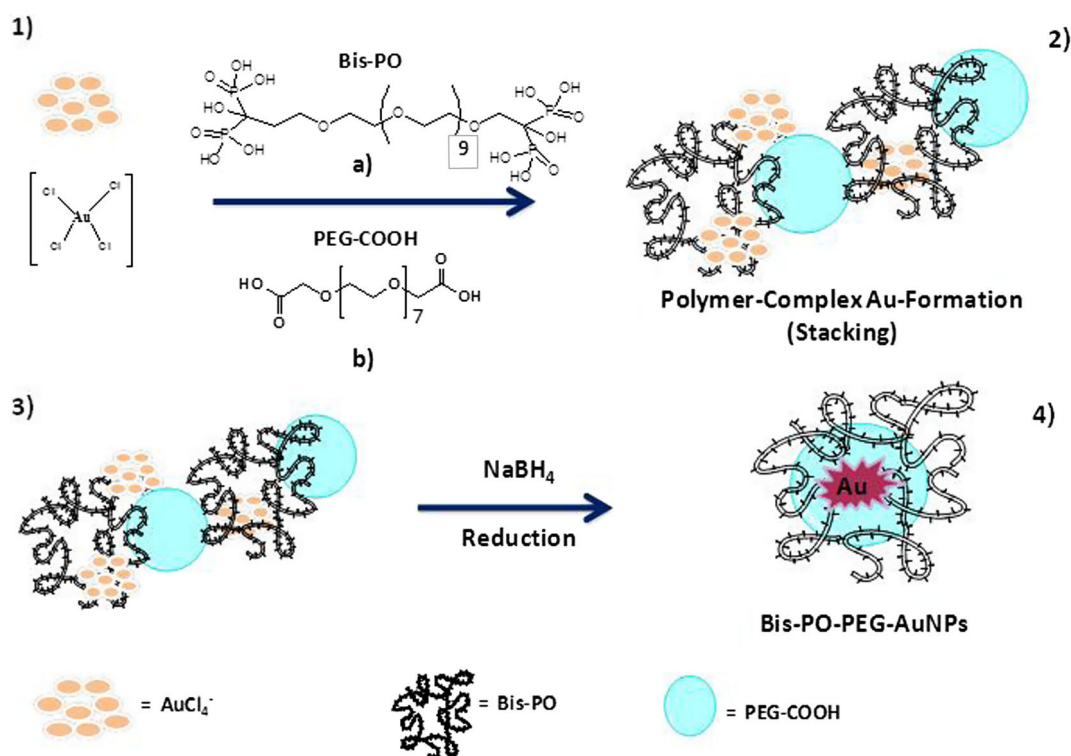


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of Bis-PO-PEG-AuNPs via polymeric reduction procedure (1–2). (Please note that drawings are not in scale and are not intended as representative of the full samples composition).

2.5. Physico-chemical characterization

All the measurements were performed in triplicate in order to validate the reproducibility of the synthetic and analytical procedures.

2.5.1. UV-Vis absorption spectroscopy

Absorption spectroscopy measurements were carried out by means of a double-beam Varian Cary 500 UV-Vis spectrophotometer (Agilent, France). Absorption spectra were recorded in the 350–900 nm spectral range in water at AuNPs concentration equal to 10^{-4} M. For stability studies, Bis-PO-PEG-AuNPs were dispersed in PBS (0.1 M; pH 4.0 or pH 7.0), and absorption spectra collected over 6 months.

2.5.2. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images were acquired with a JEOL JEM 1011 microscope (JEOL, USA) at an accelerating voltage of 100 kV. TEM specimens were prepared after separating the PEG from the metal particles by centrifugation. Typically 1 mL of PEG-AuNPs was centrifuged for 20 min at a speed of 14,000 rpm. The upper part of the colourless solution was removed and the solid portion was re-dispersed in 1 mL of water. 2 μL of this re-dispersed particle suspension was placed on a carbon coated copper grid (manufactured by Smethurst High-Light Ltd and marketed exclusively by Agar Scientific) and dried at room temperature.

2.5.3. Optical imaging

The optical images of the cells have been made with the optical microscope of an Xplora Raman microspectrometer (Horiba Scientific) in bright and dark fields. 10 \times and 100 \times objectives have been used with numerical apertures of 0.25 and 0.9 respectively.

2.5.4. Photothermia experiments

A 660 nm laser diode is focused on the cells and the gold nanoparticles using an 80 \times objective (numerical aperture = 0.75) for 10 s using the optical microscope of an Xplora Raman microspectrometer (Horiba Scientific) with a laser irradiation of 2.2 mW/cm².

2.5.5. Raman spectroscopy

The Raman spectra have been recorded using an Xplora Raman microspectrometer (Horiba Scientific) in backscattering configuration. The excitation wavelength is 660 nm and the laser power is 0.2 mW/ μm^2 (80 \times objective with a numerical aperture of 0.75 and an accumulation time of 5 s). This laser power is not enough to induce any degradation of the cells and any hyperthermia effect.

2.5.6. ^1H NMR, ^{31}P NMR, ^{13}C NMR Analysis

All analysis were realized as previously described [24,23].

2.5.7. Dynamic light scattering (DLS)

The size measurements were performed using a Zetasizer NANOZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a He-Ne laser (633 nm, fixed scattering angle of 173 $^\circ$) at room temperature.

2.5.8. Zeta potential measurements

The zeta potential of PEGylated AuNPs dispersed in water was measured using the electrophoretic mode of a Zetasizer NANOZS (Malvern Instruments Ltd, UK).

2.5.9. Stability of Bis-PO-PEG-AuNPs as a function of pH

The stability of nanoparticles was detected by UV VIS. All nanoparticles were dissolved in PBS solution 0,1 M at two different pH (pH 4 and pH 7) during 6 months (Fig. S1 Supporting Informations).

2.6. *In vitro* biological activity of Bis-PO-PEG-AuNPs

2.6.1. Cell culture

Miapaca-2 cells, a human pancreatic carcinoma cell line, were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC).

Miapaca-2 cells were cultured in DMEM (Gibco, Bio-Sciences Ltd, Ireland) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) 2.5% HS, penicillin (50 IU ml⁻¹), streptomycin (50 µg ml⁻¹) and L-glutamine (2 mm) in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 0.25 × 10⁶ cells/mL in 25 cm² tissue culture flasks and kept in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

2.6.2. Cell treatment

Miapaca-2 cells were exposed to a series of **Bis-PO-PEG-AuNPs** dilutions in complete media (**DMEM+10% FBS**) (concentrations ranging from 0 to 17 µM of **Bis-PO-PEG-AuNPs**) for 48 h in 12 well plates. Untreated cells were also included in the experimental design. **The cells were successively washed and suspended in complete media. Propidium iodide (PI) was added to the cell suspension at concentration of 3 µM and incubated for 15 min in the dark at room temperature (staining step).** After staining with PI, cells were counted by means of BD Accuri[®] C6 flow cytometer, keeping constant the counting time among samples. For each sample 10, 000 cells were acquired and analysed by flow cytometry (BD Accuri[™] C6 Cytometer) where FSC, SSC and FL3 data was collected.

Measurements for each sample were carried out in triplicate and are presented as median.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of PEG di HMBP polymer (Bis-PO)

Classic **hydroxymethylene bisphosphonate** (HMBP) synthesis is well documented, but uses harsh acidic conditions combined with heavy heating and long reaction time. These drastic conditions enable the use of fragile substrates and the obtaining of functionalized HMBPs [23]. As an alternative to this pathway our group recently proposed a very mild and one-pot synthesis of HMBPs from tris(trimethylsilyl)phosphites and acyl chlorides [24]. To introduce two bisphosphonates on the PEG chain, we used the procedure developed in our laboratory. The PEG dicarboxylic carboxylic acid **1** reacted quantitatively with 10 equivalents oxalyl chloride to give PEG diacyl chloride at room temperature for 24 h (Scheme 1). The completion of the reaction was monitored by infrared spectroscopy with the disappearance of the hydroxyl absorption band and the shifting of the carbonyl vibration band about 1800 cm⁻¹ (Fig. S2 in Supporting Informations). The addition of two equivalents of tris(trimethylsilyl)phosphite onto the acyl chloride derivative yielded the corresponding silylated PEG-dihydroxymethylene bisphosphonate. The formation of silylated bisphosphonate was monitored by ³¹P NMR (Fig. S3 in Supporting Informations). After evaporation of volatile compounds under vacuum the silylated PEG-diHMBP was hydrolysed with methanol at room temperature for 24 h. After methanol evaporation, the crude PEG-HMBP containing phosphorous acid was purified by successive washes with dry diethyl ether. The pure targeted PEG-HMBPs **2** (Scheme 1) were then obtained in 95% yields.

3.2. Formation mechanism of Bis-PO-PEG-AuNPs and competition between polymer stabilisers

This study provide the first evidence for the formation of stable complexes of PEGylated Au(III)-Bis-PO as building blocks of gold

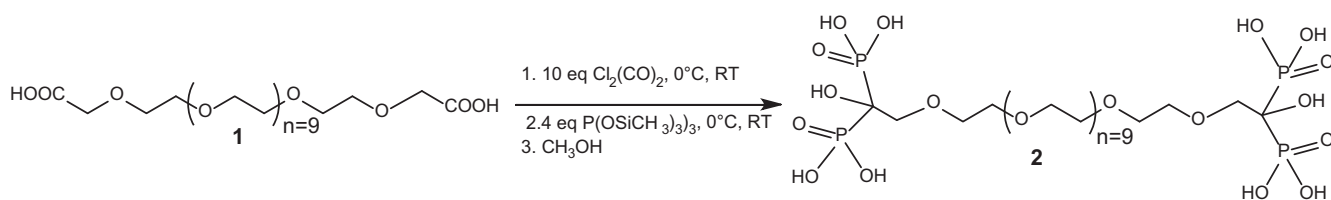
nanoparticles. Recently, authors have studied formation mechanism of hybrid nanoparticles and completion effect with different capping agent on the growth process [18,21]. Other groups have reported the mechanism of gold nanoparticles formations in presence of block copolymers [6] that can bind metal ions involving in the reduction of AuCl₄⁻ ions *via* oxidation of the oxyethylene and segments by the metal center [6]. The main difference with previously reported synthetic procedures is that Bis-PO and PEG molecules both participate to the stabilization of AuNPs *via* electrostatic interactions between their carboxylic and phosphate groups. In our case, the formation of gold NPs from AuCl₄⁻ includes **four mains steps as followed in Fig. 1:**

(1) Formation of Bis-PO-PEG diacid mixture by electrostatic interaction, (2) initial reduction of metal ions facilitated by Bis-PO aqueous solutions and dicarboxylic acid-terminated PEG to form Au clusters; (3) adsorption of Bis-PO-PEG diacid molecules on the surface of gold clusters and reduction of metal ions in that vicinity (4) growth of gold particles and colloidal stabilization by molecules of Bis-PO-PEG polymers (Scheme 2).

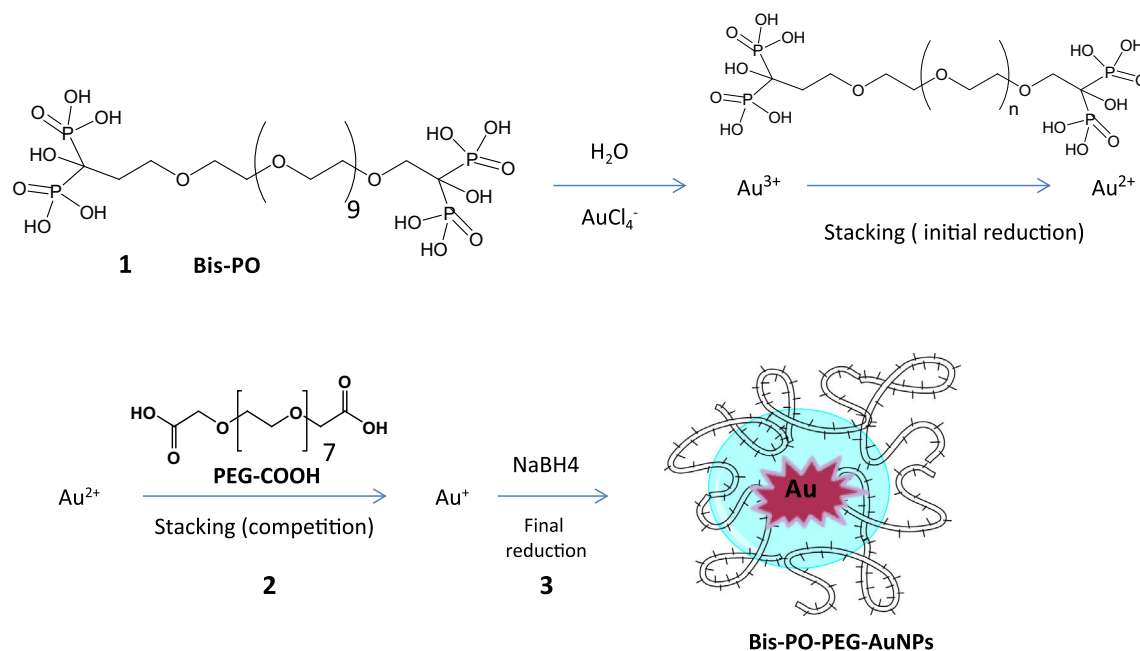
When Bis-PO **was added into** HAuCl₄ aqueous solution, the positively charged of Bis-PO chains **showed** strong electrostatic interaction with negatively charged of AuCl₄⁻ ions formed a complex Bis-PO-AuCl₄⁻ that play a final role in growth process of NPs. The addition of PEG-COOH **begin the reaction** of reduction by complexation of Au ions [18]. In others studies the addition of phosphate materials as hydroxyapatite (HAP) to the protein-Au dispersion, during the synthetic process, forms quarter-moon-like platelet structures [18,25,26]. Interactions between AuCl₄⁻ ions and mixture of Bis-PO-PEG diacid molecules (attractive ion-dipole interactions vs. repulsive interactions due to hydrophobicity) are important for controlling the competition between AuCl₄⁻ on the surface of gold seeds and polymeric molecules (Bis-PO-PEG) during growth process of nanoparticles (Scheme 1). Metal salt reactivity is of extremely importance both in the bulk solution, where causes the nucleation of the first gold seeds, and on the surface of the fresh formed gold particles, mastering the growth rate. The binding on anionic surfaces is proposed to be due to local charge-charge interactions and as a result, local charges on the surface of two different polymers. All products of our synthetic procedure were extensively characterized by UV-Vis absorption spectroscopy, TEM, Raman Spectroscopy and ¹H NMR.

3.3. Physico-chemical characterization of Bis-PO-PEG-AuNPs

When Bis-PO and dicarboxylic PEG (PEG-COOH) were added to the AuCl₄⁻ solution, the formation of snowflakes shape with a mean diameter around 60 nm were observed (Fig. 2a). We assumed that both polymer molecules were involved in the nucleation process and the final shape and size is due to the ratio of the gold salt and the capping materials during the reaction process. H. Moustouli et al. has reported the synthesis of similar nanostructures using dicarboxylic PEG embedded with a complex gold-drug in solution [2], while another group has produced snowflakes nanoparticles by incorporating protoporphyrin molecules in the growth solution of AuNPs [27]. Based on previously reported findings, we suppose that, when Bis-PO and dicarboxylic PEG were added to the AuCl₄⁻ solution, the PEG initially was bound to Au (III) in a mushroom conformation followed by a conformational change to brush mode. "Mushroom" mode is characterized by a low surface grafting density and the polymers tend to "lie" close to the AuNPs surface. Both polymers is then attached by a single point to the metallic surface, generating nanostructures with snow-like shape. Nanostructures growth stops when all anchoring sites are saturated [28]. In our study, this saturation was achieved at a Bis-PO-PEG addition concentration of 28.1 µg/ml, with a maximum achievable Bis-PO-PEG loading of ~23 wt% **obtained by**



Scheme 1. Schematic reaction of PEG dihydroxymethylene bisphosphonate polymer (Bis-PO).



Scheme 2. Proposed mechanism of AuCl_4^- reduction and particle formation in the presence of PEG diacid and Bis-PO as surfactants.

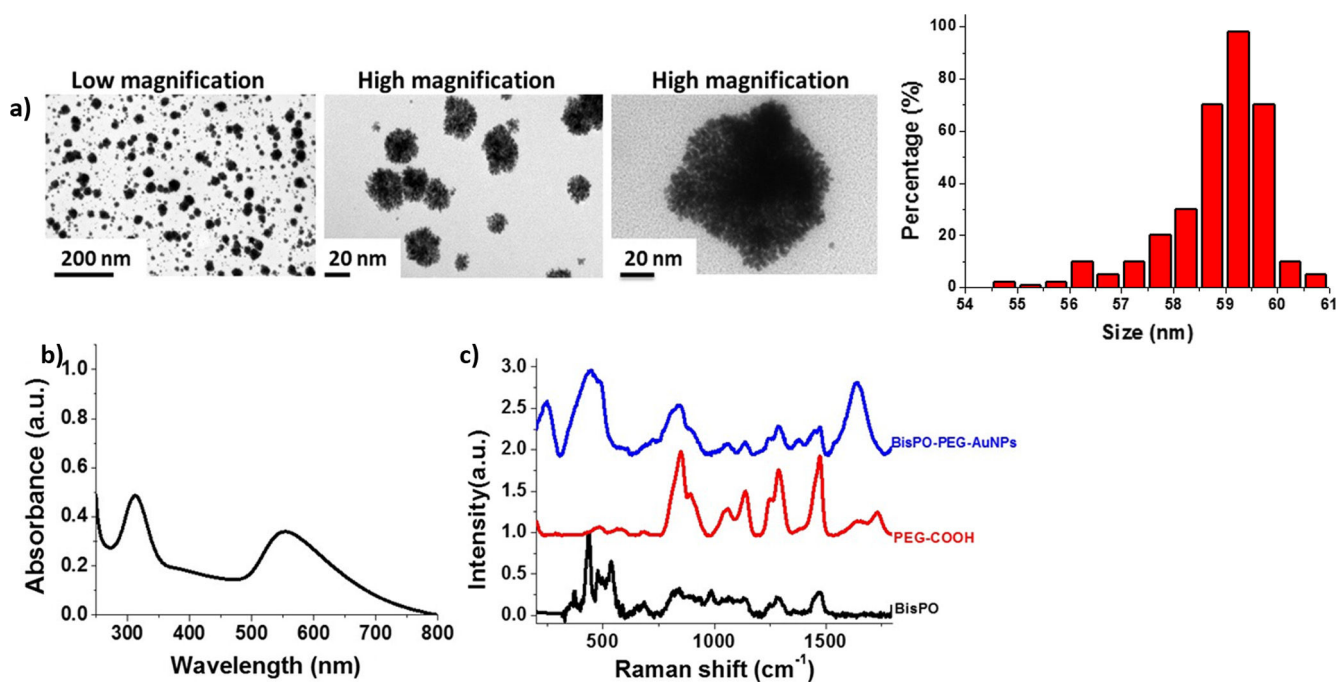


Fig. 2. (a) TEM images and size distribution of Bis-PO-PEG-AuNPs (b) UV-Vis absorption and (c) Raman spectra of the Bis-PO-PEG-AuNPs. (a) Scale bars: 200 and 20 nm. (c) Raman spectra of Bis-PO and COOH-terminated PEG (PEG-COOH) are also reported for comparison. The Raman spectra were normalized on the intensity of the band at 990 cm^{-1} . Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$; laser power 20 mW; accumulation time 180 s.

Thermogravimetric Analysis (TGA) as described previously (data not shown) [29]. This corresponds to approximately 1.5 dicarboxylic PEG molecules/AuNP. Fig. 2b, report absorption spectra of hybrid AuNPs (Bis-PO-PEG-AuNPs), characterized by a small peak at 300 nm and a surface plasmon band at 565 nm. This peak is to the collective oscillation of the metal electrons in the conduction band, due to interaction of electrons with light of that wavelength [30]. Bis-PO and PEG can be used as stabilizing polymers for AuNPs because of the dispersed solutions could be obtained due to the formation of coordination bands between Au ions and the phosphate or carboxylic groups respectively. This chelation evenly better dispersed Au ions which were reduced to form single AuNPs of relatively uniform size. The UV Vis spectra remain unaltered after storage for more than six months at room temperature suggesting the formation of stable particle suspension (Fig. S1 in Supporting Informations).

We have also recorded the Raman spectrum of Bis-PO-PEG-AuNPs and compared it with the Bis-PO and PEG-COOH as control (Fig. 2c). In aqueous systems, Raman spectra of phosphate oxyanions show symmetric and asymmetric stretching vibration of PO_4 units dependent of mineral and crystal structure [31]. The Raman fingerprint of the Bis-PO-PEG-AuNPs was confirmed by the presence of a peak around 244 cm^{-1} , due to the metal-oxygen vibrations (O-Au-O) between Bis-PO polymer and gold ions. The intense broadened band in the spectral range $433\text{--}488\text{ cm}^{-1}$ is assigned to the $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ and $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ bending modes. The intense double peaks in the region $796\text{--}908\text{ cm}^{-1}$ is assigned to the $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ symmetric stretching mode and P—O—C and C—O of PEG-COOH due to a PO stretching vibration of hydrogen phosphate units. A double peak at $1053\text{--}1144\text{ cm}^{-1}$ is attributed to C—O vibration and the $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ symmetric stretching mode. Due to the size of phosphorus atom, the frequency of the P=O stretching vibration is almost independent of the type of compound in which the group occurs and of the size of substituents. However, it is influenced by the number of electronegative substituents directly bonded to it, as well as being

very sensitive to association effects [32,33]. The position of the band due to the P=O stretching vibration is dependent on the sum of the electronegativities of the attached groups. Electronegative groups tend to withdraw electrons from the phosphorus atom thus competing with the oxygen which would otherwise have a tendency to form $\text{P}^+=\text{O}^-$, therefore resulting in a stronger bond and hence in a higher vibration frequency. Similarly, hydrogen bonding tends to lower the frequency of the P=O stretching vibration and broaden the band. The presence of double peaks at $1244\text{--}1291\text{ cm}^{-1}$ and $1444\text{--}1473\text{ cm}^{-1}$ confirm the presence of C—O—C and C=O in the polymer backbone of Bis-PO-PEG and PEG-COOH respectively [2,15]. The broad Raman band at 1640 cm^{-1} is likely to be due to the water vibrational mode. Such peak assignments were based on the fact that the P—O and C—O transition to be found at the highest absolute frequency with other transitions.

3.4. Stability of Bis-PO-PEG-AuNPs

The stability of Bis-PO-PEG-AuNPs in solution, **plays an important role in the clinical purposes [34,35] and was monitored by Localized Surface Plasmon (LSP) band at 565 nm** (Fig. 1b). Analysis was performed under different pH and electrolytic conditions over a reasonable period of time (6 months). The synthesized Bis-PO-PEG-AuNPs did show an almost negligible change in the LSP band position over a period of six months at the pH 4 and pH 7 (Fig. S1 in Supporting Information). Zeta potential measurements confirmed the spectroscopic results, showing that Bis-PO-PEG-AuNPs were stable at physiological pH (z-potential = $-36.6 \pm 1\text{ mV}$ with a PDI equal to 0.3).

3.5. Efficacy of Bis-PO-PEG-AuNPs

The percentage (%) of live PDAC cells (MIAPACA-2 cell line) were evaluated by flow cytometry after exposure of 72 h with PEG-AuNPs [15] (Nano 1) and Bis-PO-PEG-AuNPs (Nano PO). PEG

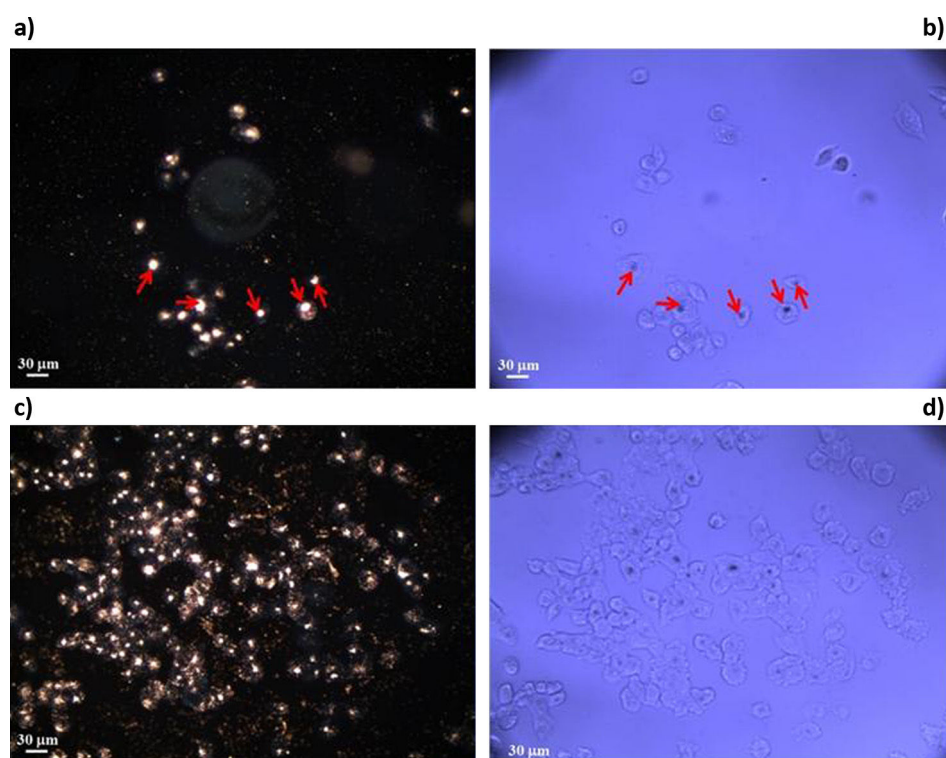


Fig. 3. Dark field (a–c) and bright field (b–d) images (20 \times , 0.25 NA objective) of MIAPACA-2 cell lines treated with the Bis-PO-PEG-AuNPs in different areas.

is the organic component of PEG-AuNPs used as control (Nano 1). As described previously, this organic polymer do not impact on the toxicity of the final nanocarrier [15,36]. After experiment, Bis-PO-PEG-AuNPs showed no toxicity and did not modify cell membrane after internalization. This result confirm thus the good biocompatibility of these nanoparticles [37] (Fig. S2 in Supporting Information).

3.6. Photothermal effect into PDAC cells

Many different research papers describe the useful application of similarly functionalized gold nanoparticles. Yoshimoto et al. [38], for example, reported the preparation of PEGylated AuNPs, which were intended to be used as high-performance photothermal agents in photothermal therapy (PTT).

Gold nanoparticles can also be applied as X-ray contrast agent with absorption properties that overcome some limitations of traditional agents due to their particulate character [39].

Cell internalization of the synthesized colloids (Bis-PO-PEG-AuNPs) was checked with a confocal microscope under bright and dark field illumination. For comparison purpose, the glass slide contained regions with identically grown cells which were not exposed to the colloid solution. The images reported in Fig. 3 are from the treated MIAPACA-2 cells **in different areas**, the same sample region is seen in dark field (a–c) and in bright field conditions (b–d). The dark field image shows a high density of bright, small scattering centers dispersed all over the glass slide. These dots are individual colloids or small aggregates resting on the glass slide (i.e., outside the large, microns sized cells); they are not seen under bright field due to their very small, sub micrometric dimensions. Such a background of bright dots is not seen when observing the non-treated cell. Furthermore, the density of these bright spots clearly decreases if the original concentration of the incubated colloids is decreased tenfold. Within the cells, larger, bright regions are also seen (some have been marked with red arrows). It appears that the colloids have a tendency to accumulate inside the cells:

most of them present a central bright region. In the bright field image, dark patches, indicating lower transmission of the incident white light are seen at the corresponding positions for the larger aggregates of nanoparticles.

Individual cells were observed with a higher magnification objective (100 \times) to gain a better insight into the distribution of the colloidal particles.

Fig. 4 reports some pictures of treated Miapaca-2 cells. At this magnification it is seen that the internalized colloid are not forming a large and compact aggregate but are still to a certain extent dispersed within the cell. The formation of smaller aggregates with dimensions of up to 200–300 nm, given by only few individual particles cannot be excluded at this resolution. The internalized metallic nanoparticles may act as nano-sources of heat when irradiated by light of frequency matching their localized surface plasmon resonance. This thermo-plasmonic effect leads to an increase of the local temperature near the irradiated nanoparticle(s) sufficiently high to alter any surrounding biological structures and ultimately provoking cell death.

Modification of the cell morphology following absorption of laser light (at 660 nm) by the loaded nanoparticles was inspected by comparing microscope images of the same cell(s) before and after laser irradiation. Considering the numerical aperture of the objective used for laser irradiation (80 \times , 0.75 NA), the diffraction limited laser spot should have a diameter of roughly one micron. A first bright field image is recorded with the laser off (Fig. 5 left). Then the laser is turned on (at minimal power) and focused at the desired location onto the cell. The position of the colloids can be relatively easily guessed by observing the contrast in the bright field image: darker patches indicate the accumulation of the absorbing particles. Once the laser spot is at the desired position, laser power is increased (by removing filters) for few seconds and then again turned off. A second optical image is then recorded (Fig. 5 right). A comparison of these two images shows the shrinkage of the irradiated cell near the irradiated spot. Despite that the laser irradiated area is only about one micron in diameter

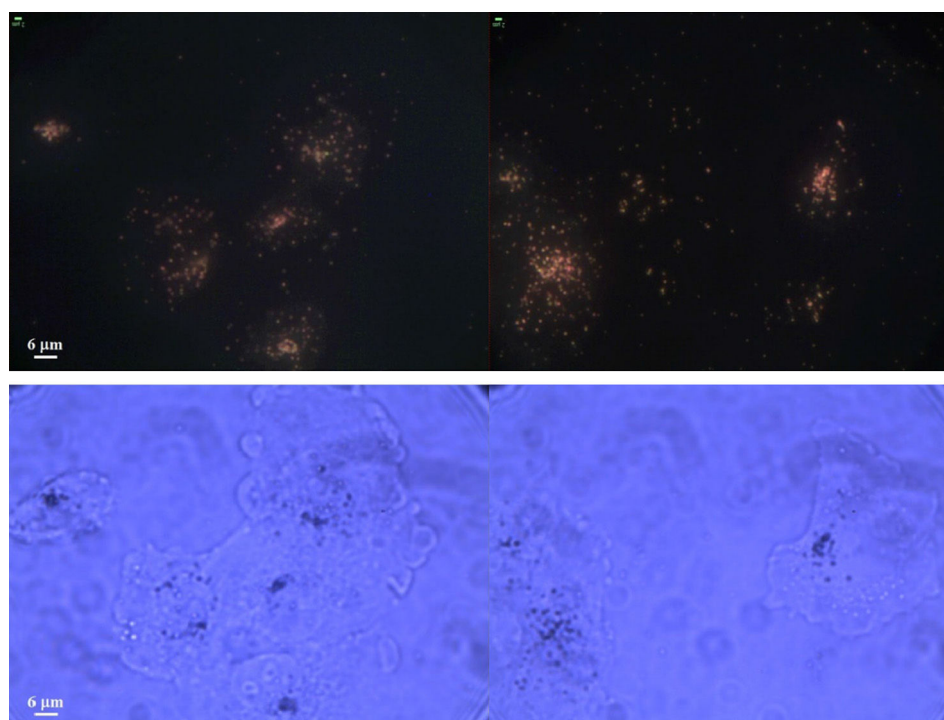


Fig. 4. Dark field (upper row) and bright field (bottom row) images (100 \times , 0.9 NA objective) of MIAPACA-2 cells treated with Bis-PO-PEG-AuNPs.

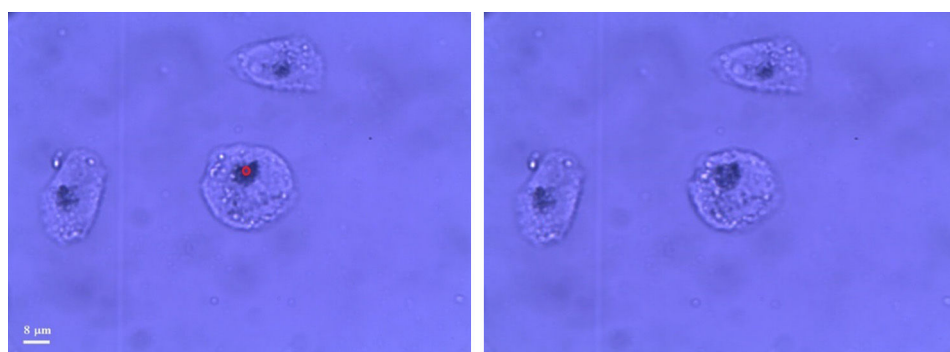


Fig. 5. Bright field images (80 \times , 0.75 NA) of MIAPACA-2 cells treated with the Bis-PO-PEG-AuNPs colloids before (left) and after (right) laser irradiation (2.2 mW/cm² for 10 s). The laser was focused at the position marked with a red dot.

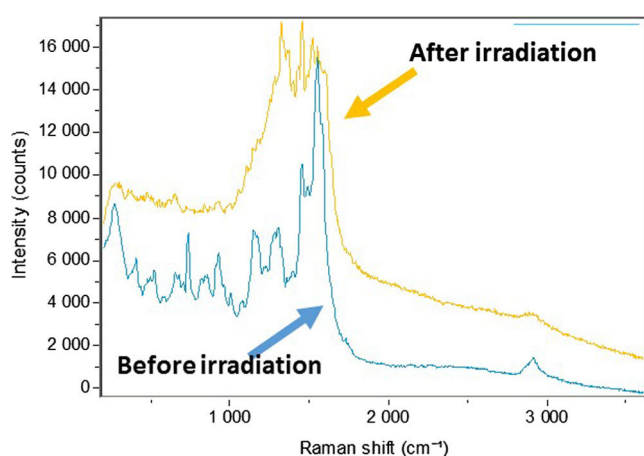


Fig. 6. Raman spectra of Bis-PO-PEG-AuNPs internalized into MIAPACA-2 cells. The Raman spectra before and after irradiation were acquired with 80 \times objective, 10% laser power, 5 s.

(diameter of the focal spot), the effects of the plasmonic heating extend over a larger portion of the immobilized cell.

The cells shown in Fig. 6, were irradiated for 10 s with a laser power density of ~ 2.2 mW/cm². At ~ 0.5 mW/cm², no change in the optical images recorded before and after irradiation of the cells could be detected. On the Fig. 5 right, irradiation at ~ 2.2 mW/cm² (maximal laser power available at 660 nm) often resulted in the formation of microbubbles that blocked the view of the cells and hindered the comparison of the images before and after irradiation. The formation of microbubbles also confirms the efficient absorption of the laser light by the nanoparticles and the related increase in the temperature of the liquid medium. According to Baffou et al. [40], the local temperature required to trigger bubble generation is about 220 °C. **Cells not exposed to the colloids were checked as well and in this case no modification (or bubbling) was observed even for longer exposure (Fig. S5).**

The excitation of the localized surface plasmon resonances upon laser irradiation brings also an enhancement of the Raman signal of molecules located in the close proximity of the colloids surface. Strong (and relatively stable) SERS signal was detected when illuminating the internalized colloid and analyzing the back scattered radiation. A SERS spectrum (~ 0.2 mW/cm², 5 s exposure) is reported in Fig. 6.

This spectrum is relative to the cell/NP system; when focusing away from the colloids but still inside the cell, no Raman signal is detected even for longer acquisition times. The characteristics peaks in the range 500–1200 cm⁻¹ and 2000–3000 cm⁻¹ corresponding to amino groups of proteins and others biomolecule in

the cells [41] is more evident before irradiation (Fig. 6 blue line).² After laser excitation, we observed a strong disparition of principal peaks corresponding to functional biomolecule in the cell with apparition of amorphous carbon that confirms the success of photothermal effect inside the PDAC cells.

4. Conclusion

This paper highlights the safety and efficacy of Bis-PO-PEG-AuNPs for the photothermal activity of PDAC cells. The hybrid nanoparticles are highly soluble under physiological conditions and no aggregation was observed even after 6 months storage. There was no sign of acute toxicity of Bis-PO-PEG-AuNPs for PDAC cells over a wide concentration range. The possibility to ablate MIAPACA-2 cell line was evaluated. A complete destruction of the tumor cells was achieved with a laser power of 2.2 mW/cm² for 10 s. The results suggest that optimization of the nanostructures dose and laser intensity may lead to a highly effective cancer therapy. The presence of free phosphonate and PEG groups on the BisPO-PEG-AuNPs will allow, in the future, conjugation of cell specific antibodies and other cell specific targets onto the photothermal agent for active tumor targeting.

Acknowledgment

This work has been partly performed on the CNanoMat platform of the University Paris 13.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.055>.

References

- [1] V. Melani, M.B. Haddada, H. Moustauoui, J. Landoulsi, N. Djaker, M.L. de la Chapelle, et al., Pegylated doxorubicin gold complex: from nanovector to potential intercalant agent for biosensor applications, *Front. Lab. Med.* (2017).
- [2] Hanane Moustauoui Dania Movia, Nathalie Dupont, Nadia Bouchemal, Sandra Casale, Nadia Djaker, Philippe Savarin, Adriele Prina-Mello, Marc Lamy, Jolanda de la Chapelle, Spadavecchia, Tunable design of gold (III)-Doxorubicin

² For interpretation of color in Fig. 6, the reader is referred to the web version of this article.

- complex – PEGylated nanocarrier. The golden doxorubicin for oncological applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* (31) (2016) 19946–19957.
- [3] L. Yang, Y.T. Tseng, G. Suo, L. Chen, J. Yu, W.J. Chiu, et al., Photothermal therapeutic response of cancer cells to aptamer-gold nanoparticle-hybridized graphene oxide under NIR illumination, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015).
 - [4] B. Kong, J.H. Seog, L.M. Graham, S.B. Lee, Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles, *Nanomedicine (London, England)* 6 (2011) 929–941.
 - [5] B. Fadeel, A. Fornara, M.S. Toprak, K. Bhattacharya, Keeping it real: the importance of material characterization in nanotoxicology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468 (2015) 498–503.
 - [6] M.T. Paspalis Alexandridis, Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 569–583.
 - [7] E.G.-K. Joanna Galezowska, Phosphonates, their complexes and bio-applications: a spectrum of surprising, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 105–124.
 - [8] Y. Shi, M. Liu, F. Deng, G. Zeng, Q. Wan, X. Zhang, et al., Recent progress and development on polymeric nanomaterials for photothermal therapy: a brief overview, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 194–206.
 - [9] X. Huang, M.A. El-Sayed, Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT), *Alexandria J. Med.* 47 (2011) 1–9.
 - [10] C. Chen, S. Wang, L. Li, P. Wang, C. Chen, Z. Sun, et al., Bacterial magnetic nanoparticles for photothermal therapy of cancer under the guidance of MRI, *Biomaterials* 104 (2016) 352–360.
 - [11] A. Bucharskaya, G. Maslyakova, G. Terentyuk, A. Yakunin, Y. Avetisyan, O. Bibikova, et al., Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1295.
 - [12] A. Nakao, M. Fujiki, Visualizing spontaneous physisorption of non-charged [pi]-conjugated polymers onto neutral surfaces of spherical silica in nonpolar solvents, *Polym. J.* 47 (2015) 434–442.
 - [13] H. Heinz, C. Pramanik, O. Heinz, Y. Ding, R.K. Mishra, D. Marchon, et al., Nanoparticle decoration with surfactants: molecular interactions, assembly, and applications, *Surf. Sci. Rep.* 72 (2017) 1–58.
 - [14] J.T.A. Thevenot, L. David, T. Delair, C. Ladavière, Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3651–3660.
 - [15] D.M. Jolanda Spadavecchia, Caroline Moore, Ciaran Manus Maguire, Hanane Moustouai, Sandra Casale, Yuri Volkov, Adriele Prina-Mello, Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies, *J. Int. Nanomed.* 11 (2016) 791–822.
 - [16] S.H. Chao, S.S. Matthews, R. Paxman, A. Aksimentiev, M. Gruebele, J.L. Price, Two structural scenarios for protein stabilization by PEG, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 8388–8395.
 - [17] Z.L.J. He, L. Du, The unexpected effect of PEGylated gold nanoparticles on the primary function of erythrocytes, *Nanoscale* 6 (2014) 9017–9024.
 - [18] E.A. Jolanda Spadavecchia, Marie Albéric, Elisabeth Fontanand Ina Reiche, One-step synthesis of collagen hybrid gold nanoparticles and formation on egyptian-like gold-plated archaeological ivory, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 8363–8366.
 - [19] W.G. Kreyling, A.M. Abdelmonem, Z. Ali, F. Alves, M. Geiser, N. Haberl, et al., In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles, *Nat. Nano.* 10 (2015) 619–623.
 - [20] S.K. Murthy, Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges, *Int. J. Nanomed.* 2 (2007) 129–141.
 - [21] L.D.S. Jane Politi, Sara Longobardi, Paola Giardina, Ilaria Rea, Christophe Methivier, Claire-Marie Pradier, Sandra Casale, Jolanda Spadavecchia, The amphiphilic hydrophobin Vmh2 plays a key role in one step synthesis of hybrid protein-gold nanoparticles, *Colloids Interfaces B* (2015) 214–221.
 - [22] J.G. Heck, J. Napp, S. Simonato, J. Mollmer, M. Lange, H.M. Reichardt, et al., Multifunctional phosphate-based inorganic-organic hybrid nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 7329–7336.
 - [23] L.M.Y. Leroux, Synthesis of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonates, *Heteroatom Chem.* 11 (2000) 556–561.
 - [24] M. Lecouvey IM, T. Bailly, R. Burgada, Y. Leroux, A mild and efficient one-pot synthesis of 1-hydroxymethylene-1,1-bisphosphonic acids. Preparation of new tripod ligands, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 8475–8478.
 - [25] C. Wan, B. Chen, Synthesis and characterization of biomimetic hydroxyapatite/sepiolite nanocomposites, *Nanoscale* 3 (2011) 693–700.
 - [26] D. Rautaray, S. Mandal, M. Sastry, Synthesis of hydroxyapatite crystals using amino acid-capped gold nanoparticles as a scaffold, *Langmuir* 21 (2005) 5185–5191.
 - [27] H. Eshghi, A. Sazgarnia, M. Rahimizadeh, N. Attaran, M. Bakavoli, S. Soudmand, Protoporphyrin IX-gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy, *Photodiagnosis Photodynamic Ther.* 10 (2013) 304–312.
 - [28] K.Y.J. Lee, Y. Wang, S. Nie, In vitro study of a pH-sensitive multifunctional doxorubicin-gold nanoparticle system: therapeutic effect and surface enhanced Raman scattering, *RSC Adv.* 5 (2015) 65651–65659.
 - [29] J. Manson, D. Kumar, B.J. Meenan, D. Dixon, Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media, *Gold Bull.* 44 (2011) 99–105.
 - [30] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Marago, M.A. Iati, Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review, *J. Phys. Condens. Matter: Inst. Phys. J.* 29 (2017) 203002.
 - [31] A.W.M. Ray L. Frost, J. Theo Klopogge, Moses O. Adebajo, Wayde N. Martens, Raman spectroscopy of hydrotalcites with phosphate in the interlayer-implications for the removal of phosphate from water, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 733–741.
 - [32] T. Gramstad, Studies of hydrogen bonding-XIII. Correlation of the complexing ability of organophosphorous compounds with Taft $\chi_{\text{ovσταυτ}}$, *Spectrochim. Acta* 20 (1964) 729.
 - [33] U. Blindheim TG., Hydrogen bonding of tris(diethylamino) phosphine oxide, *Spectrochim. Acta* 21 (1965) 1073.
 - [34] W. Cai, T. Gao, H. Hong, J. Sun, Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2008 (2008), <https://doi.org/10.2147/NSA.S3788>.
 - [35] E.C. Dreaden, L.A. Austin, M.A. Mackey, M.A. El-Sayed, Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery, *Ther. Deliv.* 3 (2012) 457–478.
 - [36] J.O. Kim, A.V. Kabanov, T.K. Bronich, Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin, *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 138 (2009) 197–204.
 - [37] M.J.R.K. Santos-Martinez, J.J. Corbalan, C. Faulkner, J.D. Holmes, L. Tajber, C. Medina, M.W. Radomski, Pegylation increases platelet biocompatibility of gold nanoparticles, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 1004–1015.
 - [38] K. Yoshimoto, Y. Hoshino, T. Ishii, Y. Nagasaki, Binding enhancement of antigen-functionalized PEGylated gold nanoparticles onto antibody-immobilized surface by increasing the functionalized antigen using [small alpha]-sulfanyl-[small omega]-amino-PEG, *Chem. Commun.* (2008) 5369–5371.
 - [39] G.A.T. Chenjie Xu, Shouheng Sun, Size and concentration effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation as measured on computed tomography, *Chem. Mater.* ACS 20 (2008) 4167–4169.
 - [40] J.P. Guillame Bafflou, Hervé Rigneault, Serge Monneret, Super-heating and micro-bubble generation around plasmonic nanoparticles under vw illumination, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 4890.
 - [41] Rachael Smith KLWaLA, Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies, *Analyst* 141 (2016) 3590–3600.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a consisté à synthétiser grâce à une approche « one pot » un nanovecteur à base d'or, pour la thérapie du cancer. Cette approche permet d'utiliser peu de réactifs et d'étape, et permet donc une synthèse simple et peu coûteuse.

Ainsi, une partie importante de la thèse a été consacrée au développement de cette stratégie de synthèse, qui consiste en la complexation entre les ions auriques et le médicament (la doxorubicine dans le cas présent). Cette nouvelle stratégie a également été exploitée dans le cadre d'une étude systémique avec d'autres molécules telles que le docétaxel, le paclitaxel ou encore les bisphosphonates.

Cette nouvelle méthode de synthèse (DOX IN) a été comparée à une autre méthode utilisant le greffage du médicament directement à la surface des nanoparticules d'or par chimie carbodiimide (DOX ON). Les résultats montrent d'une part une meilleure stabilité du nanovecteur, mais aussi une meilleure efficacité thérapeutique sur les cellules cancéreuses. Des premiers résultats ont été obtenus sur l'interaction de la DOX IN avec différents milieux, où j'ai pu démontrer que le nanovecteur était très instable dans des solutions à forte force ionique. Cependant, la présence de protéines en solution permet la protection de la DOX IN, suggérant la formation d'une couronne protéique. Ce constat a été renforcé par l'étude réalisée avec un milieu cellulaire riche en protéines. De plus, des premiers tests *in vivo* ont été réalisés sur des souris swiss, afin d'étudier la biodistribution de ce nanovecteur. Les premiers résultats ont montré que les souris ont bien acceptées le nanovecteur et aucune surmortalité n'a été observée. Ces souris ont ensuite été sacrifiées afin d'y récupérer les organes (foie, rate, reins, poumons, cœur). Une partie de ces organes ont été traitée afin de faire une étude histologique et une autre partie ont été utilisée pour quantifier le taux d'or présent dans ces organes par absorption atomique. Cependant, l'étude n'étant pas achevée, les résultats n'ont pas été présentés dans cette thèse.

Le travail suivant consistait à caractériser la couronne protéique formée à la surface des nanoparticules d'or par SCS. Pour cela, nous avons analysé quantitativement l'adsorption de protéines sanguines sur les nanoparticules. Cette étude a montré une augmentation de la taille des nanoparticules pour les trois protéines utilisées. De plus, on a pu voir l'influence de la forme des nanoparticules d'or, notamment sur l'orientation et l'affinité de la protéine. Cette étude est primordiale car elle donne des indications sur l'activité et

le devenir des nanoparticules d'or au sein d'une cellule ou d'un organisme.

Une dernière étude a été réalisée sur les propriétés thermiques de nanoparticules d'or (citratées, d'une part et à base de bisphosphonates d'autre part) en vue de traitement des cellules cancéreuses par thérapie photothermique. Dans le premier cas, il a été démontré que l'élévation de température dépend de la taille et de la forme des nanoparticules. En effet il a été montré que les nanooursins présentaient des propriétés de conversion de l'énergie lumineuse en chaleur plus élevée que les nanosphères. Ainsi, pour une application en thérapie photothermique, la forme et la taille de la nanoparticule sont des paramètres clés pour l'efficacité de la thérapie. Dans la deuxième étude, des nanoparticules d'or à base de bisphosphonate ont été synthétisées par méthode de complexation afin de traiter des cellules cancéreuses du pancréas. Tout d'abord aucune cytotoxicité n'a été détectée. Après internalisation de ces nanoparticules dans les cellules cancéreuses, une étude de chauffage par photothermie a été réalisée et montrent la destruction des cellules à partir d'une puissance de $2,2 \text{ mW/cm}^2$. L'optimisation de la dose de puissance laser peut donc conduire à un traitement anticancéreux très efficace.

Durant cette thèse, de nombreuses synthèses ont été développées et ont donné de nombreux résultats grâce à une multitude de techniques de caractérisation. Cependant, il sera indispensable de compléter plusieurs points par la suite.

Ainsi, vu les résultats prometteurs observés avec la DOX IN, il serait indispensable de compléter les études sur ce nanovecteur. Tout d'abord, grâce à la méthode SCS, il serait possible de déterminer les interactions entre les protéines plasmatiques et la DOX IN : la présence du PEG va-t-elle limiter les adsorptions protéiques, où la couronne protéique se formera-t-elle, l'interaction est-elle comparable à celle observée avec les nanoparticules citratées... De plus, il serait intéressant de continuer les études *in vivo* qui ont été menées durant cette thèse, afin de comprendre la biodistribution de ce nanovecteur au sein de la souris et d'étudier par la suite l'efficacité du nanovecteur chez des souris avec des xénogreffes.

Concernant les études d'hyperthermie sur les nanoparticules d'or citratées, il serait intéressant de pousser l'étude et de voir s'il existe un effet de la couronne protéique observée dans le chapitre 3, sur l'effet thermique des nanoparticules.

Annexes

1. La spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une technique très utilisée dans les laboratoires, elle permet de faire des analyses quantitatives et qualitatives, mais aussi de suivre la cinétique d'une réaction.

C'est une technique qui repose sur le phénomène d'absorption d'un rayonnement électromagnétique par une matière. En effet lorsqu'une molécule interagit avec la lumière, il va y avoir une transition électronique entre les différents niveaux d'énergies du matériau.

Dans le cas de cette technique, les radiations électromagnétiques se font dans le domaine allant du proche ultraviolet au proche infrarouge soit entre 180 et 1100 *nm*. Lorsque cette absorption correspond au domaine visible, la substance est colorée. Cette technique consiste donc à envoyer des radiations monochromatiques à travers une solution (solide, liquide, gaz) et de mesurer le flux lumineux transmis en fonction du flux incident. La loi de Beer-Lambert met alors en relation l'intensité de la lumière incidente et l'intensité de la lumière transmise en fonction de la distance traversée par la lumière, la concentration des espèces absorbantes et du coefficient d'extinction molaire.

2. La microscopie électronique à transmission (MET)

La MET est une technique qui repose sur l'interaction entre des électrons et la matière. En effet lorsque les électrons rentrent en interaction avec un échantillon, ils peuvent être réémis, diffusés, absorbés et transmis. Dans le cas du MET, des électrons soumis à des fortes tensions d'accélération (60 à 400 *kV*) sont utilisés pour former une image. Ces électrons sont issus d'un filament de tungstène chauffé. Une fois le vide fait dans la cellule, les électrons sont focalisés sur l'échantillon par des lentilles électromagnétiques, et seuls les électrons transmis sont analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée.

L'étude de la transmission des électrons impose donc une préparation assez contraignante de l'échantillon. En effet l'échantillon doit être préalablement aminci pour être transparent aux électrons (de 20 à 100 *nm*) et conducteur afin de laisser passer les électrons à travers l'échantillon, mais en contrepartie, cette technique permet d'obtenir des images

avec une très bonne résolution de l'ordre du nanomètre.

Par la suite, les images MET obtenus ont été analysées par le logiciel ImageJ afin de dénombrer et mesurer les nanoparticules métalliques. Enfin, un histogramme a été réalisé afin d'évaluer la distribution de tailles des nanoparticules d'or.

3. Le potentiel zêta

Le potentiel zêta correspond à la charge que la particule obtient grâce aux ions présents dans la solution. Ceci correspond en fait au potentiel électrique au niveau de ce que l'on appelle le plan de cisaillement hydrodynamique. Lorsqu'une particule est en solution, en présence d'ions, cette particule peut être séparée en deux régions : une région où les ions sont fortement attachés à la surface de la particule, et une région diffuse où les ions sont moins fortement attachés. Dans la dernière région, il existe une limite où la particule et les ions forment une entité stable, c'est ce que l'on appelle la surface de cisaillement hydrodynamique. Le potentiel existant à cette surface est le potentiel zêta. L'amplitude du potentiel zêta donne une indication sur la stabilité des particules. Si les particules en suspension ont un potentiel zêta négatif ou positif important, elles auront tendance à se repousser, cependant si les particules ont des valeurs faibles, elles auront tendance à flocculer.

Pour obtenir le potentiel zêta d'une particule, il suffit de mesurer la vitesse électrophorétique des particules, ceci se fait par effet Doppler. Pour cela, un champ électrique est appliqué à la solution colloïdale entre deux électrodes. Les particules chargées vont migrer à une certaine vitesse électrophorétique, vers l'électrode de charge opposée.

De plus, un laser est utilisé pour illuminer les particules en solution. On compare la différence de fréquence entre le faisceau lumineux incident et le faisceau lumineux diffusé. Ainsi, lorsqu'un champ électrique est appliqué à la cellule, toute particule se déplaçant dans le volume de mesure provoquera une fluctuation de l'intensité de la lumière détectée à une fréquence proportionnelle à la vitesse de la particule. Un détecteur enregistre l'information et l'envoie à un logiciel qui produit un spectre de fréquence qui permet de calculer la mobilité électrophorétique et donc le potentiel zêta.

4. La spectroscopie Raman

L'effet Raman a d'abord été prédit théoriquement en 1923 par Smekal puis observé pour la première fois en 1928 par Sir Chandrasekhara Vengada Raman qui a obtenu un prix Nobel en 1930.

La spectroscopie Raman repose sur le phénomène de la diffusion inélastique d'une radiation monochromatique par un échantillon donné.

En spectroscopie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau par une onde électromagnétique lumineuse. Porté à un niveau énergétique virtuel, il diffuse ensuite une radiation qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat.

Le rayonnement émis par des molécules excitées par ce rayonnement contient des photons de même fréquence que ceux du rayonnement excitateur en très grande majorité (diffusion Rayleigh), mais aussi des photons de fréquences plus faible (diffusion Raman Stokes).

Ce phénomène Raman caractérise l'état vibrationnel d'une molécule polarisable, c'est à dire que lorsqu'on place une molécule dans un champ électrique, la molécule subit une déformation. Ainsi, le centre des charges négatives (les électrons) se décale légèrement par rapport à celui des charges positives (les noyaux) d'où la présence d'un moment dipolaire induit qui disparaît lors de la relaxation (réémission de l'énergie). En mesurant l'intensité du rayonnement diffusé, on obtient un spectre sur lequel la fréquence des bandes est reliée aux énergies de vibration des liaisons atomiques de l'échantillon donné.

L'interaction entre le rayonnement de la lumière excitatrice et la molécule est décrite en théorie quantique comme le passage de la molécule d'un état qui au départ est l'état fondamental, à un état virtuel, l'énergie de l'excitation étant bien plus supérieure à l'énergie de vibration. Cette énergie de vibration vient du fait que lorsque la molécule va recevoir l'énergie de la lumière excitatrice, elle va absorber une partie de l'énergie et va se mettre à vibrer tout en diffusant l'autre partie de l'énergie reçue par le laser. La différence entre les fréquences des ondes excitatrices et diffusées est alors une mesure directe des fréquences de vibrations de la molécule.

Les avantages de la spectroscopie Raman sont très nombreux :

- La méthode étant non destructive et non intrusive, l'échantillon n'est pas dégradé.
- La nature de l'échantillon n'intervient pas, elle peut donc être solide, liquide ou gazeuse.
- Elle peut être couplée avec d'autres techniques
- Elle peut être utilisée in situ et sous contrainte (température, pression,...)
- Les mesures se font rapidement....

Cependant, la faiblesse du signal Raman reste un inconvénient très problématique, mais peut être résolu grâce à l'intervention des plasmons présent dans certains nanomatériaux métalliques.

C'est le cas de la spectroscopie Raman exaltée de surface qui est basée sur le phénomène de la diffusion Raman, mais dans ce cas on va faire intervenir une nanostructure métallique (dans notre cas ce sera des nanoparticules d'or). L'interaction entre l'onde électromagnétique et cette nanoparticule va permettre une exaltation du signal. Cet effet SERS (Scattering Enhanced Raman Spectroscopy) a été mis en évidence pour la pre-

mière fois en 1974 par Fleischmann & al, en observant des intensités élevées sur le spectre Raman de la pyridine lorsque cette molécule est placée sur une surface en argent.

La production de « plasmons de surface localisés » est une grande caractéristique du SERS, permettant l'augmentation de l'interaction entre l'onde électromagnétique émise par le laser et l'échantillon. Ces plasmons localisés, c'est-à-dire des oscillations collectives et cohérentes des électrons présents à la surface des nanoparticules métalliques, génèrent des champs locaux très forts et localisés.

Lorsque deux nanoparticules sont très proches (environ 1 *nm*), on observe la présence de ce que l'on appelle les « points chauds » ou « hot spots » en anglais. Le fait de pouvoir générer ces points chauds et de les contrôler suscite un intérêt majeur pour les chercheurs. Ainsi, la méthode de fabrication, la forme et la taille des nanoparticules sont des paramètres importants pour avoir une exaltation du signal.

5. La diffusion dynamique de la lumière ou dynamic light scattering (DLS)

La DLS est une technique spectroscopique permettant de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules de taille submicronique. Cette technique repose sur le fait que les particules en suspension sont soumises à des mouvements browniens. Ainsi, les grosses particules auront tendance à se déplacer lentement alors que les particules plus petites se déplaceront plus rapidement. Lorsque les particules sont excitées par un laser, elles vont se mettre à diffuser de la lumière de manière aléatoire, la lumière diffusée est enregistrée et détectée à un certain angle. La présence du mouvement brownien, engendre une fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée qui sera enregistrée, puis à l'aide d'un corrélateur, ces fluctuations seront traitées afin d'obtenir une fonction d'autocorrélation. Cette fonction d'autocorrélation va permettre l'obtention du coefficient de diffusion qui lui-même est relié au rayon hydrodynamique grâce à la relation Stokes-Einstein (Voir chapitre 3). Le rayon hydrodynamique obtenu pour le cas des particules sphériques, par exemple, correspond au rayon de la sphère entourée de sa double couche de solvatation, ce qui est différent du rayon « géométrique » mesuré par microscopie.

6. L'analyse du suivi individuel des particules ou Nanoparticle Tracking Analysis, (NTA)

La NTA est une technique permettant de déterminer la concentration en nombre de particule et la distribution en taille des nanoparticules en suspension. Cette technique

se base, comme dans le cas de la DLS, sur la diffusion de la lumière et le mouvement brownien des particules en solution. Cependant, cette technique permet une visualisation des nanoparticules, puisque chaque nanoparticule est analysée individuellement. Pour cela, un laser va venir exciter les particules, la lumière diffusée par chaque particule est observée à l'aide un microscope (avec un grossissement x20) et captée par une caméra CCD. Ainsi, le mouvement de chacune des particules est enregistré. Ce mouvement est relié au diamètre hydrodynamique par la relation Stokes-Einstein (comme dans le cas de la DLS). Cette technique permet l'analyse de solution polydisperse et permet de relier la concentration de l'échantillon aux différentes classes de tailles présentes dans la solution.

Publication : Taxanes Hybrid Nanovectors : From Design to Physico-Chemical Evaluation of Docetaxel and Paclitaxel Gold (III)-PEDylated Complex Nanocarriers

Taxanes Hybrid Nanovectors: From Design to Physico-Chemical Evaluation of Docetaxel and Paclitaxel Gold (III)-PEGylated Complex Nanocarriers

Gwendolyn Marguerit, Hanane Moustouai, Maroua Ben Haddada, Nadia Djaker, Marc Lamy dela Chapelle, and Jolanda Spadavecchia*

This study gives an original methodology to synthesize novel metallo-drugs nanoparticles relevant for medicinal chemistry. Gold (HAuCl₄) are complexes with antitumor compounds (paclitaxel (PTX); docetaxel (DTX)) and dicarboxylic acid-terminated polyethylene-glycol (PEG) that plays a role of surfactants. The proposed synthesis is fast and leads to hybrid-metal nanoparticles (AuNPs) in which drug solubility is improved. The interactions between drugs (DTX, PTX), PEG diacid (PEG), and Au (III) ions to form hybrid nanocarriers called DTX IN PEG-AuNPs and PTX IN PEG-AuNPs, are characterized by various analytical techniques (Raman and UV-vis spectroscopies) and transmission electron microscopy. The efficient drugs release under pH conditions is also achieved and characterized showing an amazing reversible equilibrium between Au (III)-complex-drug and Au⁰NPs. For therapeutic purposes, such AuNPs are then decorated with the anti-EGFR polyclonal antibodies, which specifically recognizes the hERG1 channel aberrantly expressed on the membrane of human lung cancer cells. This paper, through an original chemical approach, will occupy an important position in the field of nanomedicine, and hope that novel perspectives will be proposed for the development of high drug-loading nanomedicines.

1. Introduction

The development of new nanotherapeutic agents is one of the main challenges in the field of nanomedicine.^[1–3] The study of the structure–activity relationships (SAR) of synthetic drug analogs paves the way to develop new nanovectors for which their chemical-physical properties are very critical in cell biology studies.^[4] An ideal nanovector consists in a drug or a biomolecule embedded in or grafted on nanoparticles or porous nanomaterials

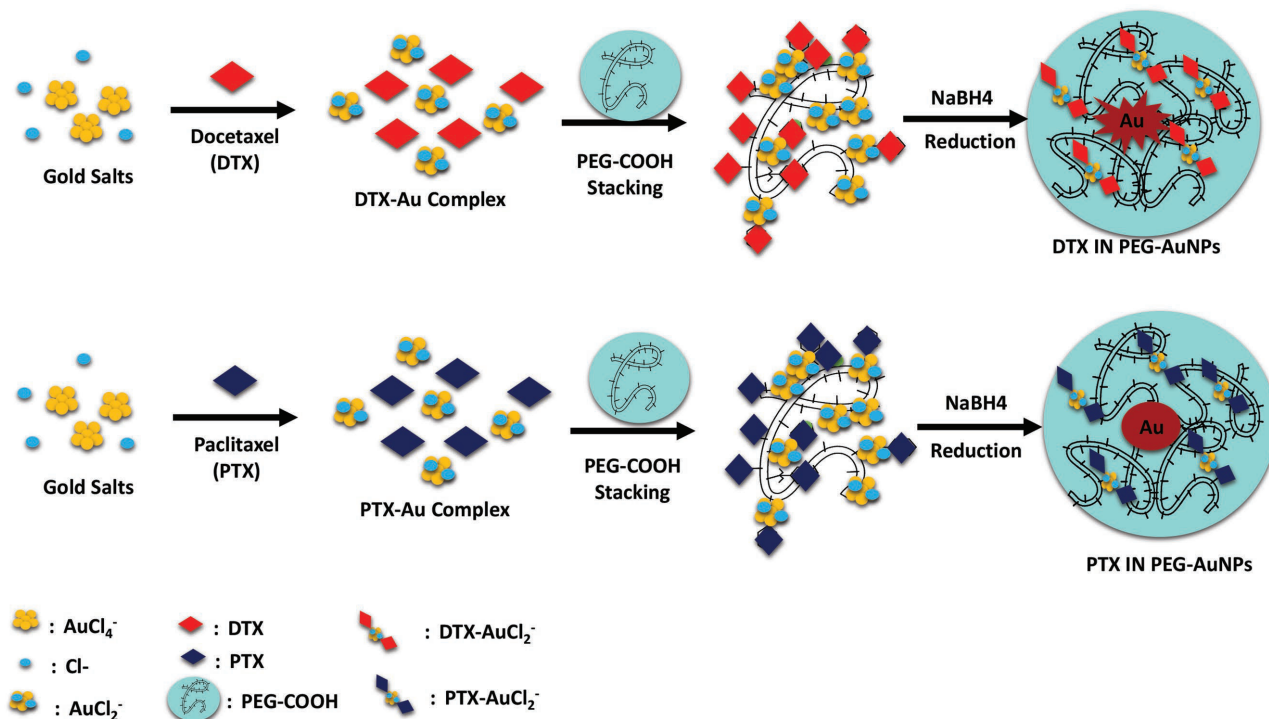
G. Marguerit, H. Moustouai, Dr. M. B. Haddada, Dr. N. Djaker,
Prof. M. L. de la Chapelle, Dr. J. Spadavecchia
CNRS
UMR 7244
CSPBAT
Laboratoire de Chimie
Structures et Propriétés de Biomateriaux et d'Agents
Thérapeutiques Université Paris 13
Sorbonne Paris Cité, 93200 Bobigny, France
E-mail: jolanda.spadavecchia@univ-paris13.fr
Prof. M. L. de la Chapelle
Southwest Hospital
Third Military Medical University
Chongqing 400038, China

DOI: 10.1002/ppsc.201700299

capable to recognize specific cells (cancer cells, for instance)^[1,5] in order to improve pharmacokinetics and biodistribution phenomena, with consequent reduction of systemic side effect. The current objective in nanomedicine is to develop protocols for the synthesis without toxic chemicals of biodegradable and biocompatible nanoparticles. Nanovectors alias “nanomedicines” can prevent several drawbacks of free drugs, such as poor water solubility, low drug-loading (generally less than 10%), and short drug half-life in vivo.^[6,7] Numerous nanovectors have been designed, synthesized, and tested, but only a few encapsulated forms of anticancer drugs have been marketed.^[8,9] Gold nanoparticles (AuNPs)^[3,10] are presented as a very good candidate for drug vectorization and targeting since they allow the constitution of dendrimers of several types and size, they can be easily modified with various ligands such as poly(ethylene glycol) (PEG), they can be

functionalized with targeting moieties.^[5a,11] Anticancer drug can be covalently attached to the AuNP as proposed by Gibson et al. for a paclitaxel derivative^[12] and by Prabakaran et al. for doxorubicin (DOX).^[13a] Entrapment of the drug without covalent binding to the AuNP appears to be simpler and may facilitate uptake of the drug by the cancer cell, as opposed to endocytosis of the whole AuNP, a slower and less efficient process.^[14]

Taxanes have been recognized as a family of very efficient anticancer drugs. The two main taxanes are Taxol for paclitaxel (PTX) and Taxotere for docetaxel (DTX). The antitumor mechanism of action for DTX and PTX is the hyperstabilization of microtubules that bind β subunit protein of tubulin inhibiting their depolymerization. However, the formulation in use has shown dramatic side effects^[12] as their poor water solubility is responsible for drug delivery problems and consequently for systemic toxicity that limited their clinical application. The use of nanoparticles for taxanes delivery can improve their water solubility minimizing the side effects and increasing the tumor-targeting distribution.^[15] Recently Moustouai et al. have designed a new nano-therapeutic agent based on a gold-doxorubicin complex called DOX-IN-PEG-AuNPs.^[16] In this nanovector, DOX molecules and PEG diacid molecules were chelated with Au (III) ions from tetrachloroauric acid (HAuCl₄). It was demonstrated that effective DOX release



Scheme 1. Schematic representation of the synthesis of DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs via a three-step process (Please note that drawings are not in scale and are not intended to be representative of the full samples composition).

was carried out at pH 4, with stability attained at AuNP diameter close to 20 nm in physiological pH. This strategy can be applied to any drugs possessing complexation ability, such as carboxylates, phosphonates, including anthracycline, alkaloid, and flavonoid.^[16–20] The particle size and pH-responsive point of nano-therapeutics are dependent on the complex combinations of polymer ligands, drug molecules, and center metal ions.^[18] The purpose of this study is to provide novel nanomedicines for biological applications by using taxanes (DTX or PTX) complexed to gold ions to build nanoparticles (DTX IN PEG-AuNPs; PTX-IN PEG-AuNPs), with different chemical-physical properties to improve their biological activity. Chemical-physical characterizations were performed to demonstrate the change of taxanes conformation during the formation of the AuNP and the drug release from the gold nanocarriers. We envision that this study will occupy an important position in the field of nanomedicine, and hope that novel perspectives will be proposed for the development of high drug-loading nanomedicines. To the best of our knowledge, these aspects have never been described before in published reports.

2. Results and Discussion

2.1. Formation Mechanism of DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs

Previously, Moustouai et al. have designed a new nano-therapeutic agent based on a gold-doxorubicin complex called DOX-IN-PEG-AuNPs.^[16] Chemical-physical characterizations and biological in vitro studies, fully elucidating that the change

of DOX conformation during the formation of gold-nanostructure by complexation, have a large influence in its therapeutic activity. Other authors have studied the mechanism of hybrid nanoparticles and competition effect with different capping agent on the growth process.^[21]

The purpose of this study is to demonstrate the formation of stable complexes of PEGylated Au(III)-DTX and PEGylated Au(III)-PTX, respectively, as building blocks of gold nanoparticles. The main difference with previously reported synthetic procedures is that both PTX and DTX participate in the stabilization of AuNPs via complexation between their chetone and hydroxyl groups with chloride auric ions. In our case, the formation of AuNPs from AuCl_4^- includes some main steps (**Scheme 1**):

- (1) Complexation of DTX-AuCl_4^- or PTX-AuCl_4^- and generation of gold clusters;
- (2) Initial reduction of drug-metal ions by dicarboxylic acid-terminated PEG that adsorbs onto DTX-Au or PTX-Au complexes;
- (3) Reduction of metal ions in that vicinity and growth of gold particles and colloidal stabilization by molecules of PEG polymers.

In the first step, DTX and PTX were added in HAuCl_4 aqueous solution to complex with him. Thus, the positively charged PTX or DTX in water solutions shows strong electrostatic interaction with negatively charged AuCl_4^- ions and they form a complex PTX-AuCl_4^- or DTX-AuCl_4^- , that plays a final role in growth process of NPs. The addition of PEG-COOH

increases the kinetics of reduction by complexation of Au ions,^[5b] controlling the growth process of nanoparticles (second step). Finally, the reduction by NaBH₄ refines the grow process of nanoparticles (third step). The quantum yield of obtained drug-nanoparticles was 83% for DTX IN-PEG-AuNPs and 76% for PTX IN-PEG-AuNPs, respectively. All products of our synthetic procedure showed high stability (stability test, Supporting Information) and were extensively characterized by UV-vis absorption spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), and Raman spectroscopy.

2.2. Comparative Physico-Chemical Characterization of DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs

DTX (Taxotere) and PTX (Taxol) are chemical taxanes analogs except two groups in the chemical structure.^[12,22] The differences are highlighted by the red groups. In particular, DTX shows a hydroxyl functional group on carbon 10 and a *tert*-butyl carbamate ester on the phenylpropionate side chain while PTX has an acetate ester and a benzamide.^[12,22] DTX is more water soluble than PTX due to its chemical structure.^[7b] In previous studies, DTX and PTX were derivatized at the hydroxyl group in the C-2' position to form a derivatized acid ester.^[23] The free hydroxyl group in this position is essential for anti-cancer activity.^[24] In our study, PTX and DTX were complexed to the AuCl₄⁻ solution, in order to form metallo-micelles as described previously.^[16] The addition of diacid polymer

molecules (PEG-COOH) in the mixture involves the initial reduction process during the nucleation and growth process determining the final shape and size of the nanoparticles controlled by the concentration ratio between the gold salt and the different capping drugs. TEM images of PTX IN-PEG-AuNPs show a well dispersion of the nanoparticles with an average size of 20 ± 1 nm (Figure 1A). Different nanostructures were obtained with DTX IN-PEG-AuNPs. They display a snow-like shape, embedded in a shell of PEG, with a similar diameter around 22 ± 1 nm (Figure 1B). Other authors have reported the synthesis of similar nanostructures using dicarboxylic PEG,^[16] while another group has produced snowflakes nanoparticles by incorporating protoporphyrin molecules in the growth solution of AuNPs. Based on previously reported findings,^[16,21b,25] we suppose that, when DTX and dicarboxylic PEG were added to the AuCl₄⁻ solution, the PEG was bound initially to Au (III) in a mushroom conformation followed by a conformational change to brush mode.

The absorption spectra of PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG AuNPs were characterized by a small peak at 300 nm, assigned to the PTX or DTX absorption, and a surface plasmon band at 535 nm (Figure 1C, blue line) and 533 nm (Figure 1C, red line), respectively. PEG-COOH can be used as stabilizing polymers for AuNPs due to the formation of coordination bands between the Au ions and the chetone or the carboxylic groups of PTX or DTX, respectively. This chelation induces a better dispersion of the Au ions, which were easier reduced to form single AuNPs of relatively uniform size. This behavior is

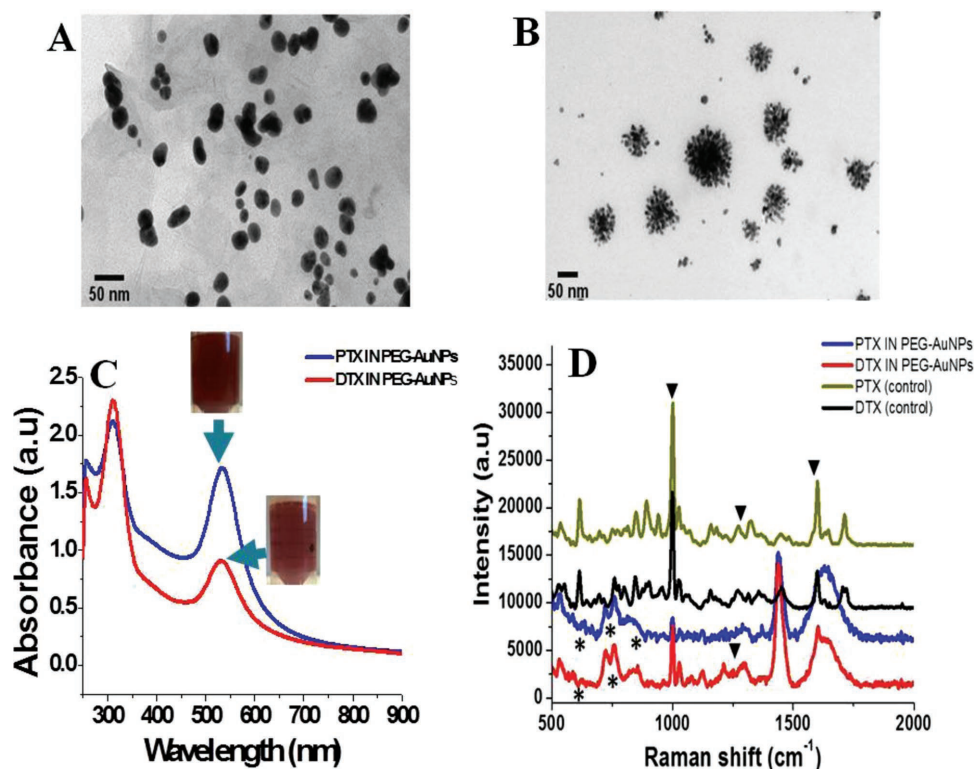


Figure 1. TEM images of A) PTX IN PEG-AuNPs and B) DTX IN PEG-AuNPs; C) normalized UV-vis absorption and D) Raman spectra of the PTX IN PEG-AuNPs and DTX IN PEG-AuNPs products compared to free PTX and DTX as control. (A, B) Scale bars: 50 nm. (D) Raman spectra. Experimental conditions: $\lambda_{exc} = 785$ nm; laser power 20 mW; accumulation time 180 s.

Table 1. z-potential and hydrodynamic diameter of PTX IN PEG-AuNPs and DTX PEG-AuNPs.

Synthetic product	Zeta potential [mV]	Hydrodynamic diameter [nm]	PdI
PTX IN PEG-AuNPs	-29 ± 4	20 ± 2	0.3
DTX IN PEG-AuNPs	-30 ± 1	22 ± 2	0.3

associated with π - π^* electronic transitions due to interactions between the taxanes ring and AuCl_4^- ions^[25] giving clear evidence of the complex formation. The loading of DTX on the gold nanoparticles (DTX IN PEG AuNPs) was confirmed by the strong decrease of the band at 530 nm and an increase of band at 300 nm in the UV-visible absorbance (Figure 1C, red line) and the tendency of snow-like shape to agglomerate differently to PTX IN-PEG-AuNPs. This chemical behavior is due to a different adsorption onto gold facets [110] of PTX and DTX, based on their different steric conformation of chemical groups during nucleation and growth process of AuNPs. In addition, the color bright pink-violet of both nanoparticles and the UV-vis spectra remain unaltered after storage for more than six months at room temperature suggesting the formation of stable particle suspension. The NP sizes were confirmed by dynamic light scattering (DLS) measurements (Table 1). The gold surface saturation was achieved at a PEG addition concentration of $18.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, as described previously,^[16] that corresponds to ≈ 1.20 dicarboxylic PEG molecules/AuNP. Zeta potential measurements show that PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs were colloidally stable at physiological pH (z-potential = -29 ± 1 and -30 ± 1 mV with a PdI equal to 0.3) (Table 1). This stability was enhanced with the presence of the PEG coating.^[16]

The steric arrangement of PTX and DTX during synthetic process of PEGylated gold nanoparticles was confirmed by Raman spectroscopic analysis (Figure 1D). Devi et al. have studied and characterized PTX-polymeric nanoparticles by Fourier transform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopies.^[26] These spectroscopic analysis showed that the specific functional groups of the PTX-polymeric nanoparticle have the same chemical characteristics than the pure paclitaxel drug, indicating that the molecular interaction with the NP surface does not affect the chemical structure of the drug.^[23,26] Contrary to this study, even if we have involved similar ingredients (drug, polymer) chelated to gold ions in order to form gold nanoparticles, the spectroscopical fingerprints of our final nanodrug are not peculiar compared to the *free* drugs.

In detail, Raman spectra of free PTX and DTX and PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs in water exhibit many bands in the region 500 – 2000 cm^{-1} (Figure 1D). More details on the band assignment are given in Table S1 (Supporting Information) (The wide band observed around 1600 cm^{-1} on the PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs Raman spectra is assigned to the water). The free PTX and DTX Raman spectra are very close since both molecules are very similar and as a consequence show the same vibrational modes. The same observation can be done for the PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs Raman spectra. This means that the PTX and DTX have similar structure in interaction with the gold surface. However, large differences are observed between the free PTX

or DTX and when they are interacting with the AuNPs. Only few bands remain as the two bands around 1000 cm^{-1} and the one around 1620 cm^{-1} . The other ones are less intense or completely disappeared. For instance, the strong band at 1712 cm^{-1} assigned to C=O carbonyl stretching of nalidixic acid^[27] disappears after formation of gold nanoparticles. Such spectral modifications are relevant of the steric conformational change of the drugs after grafting on the gold nanoparticles. On the PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs Raman spectra new bands also appear as an intense doublet at 720 – 760 cm^{-1} due to C–H plane deformation and a strong peak at 1439 cm^{-1} assigned to ν C–C stretching. These bands are due to variation of the steric conformation of the drug, and become more prominent upon complexation, as described previously.^[28,16] As a matter of fact, when C=O and hydroxyl groups of DTX and PTX interact with a metal, the steric conformation becomes more tilted in respect to the planar one.^[16,28]

Focusing our attention on the spectral range 200 – 500 cm^{-1} (Figure 2A), and 2000 – 3100 cm^{-1} (Figure 2B), one can detect several spectral changes which confirms a chemical and steric modification of each drug (PTX, DTX) after complexation with gold ions and PEG-diacide molecules. One of the Raman fingerprint of the DTX IN-PEG-AuNPs is the presence of a band around 263 cm^{-1} whereas for PTX IN-PEG-AuNPs, double peak at 235 – 285 cm^{-1} is observed (Figure 2A). These bands can be assigned to the gold chloride stretches, ν (AuCl) and δ (OAuO) in aliphatic ring (C7–C9), and is a clear evidence of the formation of a complex between AuCl_2^- and DTX or PTX in solution. Furthermore, the presence of double peak for DTX compared to a single peak for PTX confirmed the distinct chemical behavior of these analogue drugs, under complexation with gold ions, probably due to the differences in their chemical groups. The common peak at 430 cm^{-1} is due to the vibrations $\delta(\text{OH}\cdots\text{O})$, $\nu(\text{OH}\cdots\text{O})$ of the PEG. Based on the spectrochemical and previously theoretical results, we assumed that Au^{3+} ions promoted the deprotonation of the DTX and PTX cyclohexanol group at position C7 and C9. The bands exhibited in the region 3000 cm^{-1} can be assigned to aromatic C–H stretching^[29,30] (Figure 2B). In particular, the peak at 3060 cm^{-1} was used for selective imaging of PTX drug.^[31,29] However, the vibrational frequencies exhibited at 2946 – 2952 cm^{-1} are considered to be due to C–H stretching vibration of the compounds (Table S1, Supporting Information). These peaks disappeared after formation of drug-nanoparticles (PTX IN PEG-AuNPs, DTX IN PEG-AuNPs), while a broad band composed of several peaks appears in the spectral range 2850 – 2930 for both nanovectors due to the symmetric CH_2 – CH_3 stretch vibration of PEG-diacide molecules confirming the main role of the polymer in the synthesis of the nanovector.

2.3. Drug Loading and Release of DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs

The solubility of DTX and PTX in water is very poor (3 – $6 \mu\text{g mL}^{-1}$).^[11a] Astruc and co-workers have improved the solubility of DTX by encapsulation in PEGylated gold nanoparticles using click chemistry under several steps.^[11a] Recently, other authors have studied the process of co-loading of Curcumin and

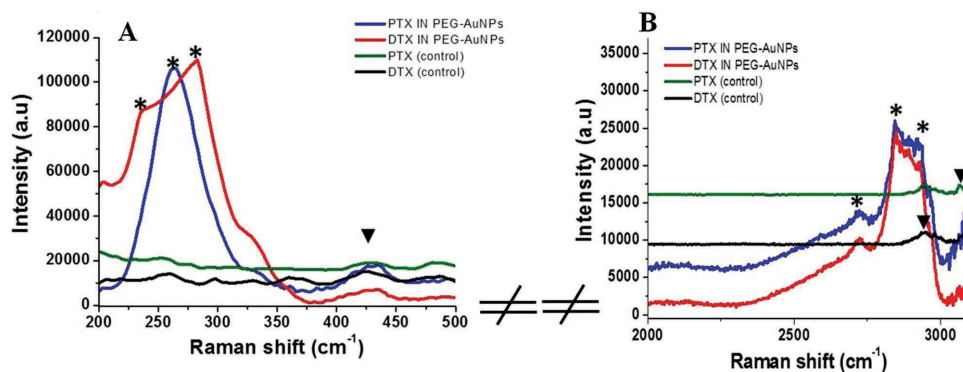


Figure 2. Raman spectra of the PTX IN PEG-AuNPs and DTX IN PEG-AuNPs compared to free PTX and DTX in the range A) 200–500 cm^{-1} and B) 2000–3100 cm^{-1} . Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$; laser power 20 mW; accumulation time 180 s.

PTX onto polymer-functionalized reduced graphene oxide to pick up the PTX efficiency loading of about 98% in the presence of Curcumine and polymer.^[32] In our case, upon complexation of AuCl_4^- and encapsulation into PEG diacid chains, the DTX and PTX molecules reside inside the AuNP core.^[16] The successful loading ratio of PTX and DTX into PEG-AuNPs was evidenced by the characteristic absorption peaks at 260 nm from PTX and DTX (Figure S3a,b, Supporting Information). The standard absorption of PTX and DTX was plotted in the inset of figure (Figure S3c, Supporting Information), according to UV-vis absorbance spectra of PTX and DTX at various concentrations. The loading efficiencies were estimated to be 86% for DTX and 85% for PTX, with 8.3 and 8.1 μg of DTX and PTX present in $2.6 \times 10^{-7} \text{ mol}$ of NPs (data not shown). DTX and PTX releases were pH- and time-dependent (Figure 3A,B, Supporting Information). A sustained drug release was observed in the first 5 h for both drugs at pH 4 and 7, which is highly favorable for drug delivery as the cancer cells thrive in acidic conditions. Similar results were observed at pH 5 and pH 6 under some conditions (Figure S4, Supporting Information). We supposed that the release of DTX and PTX was controlled by a dynamic equilibrium between Au (III)-drug complexes trapped into AuNPs by the hydrophobic interactions between PEG and drugs. As previously described, the mechanism by which acidic pH triggers drug release is probably associated with the presence of carboxylate groups in the chemical structure of PEG molecules.^[16] Such groups become protonated at acidic pH. This reduces the electrostatic interactions occurring between PEG and drugs

that stabilize the DTX IN-PEG-AuNPs or PTX IN-PEG-AuNPs structure.

We suppose that the ionic strength and protonation of DTX and PTX into PEG chains improve the water solubility of the drug molecules, taking advantage of the drug release from AuNPs. Indeed, a remarkable moiety of DTX and PTX in the dissociated complex is released, with consequently particle conformational change, due to the PEG chain and diffusion phenomena.^[5b,16]

2.4. Drug Release and Effect of the pH on Raman Spectra

In order to better understand the intrinsic differences between these two nanomedicine candidates, comparative Raman studies were carried out at pH 7.0 and 4.0 in order to follow the PTX and DTX release under a range time (from 1 to 96 h) (Figures S1A and S2A, Supporting Information). Previously, other authors have demonstrated spectroscopical differences and variation of chemical conformation during drug release profiles.^[16,18,25] Thus, PTX IN-PEG-AuNPs and DTX IN-PEG-AuNPs were characterized by Raman spectroscopy after incubation for 96 h in PBS at 37 °C in order to (1) confirm the drug release and (2) to evaluate variations in the chemical orientation of PTX and DTX at pH 4.0 (when PTX and DTX are protonated) and pH 7.0 (when PTX and DTX are partially deprotonated). The Raman band at 263 and 235–282 cm^{-1} were monitored to evaluate the PTX and DTX release, respectively, from AuNPs^[16,28] (Figures S1B and S2B,

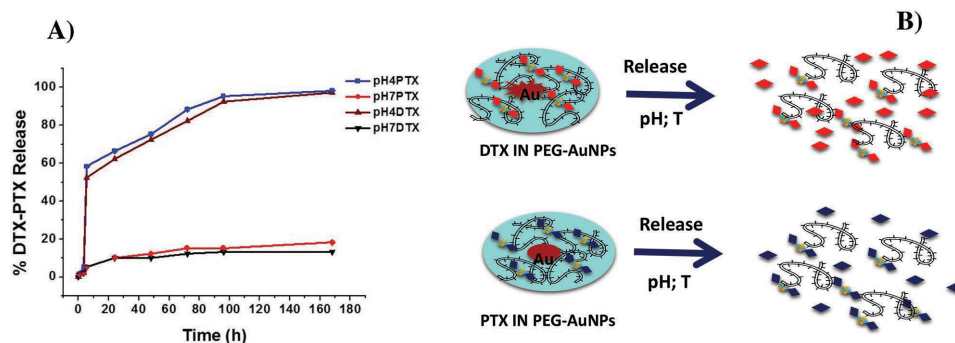


Figure 3. A) Drug release percentage (%) of DTX and PTX for DTX-IN-PEG-AuNPs and PTX-IN-PEG-AuNPs versus time in PBS (37 °C) at pH = 4.0 or at pH = 7.0. B) Schematic diagram of DTX and PTX release under pH conditions.

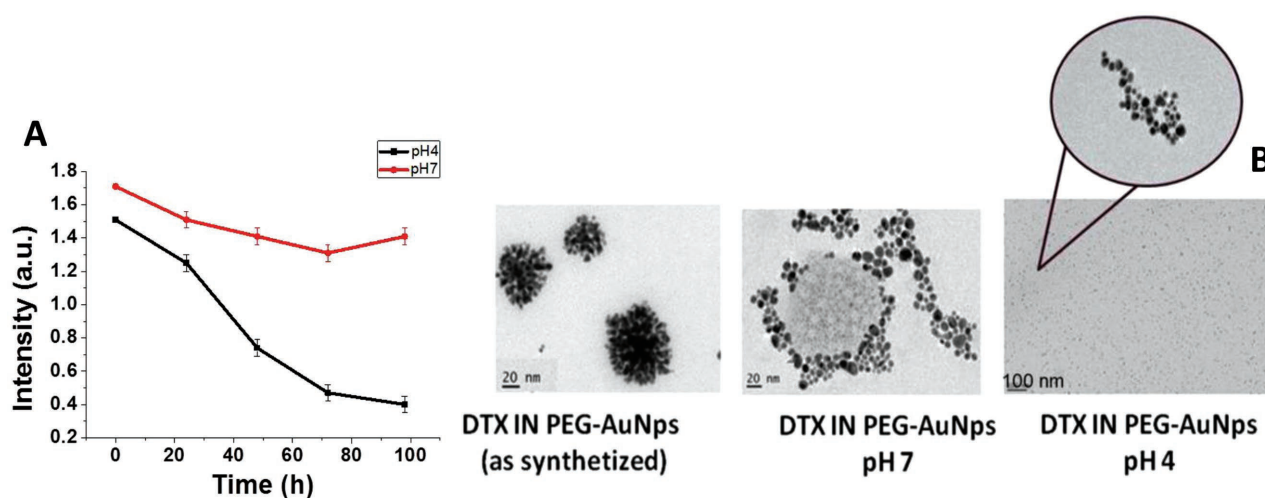


Figure 4. A) Variations of the Raman band intensity at $235\text{--}282\text{ cm}^{-1}$ versus time. DTX IN-PEG-AuNPs were incubated in PBS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) at pH 4.0 and pH 7.0. B) TEM images and conformational shape modifications under PBS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) at pH 4.0 and pH 7.0.

Supporting Information). The intensity of this band continuously decreased overtime, until completely disappearing after 96 h (Figures 4A and 5A). Besides, a strong Raman intensity decrease was observed in the spectral range $2600\text{--}3000$ and $200\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, confirming that, DTX and PTX release were pH- and time-dependent. At both pH we observed that after 96 h, the Raman spectra are dominated by the water mode at 1637 cm^{-1} and the PEG Raman spectrum.^[16] The DTX and PTX spectrum observed in DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs are largely reduced (Figures S1A,B and S2A,B, Supporting Information). We monitored our experiments each hour, noting a remarkable spectral change at 96 h, beginning at time 5 h. We also observed an original morphological variation of our nanovectors under pH 4.0 and 7.0. (Figures 4A and 5A). Specially for DTX IN PEG-AuNPs, we observe a gradual change of shape and size from nanoflowers of about 20 nm (as synthesized) to small nanospheres of about 2–3 nm (pH 4.0). Between these two states, we observe an intermediate one (pH 7.0) in which a morphological change as well as a depolymerization from the original structure was more evident (Figure 4B). Besides PTX IN PEG-AuNPs appears to be embedded in globular clusters (pH 7.0), that change again in polymeric gold-sphere at pH 4.0 (Figure 4B). As mentioned previously, the pH value plays a key role during the

reduction process of Au (III) to Au⁰, in the formation of gold nanoparticles.^[33] In particular, Yang et al. have demonstrated that citric acid forms complexes with Au (III), at various pH values, influencing the particle size.^[33] In our case, PEG diacide, like citric acid, influences the formation of complexes PEG-Au (III)-drug, during growth of NPs.^[16,34] We conclude that, under pH conditions, a dramatic change of shape and size of DTX PEG-AuNPs and PTX PEG-AuNPs was made and PTX and DTX were released as gold complex, as previously described for other drugs.^[16]

2.5. Drug Release and Effect of the pH on Localized Surface Plasmon (LSP)

Similar release experiments were also observed by LSP monitoring. Figure 6A,B shows LSP resonance spectra before and after incubation of nanoparticles under specific conditions (pH: 4.0–7.0; time: 96 h; T : $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). In the case of PTX IN PEG-AuNPs (Figure 5A), after 96 h, at pH 7, we observe a disappearance of the LSP band at 535 nm and the peak at 310 nm due to the PEG-AuCl₂⁻. An increase of the peak intensity at 256 nm probably due to PTX fingerprint associated to AuCl₂ ions upon complexation was observed. This increase occurs at

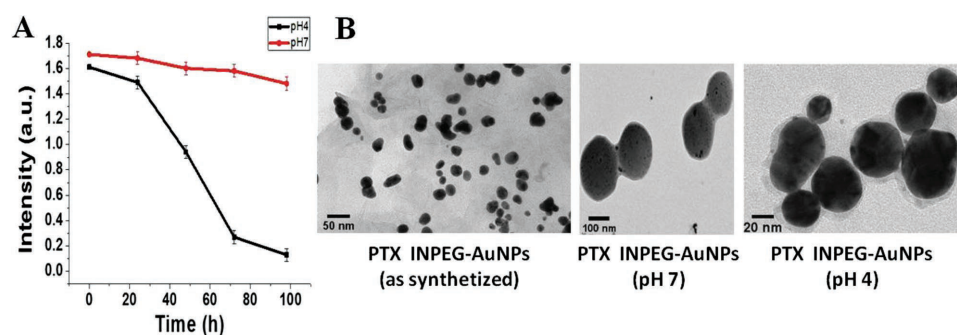


Figure 5. A) Variations of the Raman band intensity at 263 cm^{-1} versus time. PTX IN-PEG-AuNPs were incubated in PBS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) at pH 4.0 and pH 7.0. B) TEM images and conformational shape modifications under PBS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) at pH 4.0 and pH 7.0.

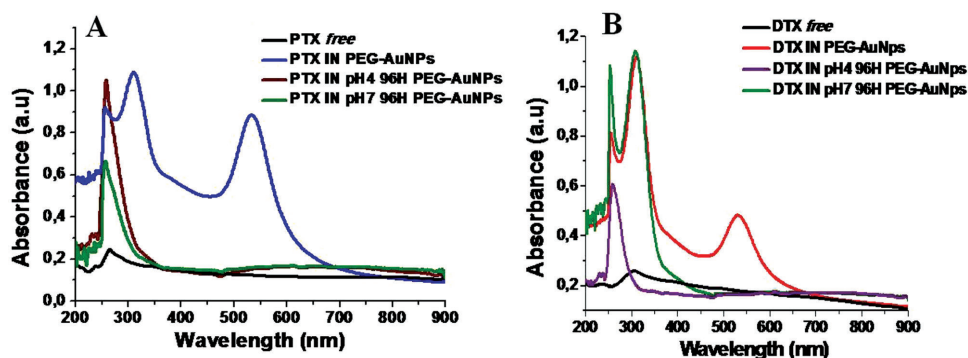


Figure 6. Drug release (PTX; DTX) and changes in the UV–vis absorption spectra of A) PTX IN-PEG-AuNPs and B) DTX IN-PEG-AuNPs when incubated in buffer solution at pH 7.0 and pH 4.0 up to 96 h.

pH 4, confirming the complete release of the PTX drug. A different behavior is observed in the case of DTX IN PEG-AuNPs (Figure 6B), in which after incubation at pH 7 for 96 h, we observe a disappearance of LSP band at 535 nm, while the band at 310 nm remains unchanged confirming the presence of the PEG-AuCl₂. A similar increase of the peak corresponding to DTX drug was observed. At pH 4 under the same conditions, a disappearance of the peak at 310 nm was observed with an enhancement of the peak at 256 nm probably due to DTX-AuCl₂⁻. This spectroscopical behavior during pH-drug-release gives evidence of the change of conformation of the drug when it is encapsulated into gold nanoparticles. We assume that during incubation at pH 7 and 4, the drug migrates in the PEG chains and is released upon drug-PEG-AuCl₂⁻. This hypothesis can explain a depolymerization and the change of size observed at different pH. As described in literature,^[35] the UV absorption at 304 nm is due to the ligand metal charge transfer (LMCT) bands of AuCl₄⁻ ions between gold and chloride ligands.^[36] After NaBH₄ reduction, the LMCT bands of AuCl₄⁻ decreased dramatically, suggesting that Au³⁺ ions in HAuCl₄ solution were effectively reduced into the metallic state.^[37] We can emphasize that during the release at pH 4 and 7, at $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, the intensity decrease of the plasmon peak with the increase of the peak at 256 nm of DTX and PTX is due to reversible equilibrium between AuNPs and DRUG-AuCl₂⁻. This reversible equilibrium of drug-gold ion as complex at different pH was confirmed by liquid chromatography mass (LS-MS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis (data not shown).

2.6. Active Targeting

Drug-gold nanoparticles (PTX IN PEG-AuNPs, DTX IN PEG-AuNPs) were used as a support for the conjugation of the targeting moiety (anti-EGFR-pAb). The anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) binds to the extracellular domain of EGFR in its inactive state and demonstrates activity in a variety of tumor types and in particular lung cancer.^[38] They compete for receptor binding by occluding the ligand-binding region, and thereby block ligand-induced EGFR tyrosine kinase activation.^[39] Anti-EGFR-pAb molecules were immobilized on the surface of activated nanoparticles through the formation of amide links

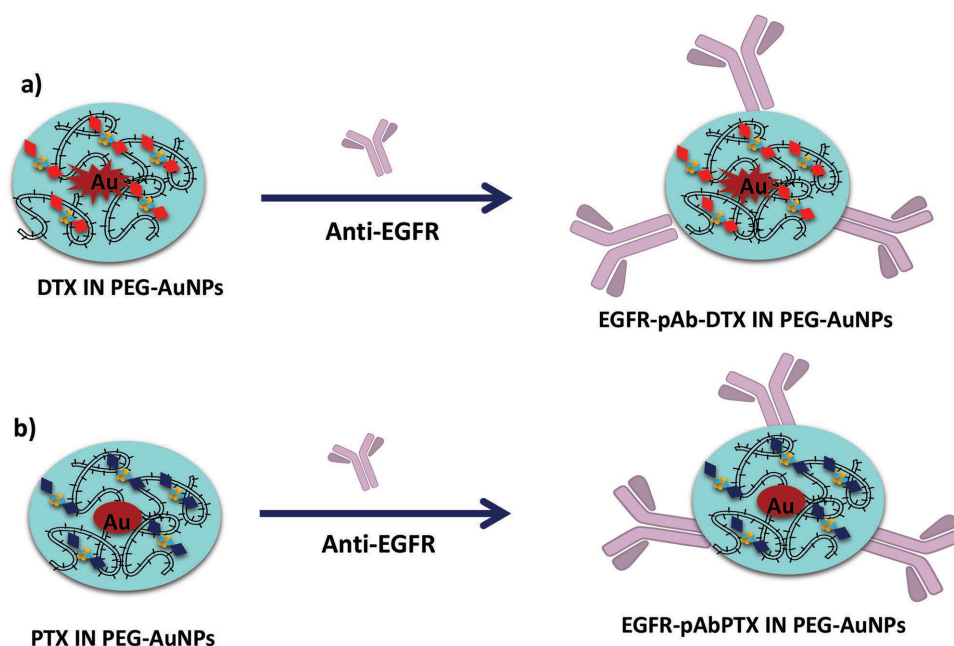
between the COOH groups decorating the surface of the drug-gold nanoparticles and the NH₂ groups of the pAb (Scheme 2).

The interaction between anti-EGFR-pAb and drug-gold nanoparticles was monitored by detecting changes in the LSP band (Figure 7). PTX IN PEG-AuNPs showed an LSP band centered at ≈530 nm, typical of AuNPs. After immobilization of anti-EGFR-pAb onto PTX IN PEG-AuNPs, the resulting solution was colorless and was characterized by a broad LSP peak at 572 nm, which could be assigned to a change of localized refractive index of PEG-AuNPs and to the formation of NP agglomeration. Similar behavior was observed for DTX IN AuPEG NPs, for which we observe a broadening of the plasmon band and a red shift from 532 to 580 nm after bioconjugation.^[40] Based on the UV–vis spectra, we suggest that such red shift could be associated to the successful bioconjugation of the AuNPs surface with anti-EGFR-pAb and the subsequent AuNPs agglomeration associated to the formation of classical van der Waals interprotein interactions.^[5a,41] All nanoparticles were free endotoxin and suitable for further nanomedicine applications.

3. Conclusions

The success of this study was to provide the design, synthesis, and characterization of new oncological nanotherapeutics based on stable Au (III)-taxanes complex. We showed that taxanes chemical analogs, such as DTX and PTX react skillfully under PEGylated gold complexation with an improvement of their solubility and specific release behavior. The obtained “nanomedicines” showed several favorable advantages as nanotherapeutic for cancer therapy, including (i) solubility and high drug loading, (ii) specific release under pH conditions, (iii) over six-month stability in aqueous solution, and (iv) active targeted ability.

We demonstrated that the Raman technique coupled to LSP monitoring were able to characterize the equilibrium of drug released from gold-complex nanocarriers under acidic and neutral conditions. These results and speculations highlight the potential of the SERS approach to study DTX and PTX–gold interactions in relation to drug delivery and drug biological activity. Further studies are still envisaged, focused on assessing the in vitro and in vivo assessment toxicity,



Scheme 2. Schematic representation of anti-EGFR-pAb bioconjugating onto a) DTX IN-PEG-AuNPs and b) PTX IN PEG AuNPs surface (Please note that drawings are not in scale and are not intended as representative of the full samples composition).

pharmacokinetics, and dynamics on relevant lung-cancer model.

4. Experimental Section

All chemicals were reagent grade or higher and were used as received unless otherwise specified. Tetrachloroauric acid ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sodium borohydride (NaBH_4), N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), dicarboxylic PEG-600 (PEG), phosphate buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.0, pH 4.0, pH 9.0), docetaxel (98%), and paclitaxel (98%) were purchased from Sigma Aldrich.

Synthesis of DTX IN-PEG-AuNPs: The main steps of synthesis of DTX IN-PEG-AuNPs colloids are described in Scheme 1. 20 mL HAuCl_4 aqueous solution (2.5×10^{-4} M) was added to DTX (5 mL, 1.72×10^{-4} M in water) and aged for 10 min. 250 μL of dicarboxylic PEG was then added and mixed by magnetic stirring for 10 min at room temperature. Finally, 6 mL of aqueous 0.01 M NaBH_4 was added at once. The formation of the DTX IN-PEG-AuNPs was observed as an instantaneous color change of the solution from pale yellow to bright pink-violet after addition of

the reducing agent. Products of each synthetic step were stored at 27–29 °C and characterized by UV–vis spectroscopy, transmission electron microscopy, and Raman spectroscopy. The “as-prepared” DTX IN-PEG-AuNPs solution was centrifuged at 9000 rpm for 10 min for three times; then, the supernatant was discarded. The residue was re-dispersed in an equivalent amount of PBS (pH = 7). This was repeated twice to remove excess of nonconjugated dicarboxylic PEG.

Synthesis of PTX IN-PEG-AuNPs: Synthesis of PTX IN-PEG-AuNPs (Scheme 1) colloids was carried out in the same conditions described earlier for DTX.

Stability of DTX (PTX) IN-PEG-AuNPs as Function of pH: The stability of nanoparticles was detected by UV–vis. DTX (PTX) IN-PEG-AuNPs nanoparticles were dissolved in PBS solution 0.1 M at different pH (pH 1.68, 7, 12) during 18 h (Supporting Information).

Anti-EGFR-pAb Immobilization onto DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs: The binding of anti-EGFR-pAb onto DTX (PTX) IN-PEG-AuNPs surface was performed at pH 9.0 in PBS. Briefly, 20 μL of EDC/NHS (80/20 w/w ratio) aqueous solution was added into 5 mL of DTX(PTX) IN-PEG-AuNPs dispersion.

After 2 h, 50 μL (0.1 ng mL^{-1}) of anti-EGFR-pAb in PBS was added in 2 mL of the reaction mixture and stirred for 2 h at room temperature. The obtained anti-EGFR pAb-DTX(PTX) IN-PEG-AuNPs were centrifuged

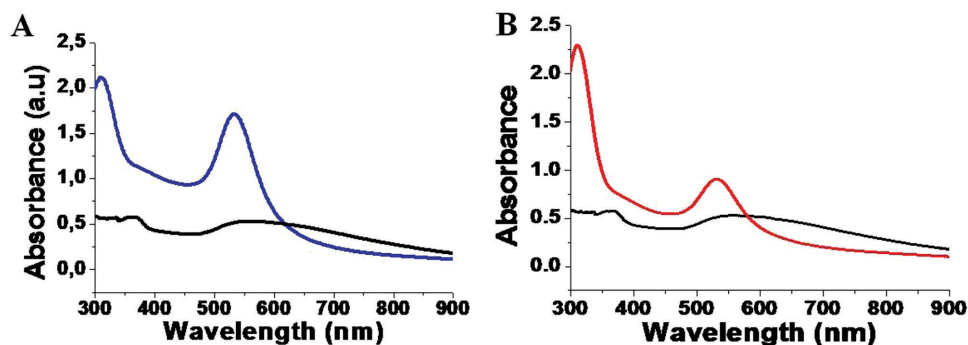


Figure 7. A) Extinction spectra of PTX IN PEG-AuNPs before (blue line) and after conjugation to anti-EGFR-pAb (black line) and B) DTX IN PEG-AuNPs before (red line) and after (black line) conjugation to anti-EGFR-pAb.

two times at 9000 rpm for 10 min to remove excess of nonconjugated anti-EGFR-pAb and dried under nitrogen.

Physico-Chemical Characterization: All the measurements were performed in triplicate in order to validate the reproducibility of the synthetic and analytical procedures.

UV-Vis Measurements: Absorption spectra were recorded using a Perkin Elmer Lambda UV-vis 950 spectrophotometer in plastic cuvettes with an optical path of 10 mm. The wavelength range was 200–900 nm.

TEM: All microscopy analyses were realized as previously described.^[16]

Raman Spectroscopy: The Raman experiments were performed on an Xplora spectrometer (Horiba Scientifics, France). The Raman spectra were recorded using an excitation wavelength of 785 nm (diode laser) at room temperature. For measurements in solution, a macro-objective with a focal length of 40 mm (NA = 0.18) was used in backscattering configuration. The achieved spectral resolution is close to 2 cm⁻¹.

DLS: The size measurements were performed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a He-Ne laser (633 nm, fixed scattering angle of 173°) at room temperature.

Zeta Potential Measurements: All measurements were carried out as previously.^[16]

Drugs Loading Efficiency: The amount of the drugs (DTX, PTX) incorporated into DTX IN-PEG-AuNPs and PTX IN-PEG-AuNPs were measured by UV-vis absorption spectroscopy. Absorption at 260 nm was used to extrapolate DTX or PTX concentrations based on a calibration curve (Figure S3, Supporting Information). The drug loading efficiency was calculated as follows (Equation (1))

$$\text{Drug loading efficiency(\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (1)$$

where C_1 is the initial drug content and C_2 is the amount of free DTX or PTX in the filtrate after separation of the nanoparticles by ultrafiltration with an Ultrafree MC centrifugal filter units (30 000 NMWL, Millipore, USA).

Drug Release from AuNPs: PTX and DTX releases were evaluated at physiological temperature (37 °C). Drug-loaded AuNPs were dispersed at concentration of 1.5×10^{12} particles mL⁻¹ in 1.0 mL PBS and performed by dialysis as previously described.^[16] The concentration of drug released from AuNPs was expressed as a percentage of the total drug concentration present in the sample (Equation (2)) and plotted as a function of time

$$\% \text{Drug released} = \frac{\text{Concentration of drug released}}{\text{Initial drug concentration}} \times 100 \quad (2)$$

Endotoxin Content in Drug-Gold Nanoparticles: As routine quality control of the materials prior to biological testing, the Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation kit (Thermoscientific, France) was used to determine the LPS contamination in drug-gold nanoparticles (DTX IN-PEG-AuNPs, PTX IN-PEG-AuNPs) before and after conjugation with anti-EGFR-pAb. The assay was carried out as manufacturer's

Table 2. Endotoxin units detected by means of the LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation kit (ND = not detectable; >1 = above detection limit of the assay).

Sample	Endotoxin units [EU mL ⁻¹]
PEG-AuNPs (control)	ND
Anti-EGFRpAb-DTX(PTX) IN-PEG-AuNPs	>1
DTXIN-PEG-AuNPs	ND
PTXIN-PEG-AuNPs	ND
Anti-EGFRpAb antibody	>1

protocol, and absorbance was measured at 405 nm to detect the yellow chromogenic color in the presence of endotoxin. Dilutions of standards and drug-gold nanoparticles were prepared in endotoxin-free water. Drug-gold nanoparticles were tested with and without (blank) the presence of LAL chromogenic substrate to determine any interference in the assay due to the optical properties of the nanomaterial itself. Blanks were subtracted from the readings of each NPs sample to accurately determine the LPS contamination. Results are reported in **Table 2** as average ($n_{\text{test}} = 2$) ± standard deviation. Endotoxin contamination results were kept into account when defining the type of cytotoxic endpoint to be examined.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

G.M. and H.M. contributed equally to this work. This work was partly performed on the CNanoMat platform of the University Paris 13.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

AuNPs, docetaxel, gold complexes, nanomedicine, nanovectors, paclitaxel, Raman spectroscopy

Received: August 14, 2017

Revised: September 29, 2017

Published online:

- [1] N. Ahmad, S. Bhatnagar, R. Saxena, D. Iqbal, A. K. Ghosh, R. Dutta, *Mater. Sci. Eng., C* **2017**, *78*, 553.
- [2] S. A. C. Carabineiro, *Molecules* **2017**, *22*.
- [3] R. Arvizo, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Exp. Opin. Drug Delivery* **2010**, *7*, 753.
- [4] A. S. Paraskar, S. Soni, K. T. Chin, P. Chaudhuri, K. W. Muto, J. Berkowitz, M. W. Handlogten, N. J. Alves, B. Bilgicer, D. M. Dinulescu, R. A. Mashelkar, S. Sengupta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12435.
- [5] a) J. Spadavecchia, D. Movia, C. Moore, C. M. Maguire, H. Moustauoui, S. Casale, Y. Volkov, A. Prina-Mello, *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 791; b) I. Capek, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *112*, 1.
- [6] A. Montero, F. Fossella, G. Hortobagyi, V. Valero, *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 229.
- [7] a) B. Nuijen, M. Bouma, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, *Invest. New Drugs* **2001**, *19*, 143; b) Q. Tan, X. Liu, X. Fu, Q. Li, J. Dou, G. Zhai, *Exp. Opin. Drug Delivery* **2012**, *9*, 975.
- [8] G. Apolone, R. Joppi, V. Bertele, S. Garattini, *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 504.
- [9] S. Jain, D. G. Hirst, J. M. O'Sullivan, *Br. J. Radiol.* **2012**, *85*, 101.
- [10] E. Boisselier, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759.
- [11] a) A. Francois, A. Laroche, N. Pinaud, L. Salmon, J. Ruiz, J. Robert, D. Astruc, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2003; b) A. C. Powell, G. F. Paciotti, S. K. Libutti, *Methods Mol. Biol.* **2010**, *624*, 375.

- [12] J. D. Gibson, B. P. Khanal, E. R. Zubarev, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11653.
- [13] a) M. Prabakaran, J. J. Grailer, S. Pilla, D. A. Steeber, S. Gong, *Biomaterials* **2009**, 30, 6065; b) M. Prabakaran, J. J. Grailer, S. Pilla, D. A. Steeber, S. Gong, *Biomaterials* **2009**, 30, 5757.
- [14] Y.-J. Gu, J. Cheng, C. W.-Y. Man, W.-T. Wong, S. H. Cheng, *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.* **2012**, 8, 204.
- [15] L. Zhang, N. Zhang, *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 2927.
- [16] H. Moustauoui, D. Movia, N. Dupont, N. Bouchemal, S. Casale, N. Djaker, P. Savarin, A. Prina-Mello, M. L. De la Chapelle, J. Spadavecchia, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 19946.
- [17] a) H. Wang, P. Yang, Y. Tian, Z. Zhang, C. Zhao, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 68, 117; b) H. N. Ramaswamy, R. T. O'Connor, in *Developments in Applied Spectroscopy: Selected Papers from the Twentieth Annual Mid-America Spectroscopy Symp., Chicago, IL, May 12–15, 1969* (Ed: E. L. Grove), Springer US, Boston, MA **1995**, pp. 105–112.
- [18] S. Shen, Y. Wu, Y. Liu, D. Wu, *Int. J. Nanomed.* **2017**, 12, 4085.
- [19] J. W. Taylor, A. McSkimming, M. E. Moret, W. H. Harman, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2017**.
- [20] A. S. Silva, V. D. B. Bonifacio, V. P. Raje, P. S. Branco, P. F. B. Machado, I. J. Correia, A. Aguiar-Ricardo, *RSC Adv.* **2015**, 5, 10733.
- [21] a) J. Politi, L. De Stefano, I. Rea, A. M. Gravagnuolo, P. Giardina, C. Methivier, S. Casale, J. Spadavecchia, *Nanotechnology* **2016**, 27, 195701; b) J. Spadavecchia, E. Apchain, M. Alberic, E. Fontan, I. Reiche, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 8363.
- [22] S. J. Clarke, L. P. Rivory, *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, 36, 99.
- [23] G. F. Paciotti, J. Zhao, S. Cao, P. J. Brodie, L. Tamarkin, M. Huhta, L. D. Myer, J. Friedman, D. G. Kingston, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 2646.
- [24] M. L. Miller, I. Ojima, *Chem. Rec.* **2001**, 1, 195.
- [25] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 8410.
- [26] T. S. R. Devi, S. Gayathri, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, 2, 106.
- [27] U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, U. Holzgrabe, *Spectrochim. Acta, A* **2005**, 61, 1505.
- [28] J. Gautier, E. Munnier, L. Douziech-Eyrolles, A. Paillard, P. Dubois, I. Chourpa, *Analyst* **2013**, 138, 7354.
- [29] E. Kang, H. Wang, I. K. Kwon, J. Robinson, K. Park, J. X. Cheng, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8036.
- [30] G. Socrate, Wiley, New York, February **2004**, p. 366.
- [31] E. Kang, J. Robinson, K. Park, J.-X. Cheng, *J. Controlled Release* **2007**, 122, 261.
- [32] K. Muthoosamy, I. B. Abubakar, R. G. Bai, H.-S. Loh, S. Manickam, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 32808.
- [33] S. Yang, Y. Wang, Q. Wang, R. Zhang, B. Ding, *Colloids Surf., A* **2007**, 301, 174.
- [34] a) M. Khafaji, M. Vossoughi, M. R. Hormozi-Nezhad, R. Dinarvand, F. Börrnert, A. Irajizad, **2016**, 6, 27847; b) J. Spadavecchia, R. Perumal, S. Casale, J.-M. Krafft, C. Methivier, C.-M. Pradier, *Chem. Phys. Lett.* **2016**, 648, 182.
- [35] X. Liang, Z. J. Wang, C. J. Liu, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, 5, 124.
- [36] a) J. C. Garcia-Martinez, R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16170; b) P. He, M. W. Urban, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1224; c) C.-J. Liu, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, 5, 124.
- [37] a) X. Liang, Z.-J. Wang, C.-J. Liu, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, 5, 124; b) C. Li, D. Li, G. Wan, J. Xu, W. Hou, *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, 6, 440.
- [38] a) D. E. Gerber, *Drug Dev. Res.* **2008**, 69, 359; b) B. A. Chan, B. G. M. Hughes, *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, 4, 36.
- [39] a) F. Ciardiello, G. Tortora, *N. Engl. J. Med.* **2008**, 358, 1160; b) N. Normanno, C. Bianco, A. De Luca, M. R. Maiello, D. S. Salomon, *Endocr. Relat. Cancer* **2003**, 10, 1; c) J. Mendelsohn, J. Baselga, *Oncogene* **2000**, 19, 6550.
- [40] a) D. R. Hristov, L. Rocks, P. M. Kelly, S. S. Thomas, A. S. Pitek, P. Verderio, E. Mahon, K. A. Dawson, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 17040; b) M. H. Jazayeri, H. Amani, A. A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, B. Sedighimoghaddam, *Sens. Bio-Sens. Res.* **2016**, 9, 17.
- [41] K. H. Müller, M. Motskin, A. J. Philpott, A. F. Routh, C. M. Shanahan, M. J. Duer, J. N. Skepper, *Biomaterials* **2014**, 35, 1074.

Résumé

Le cancer est la première cause de décès en France, il est devenu un enjeu majeur de santé publique. De nombreux traitements existent déjà pour lutter contre cette maladie telle que la chimiothérapie. Cependant, ces techniques utilisent des produits toxiques provoquant des effets secondaires très importants. Dans ce contexte, les nanoparticules d'or (GNP) suscitent un intérêt considérable en raison de leurs propriétés physiques et chimiques. Elles sont donc considérées comme des agents prometteurs pour le traitement du cancer, notamment pour l'acheminement de médicaments jusqu'à la tumeur (nanovecteur), ou encore pour la thérapie photothermique. Le but de cette thèse repose sur le développement de différents nanovecteurs basés sur des GNP avec différentes chimies de surface et l'étude de leur interaction avec des biomolécules (protéines), pour une application dans le traitement du cancer. Dans un premier temps, deux nanovecteurs à base d'or, de polyéthylène glycol et de doxorubicine ((DOX) comme agent anticancéreux) ont été synthétisés suivant deux stratégies différentes. La première stratégie a consisté à greffer la DOX aux GNP entouré de PEG par couplage carbodiimide. La deuxième stratégie, quant à elle, a été réalisée en complexant la DOX avec des ions d'or avant de procéder à la réduction de ces ions en présence du polymère. Ces différentes synthèses ont été caractérisées par MET, absorption optique et spectroscopie Raman. Enfin, une étude de viabilité cellulaire a été réalisée permettant de comparer l'effet cytotoxique des deux nanovecteurs sur une lignée adénocarcinome pancréatique (PANC-1). Dans une seconde partie, une étude a été réalisée sur l'adsorption de trois protéines du sérum sanguin humain (l'albumine, la glycoprotéine et le lysozyme) sur des GNP citratées. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la spectroscopie de corrélation de diffusion comme outil permettant de quantifier l'augmentation du rayon hydrodynamique des GNP provoquée par l'adsorption des protéines. Cette mesure du rayon hydrodynamique a permis de montrer que chaque protéine présente une orientation spécifique, mais aussi une constante d'affinité et une coopérativité différentes avec la surface d'or des nanoparticules. Enfin, dans une dernière partie une étude a été réalisée sur les propriétés photothermiques des nanoparticules d'or citratées de différentes tailles et différentes formes. Dans cette étude, les résultats montrent que l'élévation de température va dépendre de la position de la résonance plasmon par rapport à la longueur d'onde d'excitation, mais aussi de la forme et de la chimie de surface. Ce travail a été réalisé afin de comprendre comment les effets thermiques libérés par les nanoparticules d'or peuvent aboutir à la destruction de cellules cancéreuses.

Mots clés : nanoparticules d'or, doxorubicine, nanovecteur, complexation, couronne protéique, spectroscopie de corrélation, effet photothermique.

Abstract

The fight against cancer is a major challenge for public health, since cancer remains the leading cause of death in France. Conventional treatment like chemotherapy use very toxic products that induce large side effects. In this context, Gold nanoparticles (GNP) are of great interest thanks to their unique physical and chemical properties and are considered as promising agents for cancer therapy as drug delivery or photothermal agents. The aim of this thesis is to develop and study GNP and their interaction with biomolecules (proteins) in the framework of the cancer treatment. Firstly, two PEGyld GNP were synthesized and used as platform to develop nanovectors for doxorubicin ((DOX) anticancer drug), following two different strategies. The first strategy consists in synthesizing PEGyld GNP following "one-step" approach. Then the DOX loading on the nanoparticles was carried out by carbodiimide chemistry. The second strategy was performed by complexing DOX with gold ions, protected by PEG to form clusters. Afterwards these clusters are reduced to synthesize the GNP. The Physicochemical properties of these two kinds of GNP were characterised by TEM, optical absorption and Raman spectroscopy. Finally a cell viability study was carried out to compare the cytotoxicity effects of these two nanovectors on one pancreatic cancer cell line, PANC-1. In the second part, we studied the adsorption of three proteins of human blood serum (albumin, lysosime and glycoprotein) on citrate capped GNP. For this task, we have chosen to use scattering correlation spectroscopy as a tool to quantify the increase of the GNP hydrodynamic radius induced by the protein adsorption. The results showed that each protein has a specific orientation but also different binding affinity and cooperativity with the GNP surface. Finally, in the last part, we investigated the photothermal properties of citrate capped GNP of different sizes and shapes. The results show that the temperature rise depends on the plasmon resonance position compared to the excitation wavelength but also on the shape and the surface chemistry. This work was done to understand how photothermal effect produced by GNP can destroy cancer cells.

Keywords : gold nanoparticles, doxorubicin, nanovector, complexation, protein corona, correlation spectroscopy, photothermal effect.